

ИММУНИЗАЦИЯ САМЦОВ МЫШЕЙ BALB/C И C57BL/6 ИЗМЕНЯЕТ СОСТАВ ИХ МОЧИ И РЕАКЦИЮ САМОК НА ЕЕ ЗАПАХ

© 2024 г. А. С. Хоцкина^{1,*}, Ю. В. Патрушев², Д. И. Юсупова¹, Л. А. Герлинская¹,
Д. В. Петровский¹, М. П. Мошкин¹, Е. Л. Завьялов¹

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² 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 09.04.2024 г.

После доработки 04.06.2024 г.

Принята к публикации 04.06.2024 г.

Запах играет важную роль в коммуникации животных и выборе партнера для спаривания. После заражения или активации иммунной системы самцов мышей запах их мочи становится менее привлекательным для половозрелых самок. Развитие иммунного ответа на ранних стадиях связано с продукцией различных цитокинов, как провоспалительных, так и противовоспалительных. Чтобы исследовать химическую основу наблюдаемых различий и проанализировать эффекты взаимодействия самок с запахом антигенстимулированных самцов, мы иммунизировали самцов инбредных линий мышей BALB/c (Th1) и C57BL/6 (Th2) гемоцианином (KLH). Для самок обеих исследованных линий привлекательность запаха мочи самцов, собранной через 3 дня после иммунизации, оказалась ниже по сравнению с запахом контрольных самцов. При этом самки линии BALB/c меньше обнюхивали мочу иммунизированных самцов, а самки C57BL/6 демонстрировали меньшую продолжительность груминга в тестах с мочой иммунизированных самцов. Измененная реакция самок на запах мочи самцов, собранной на 3-й день после введения KLH, совпала с антиген-индуцированной модуляцией относительных уровней летучих органических соединений (ЛОС), которые были обнаружены в образцах мочи методами газовой хроматографии и масс-спектропии. (ГХ-МС). У самцов обеих линий после введения KLH наблюдалось увеличение содержания нонанала, бензотиазола, а также 2-втор-бутил-4,5-дигидротиазола, и [1,4,5]-оксидитиопана. При этом не было обнаружено соединений, содержание которых разнонаправленно изменяется в моче самцов после иммунизации в зависимости от линии животного.

Ключевые слова: иммунизация мышей, предпочтение полового партнера, запах мочи, ольфакторный тест, нонаналь, бензотиазол, 2-втор-бутил-4,5-дигидротиазол, SBT

DOI: 10.31857/S0044452924040089, **EDN:** YPZAGF

ВВЕДЕНИЕ

Данные многочисленных исследований свидетельствуют о том, что выбор самкой полового партнера носит селективный характер, и ключевую роль в этом выборе играют физиологические механизмы дистанционной рецепции [1–3]. В зависимости от таксономической принадлежности и видоспецифического образа жизни самки используют зрительные, слуховые или ольфакторные анализаторы при выборе полового партнера [2, 4].

У видов, населяющих большие территории и не имеющих постоянных частых встреч с конспецификами, основой коммуникации часто являются хемосигналы, состоящие из летучих и нелетучих соединений. Хемосигналы рассматриваются как наиболее древняя и широко распространенная форма

межполового взаимодействия практически всех таксонов животных [5]. У грызунов ведущую роль в дистантной оценке территориальных соперников, а также в оценке потенциальных брачных партнеров, играют запаховые метки. По запаху конспецифика грызуны способны определить его пол, возраст, генетический фон, диету, социальный и репродуктивный статус, а также физиологическое состояние [2, 6–10].

Способность к распознаванию и избеганию зараженных особей играет ключевую роль в механизмах поведенческой защиты от инфекций, которые направлены на ограничение контактов, включая и половые взаимодействия, между больными и здоровыми животными [11]. Многочисленные исследования показали, что грызуны могут определить

по запаху заражённого конспецифика [1, 6, 8, 11–13]. При этом, несмотря на паразит-зависимое разнообразие клинических проявлений иммунизации, у самцов мышей, зараженных разными видами гельминтов [12], бактериями [6] и вирусом гриппа [1], наблюдается однонаправленное снижение ольфакторной привлекательности. По всей видимости, в основе данного явления лежат изменения в организме, связанные с работой иммунной системы.

Оказалось, что активация защитных функций организма тимус-зависимыми антигенами является достаточным условием для изменения хемосигналов грызунов [14]. Например, введение эритроцитов барана приводит к снижению половой привлекательности загрязненной подстилки самцов мышей и джунгарских хомячков [13, 15]. Активация врожденного или приобретенного иммунного ответа у самцов мышей или крыс снижает привлекательность их мочи для половозрелых самок, предупреждая их о заболевании [14, 15, 16].

Иммунный ответ развивается с течением времени, и его влияние на хемосигналы животных также не остается постоянным. Хемосигналы иммунизированных самцов меняются на 3-и сутки после введения чужеродного антигена, что совпадает с началом продукции антител [15, 16]. Значительное снижение запаховой привлекательности иммунизированных самцов происходит при обнаружении интенсивной пролиферации специфических клонов В-лимфоцитов [17]. Это период, когда в иммунный ответ вкладывается наибольшее количество метаболических ресурсов [18]. Развитие иммунного ответа связано с выработкой как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов. Показано, что провоспалительные цитокины преобладают в первые 1–3 дня иммунного ответа, а наработка противовоспалительных цитокинов начинает увеличиваться в последующие дни [19]. Внутрибрюшинное и внутрижелудочковое введение бактериального липополисахарида (ЛПС), а также провоспалительно-цитокина IL-1 β (цитокин Th1) приводит к снижению привлекательности запаха у крыс-самцов, но эффект ЛПС можно устранить внутрижелудочковой инъекцией противовоспалительного цитокина (Th2) — IL-10 [8].

Среди десятков работ, касающихся изучения запаховых различий между животными с разными генотипами, существует не так много работ, относящихся к поиску летучих маркёров физиологического состояния животных. На данный момент изучены различия, связанные с половым созреванием, стрессом, особенностями суточного ритма и влиянием диеты с высоким содержанием жиров [7, 20]. Эти работы демонстрируют, что летучие вещества, содержащиеся в моче мышей, отражают практически любые изменения в состоянии организма.

Летучие органические соединения в моче определяют привлекательность запаха [9, 21, 22] и различаются у животных с разными генами МНС [2, 20]. Также было показано, что воспаления различной этиологии наиболее сильно влияют на спектр ЛОС у людей [23, 24]. Все эти данные позволяют предположить, что генетически разные организмы с разными типами иммунных реакций будут различаться по профилю ЛОС и привлекательности для конспецификов, независимо от типа используемого антигена.

Иммунный ответ значительно варьируется у разных особей в том числе из-за преобладания либо Th1, клеточно-опосредованного иммунного ответа, либо Th2, гуморального ответа [25]. Чтобы учесть различия Th1 и Th2 в иммунном ответе, мы исследовали изменения ЛОС в моче и запаховую привлекательность на фоне антигенной стимуляции введением KLH у самцов инбредной линии мышей C57BL/6, которая характеризуется преимущественно Th1 типом иммунного реагирования, и инбредной линии BALB/c, у которой показано преобладание Th2 пути [26]. Для иммунизации был выбран гемоцианин улитки (KLH) — антиген, обычно используемый в качестве нереплицируемого активатора гуморального иммунного ответа у млекопитающих и птиц [14, 27].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и условия содержания

Исследованные животные, свободные от видоспецифичных патогенов (SPF-статуса), были рождены, выращены и на протяжении всего эксперимента содержались в SPF-виварии Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН (RFMEFI62119X0023). Инбредные мыши C57BL/6 (52 самок, 20 самцов) и BALB/c (55 самок, 19 самцов) в возрасте 8–10 недель к началу исследования, содержались группами по 3 особи в индивидуально вентилируемых клетках (OptiMice, Animal Care, США), со свободным доступом к воде и гранулированному корму для лабораторных грызунов. В комнатах содержания поддерживали искусственный фотопериод 14С:10Т, температуру 22–24°C и относительную влажность 30–70%. В качестве подстилочного материала использовали березовые гранулы. Корм и подстилочный материал поступали к животным после стерилизации методом автоклавирования при температуре 121°C. Воду очищали при помощи фильтрационной системы Millipore. Загрязненную подстилку из клеток самцов ежедневно добавляли в клетки самкам той же линии, для поддержания устойчивых эстральных циклов.

Иммунизация и сбор образцов мочи

Мочу собирали у интактных самцов обеих линий через 6 ч после начала световой фазы. Сразу после сбора мочи животным внутривентрально вводили либо 50 мкг гемоцианина (KLH — Keyhole Limpet Hemocyanin, Sigma), либо физиологический раствор (контроль). Через 3 дня после инъекции был взят еще один образец мочи. 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°C в течение 4–6 недель до последующего тестирования.

Газовая хроматография и масс-спектрометрия образцов мочи

Хромато-масс-спектрометрическим анализом исследовали 20 проб мочи (по 5 самцов каждой линии до и после иммунизации) 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 вials, 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 . Для анализа проб воздуха через сорбционную трубку при помощи воздушного аспиратора продували воздух со скоростью 40 мл/мин в течение 20 мин.

Хроматографирование проводили на газовом хроматографе Agilent 7890A GC с колонкой HP-5MS длиной 30 м, диаметром 0.25 мм, толщиной пленки неподвижной жидкой фазы (5% — дифенилполисилоксан, 95% — диметилполисилоксан) 0.25 мм. Условия: 3 мин при температуре 40°C , затем повышение температуры со скоростью $7^{\circ}/\text{мин}$ до 250°C . Хроматограммы записывали в режиме полного ионного тока в диапазоне масс 30 — 500. 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.

Поведенческое тестирование

Тестируемую мочу самцов размораживали в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее подготавливали стимул: 20 мкл мочи наносили на

фильтровальную бумагу размером 5 мм × 30 мм 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 линией.

За сутки до тестирования самок рассаживали индивидуально. При тестировании стимул помещали в угол домашней клетки животного, на расстоянии по 5 см от ближайших стенок, закрепляя прищепками на крышке клетки таким образом, чтобы мышь могла дотянуться до кончика пипетки для обнюхивания. Тестирование проводили в течение 10 мин, в темную фазу при красном освещении, результаты записывали на видеокамеру. Каждый стимул предъявляли трем разным самкам для увеличения надежности получаемых статистических данных. Каждая самка получила только один образец и участвовала в тестировании только один раз. Видеозаписи анализировали при помощи авторской программы, отмечая время и количество актов обнюхивания образца, груминга и рытья подстилки.

Сразу после каждого ольфакторного тестирования у самок определяли стадию эстрального цикла [28], так как известно, что стадия цикла самки может оказать влияние на её поведение в ольфакторных тестах [3]. Полученные данные центрировали, вычитая из времени обнюхивания каждой самки среднегрупповое значение времени обнюхивания, рассчитанное для каждой из 4-х стадий цикла и прибавляя среднее, рассчитанное без учета стадии цикла. Аналогичное преобразование проводили для груминга и рытья подстилки.

Статистический анализ

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. Все полученные в исследовании зависимые переменные оказались нормально распределенными. Равенство дисперсий анализировали с помощью критерия Левене, который показал однородность дисперсий для величин пиков химических соединений ($p > 0.05$). Самки двух линий достоверно отличались по дисперсии поведенческих признаков (время обнюхивания, рытья подстилки и груминга), тогда как внутри линий дисперсия исследованных групп не различались.

Относительное содержание ЛОС в пробах мочи и воздухе лабораторного помещения сравнивали с помощью t-критерия Стьюдента. Изменения в со-

держании отдельных компонентов анализировали при помощи дисперсионного анализа с повторными измерениями (ANOVA Repeated measures). 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 [29]. PLS DA строит модель линейной регрессии, проецируя переменные в новое пространство, где Y является категориальной переменной [30]. Затем проводили двухфакторный дисперсионный анализ со значениями Y в качестве зависимой переменной, чтобы оценить распределение экспериментальных групп в пространстве осей.

Для анализа результатов поведенческого тестирования использовали двухфакторный дисперсионный анализ, с факторами «генотип» и «иммунизация». Апостериорные сравнения проводили при помощи критерия Тьюки (HSD-test). Поскольку количество и продолжительность поведенческих актов достоверно коррелировали друг с другом (обнюхивание $r = 0.85$, $p < 0.001$; груминг $r = 0.67$, $p < 0.001$; рытье подстилки $r = 0.94$, $p < 0.001$), в последующем анализе использовали только продолжительность данных актов. Для оценки взаимосвязей между изучаемыми признаками использовали коэффициент корреляции Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поведенческая дискриминация стимулов от контрольных и антиген-стимулированных самцов

Двухфакторный дисперсионный анализ данных ольфакторного теста показал, что реакции самок мышей BALB/c значительно отличались от самок мышей C57BL/6 по всем трем параметрам поведения, оцененным в ольфакторном тесте (табл. 1).

Самки линии BALB/c тратили больше времени на обнюхивание обонятельного стимула, чем C57BL/6 (рис. 1). Однако самки C57BL/6 демонстрировали более продолжительное копание и груминг по сравнению с самками мышей BALB/c. При этом иммунный статус самца, от которого был получен образец мочи, достоверно влиял на продолжительность обнюхивания стимула самками BALB/c ($p = 0.026$, HSD-тест): самки тратили меньше времени на обнюхивание обонятельных стимулов от иммунизированных самцов, чем от контрольных самцов (рис. 1). В то же время иммунный статус самца достоверно влиял на продолжительность груминга у самок линии C57BL/6 ($p = 0.030$, HSD-тест): самки тратили меньше времени на груминг в тестах со стимулом от иммунизированных самцов (рис. 1). Взаимодействие линии и иммунного статуса не оказалось статистически значимым ни по одному из изученных признаков (табл. 1).

Изменение летучих компонентов после иммунизации

В отдельных пробах мочи было выявлено от 34 до 55 ЛОС (рис. 2), многие из них присутствовали также в пробах воздуха лабораторных помещений как летучие продукты метаболизма мышей и человека. Поэтому дальнейший анализ проводился только для ЛОС, уровни которых были значимо выше, чем в контрольных пробах воздуха ($p < 0.05$, t -критерий Стьюдента). Тридцать таких соединений были идентифицированы для использования при анализе ЛОС в многомерном пространстве с помощью PLS DA. Площади пиков отдельных ЛОС рассчитывали, как процент от общей площади пиков всех 30 соединений.

Анализ распределения индивидуальных значений в многомерном пространстве по осям Y_1 и Y_2 показал неперекрывающиеся облака ЛОС мочи самцов линий BALB/c и C57BL/6 (рис. 3). Облака иммунизированных и неиммунизированных самцов перекрывались, но были выявлены значимые влияния факторов линии и иммунизации на

Таблица 1. Влияние на поведение самок генотипа и иммунного статуса донора мочи (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA)

	Время обнюхивания		Время рытья подстилки		Время груминга	
	$F_{(1,103)}$	p	$F_{(1,103)}$	p	$F_{(1,103)}$	p
Линия	102.58	< 0.001	10.27	0.002	9.74	0.002
Иммунный статус самца — донора мочи	5.65	0.019	0.65	0.421	7.66	0.007
Взаимодействие факторов	1.92	0.097	0.84	0.362	1.48	0.227

Примечание: жирным выделены достоверные отличия при $p < 0.05$.

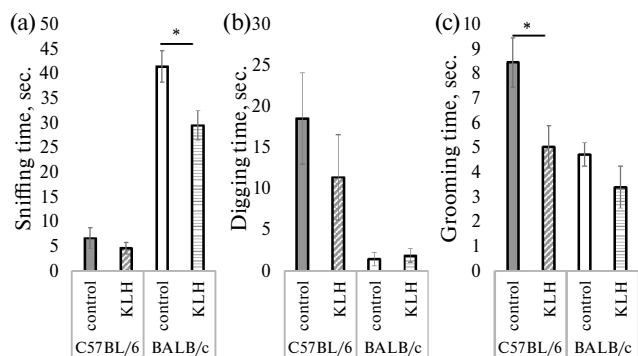


Рис. 1. Поведенческие реакции на запах мочи контрольных и антиген-стимулированных самцов (KLH) у самок линий BALB/c ($n = 37$ и $n = 18$, соответственно) и C57BL/6 ($n = 33$ и $n = 19$, соответственно): (a) — время обнюхивания, (b) — время рытья подстилки, (c) — время груминга. * — $p < 0,05$ по сравнению с реакцией на мочу контрольных самцов, HSD-test.

средние значения координат осей Y1 и Y2, используя двухфакторный дисперсионный анализ. Для оси Y1 наблюдалось значимое влияние генотипа ($F_{(1,16)} = 15.8, p = 0.001$) и иммунизации ($F_{(1,16)} = 11.3, p = 0.004$). Для оси Y2 также наблюдалось значимое влияние генотипа ($F_{(1,16)} = 17.79, p < 0.001$) и иммунизации ($F_{(1,16)} = 11.06, p = 0.004$). Взаимодействия не были значимыми ни для оси Y1 ($F_{(1,16)} = 0.02, p = 0.890$), ни для оси Y2 ($F_{(1,16)} = 0.69, p = 0.420$).

Таким образом, используя данный метод анализа, мы наблюдаем однонаправленное достоверное изменение компонентного состава мочи самцов при иммунизации как линии C57BL/6, так и BALB/c. Выбранная математическая модель позволяет дискриминировать образцы на основе запаха всей смеси в целом.

Анализируя изменение каждого отдельного пика в отдельности, из 30 соединений мы наблюдали достоверное увеличение относительных концентраций 4 ЛОС: 1) нонанала, 2) 2-втор-бутил-4,5-дигидротиазола (SBT), 3) [1,4,5]-оксидиэпана и 4) бензотиазола у самцов мышей обеих исследуемых линий через 3 дня после иммунизации (табл.2, рис. 4).

Содержание феромона SBT было выше в моче контрольных самцов линии C57BL/6 по сравнению с мочой самцов линии BALB/c. После иммунизации данное соотношение сохранялось (табл. 2). Индивидуальные реакции каждого животного на иммунизацию приведены на рис. 4.

Содержание всех 4 летучих компонентов мочи одинаково возрастало у животных обеих исследуемых линий после иммунизации. Среди остальных проанализированных ЛОС не было зафиксировано достоверно снижающихся или изменяющихся только у самцов одной из линий.

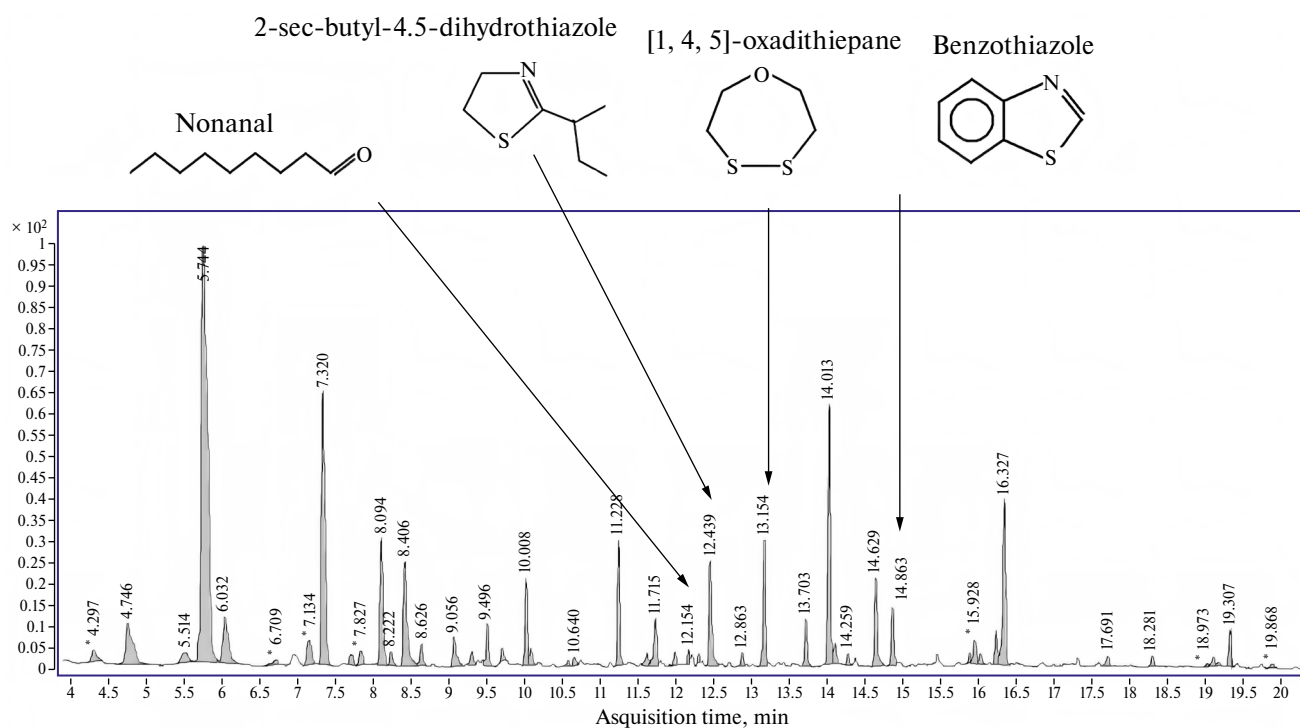


Рис. 2. Пример хроматограммы ГХ-МС контрольного самца линии BALB/c. Высота пиков, указанных выше четырех летучих органических соединений, значимо увеличивается у иммунизированных животных по сравнению с контрольными образцами.

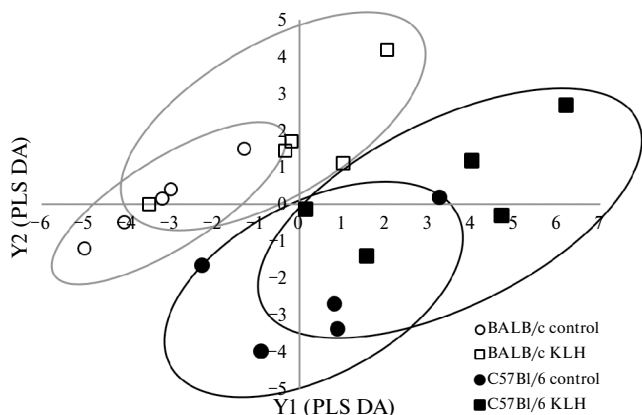


Рис. 3. Распределение отдельных паттернов ЛОС в пространстве осей Y1 и Y2 (PLS DA). Точки представляют самцов мышей линий C57BL/6 и BALB/c до (контроль) и через 3 дня после (KLH) введения антигена.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Иммунизация вызывает значительные изменения в профилях ЛОС мочи самцов мышей. Поиск различий в многомерном пространстве при помощи PLS DA дает неперекрывающиеся облака для двух линий. Однако, эти облака все же перекрываются для иммунизированных и неиммунизированных мышей, тем не менее, для самцов обеих исследуемых линий этот сдвиг оказывается достоверным и однонаправленным. Анализ изменения отдельных хроматографических пиков показывает статистически значимое повышение содержания четырех ЛОС (нонаналь, 2-втор-бутил-4,5-дигидротиазол, [1,4,5]-оксидитиозпан, бензотиазол), происходящее на третий день после иммунизации. Эти изменения также оказались однонаправленными — мы зарегистрировали увеличение каждого из 4 компонентов как у самцов мышей линии BALB/c, так и C57Bl/6. При этом не было зарегистрировано отдельных соединений, содержание которых менялось бы у одной из линий и не изменялось у другой. Следовательно, изменения в экскреции зарегистрированных ЛОС протекают по одной и той же закономерности как у

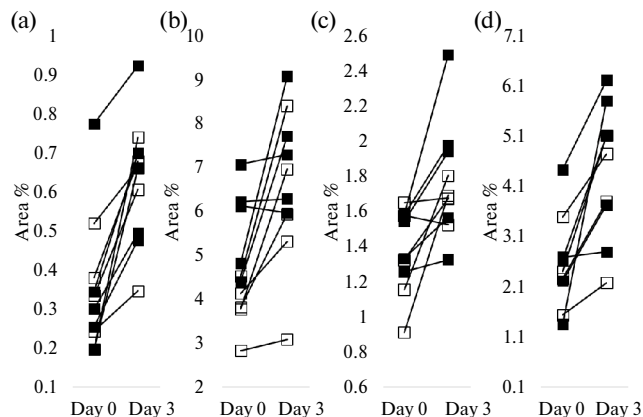


Рис. 4. Изменения относительных концентраций 4 соединений в моче иммунизированных самцов. Черные квадраты — самцы C57BL/6, белые квадраты — самцы BALB/c. (a) — Нонаналь, (b) — 2-втор-бутил-4,5-дигидротиазол, (c) — [1,4,5]-оксидитиозпан, (d) — Бензотиазол.

мышей C57BL/6, характеризующихся преобладанием клеточного (Th1) иммунного ответа, так и у мышей BALB/c, характеризующихся преобладанием гуморального (Th2) иммунного ответа [25, 26]. Хотя механизмы, объясняющие наблюдаемые изменения, требуют дальнейшего изучения профиля ЛОС, наши результаты подчеркивают, что активация иммунной реакции оказывает множественное влияние на обмен веществ, в том числе на состав выделяемых метаболитов, которые могут служить как диагностическими маркерами заболеваний [23, 24], так и индикаторами иммунного статуса, которые могут распознаваться другими животными [16]. Причем эти изменения носят однонаправленный характер независимо от преобладания типа иммунного реагирования, по крайней мере, на третьи сутки после иммунизации.

Три из четырех перечисленных выше ЛОС могут иметь сигнальное значение для мышей. В частности, 2-втор-бутил-4,5-дигидротиазол (SBT) является половым феромоном самцов мышей [31–33]. Интересно, что в ранних исследованиях SBT был

Таблица 2. Влияние на содержание отдельных ЛОС генотипа и иммунного статуса донора мочи (ANOVA Repeated measures)

	Нонаналь		SBT		[1,4,5] Оксидитиозпан		Бензотиазол	
	F _(1,8)	p	F _(1,8)	p	F _(1,8)	p	F _(1,8)	p
Линия	0.17	0.690	6.90	0.030	1.25	0.295	0.73	0.419
Иммунизация	32.06	0.000	10.34	0.012	12.03	0.008	20.96	0.002
Взаимодействие факторов	0.00	0.959	0.27	0.618	0.05	0.824	0.45	0.521

Примечание: жирным выделены достоверные отличия при $p < 0.05$.

обнаружен как половой феромон, привлекающий половозрелых самок. Однако этот эффект был показан при связывании SBT с основными белками мочи и возможностью прямого контакта с образцом в ольфакторных тестах. Комплекс SBT с белком-носителем достигает обонятельных рецепторов при прямом контакте носа мыши с грязной подстилкой или мочевой меткой, вызывая положительную реакцию [31]. При этом показано воздействие свободного SBT как феромона тревоги [34]. Будучи летучим соединением, он распознается нейронами ганглия Грюнберга, расположенного непосредственно у входа в полость носа. Активация этих нейронов запускает врожденное поведение страха у мышей обоих полов [34, 35]. В проведенных нами тестированиях была зафиксирована реакция мышей именно на летучие соединения.

Нонаналь ранее уже был показан как диагностический маркер развития различных заболеваний. Зафиксировано увеличение его экскреции при лейшманиозе [36], инфицировании плазмодием [37], при заболевании COVID-19 [38], развитии рака [37] и диабетических нарушениях [39]. Также нонаналь был зафиксирован в моче самок мышей, причем, только в стадии метэструса, что снижало привлекательность такой мочи для самцов [40].

Бензотиазол и его производные используются в качестве предшественников фармакологических средств нейропротекторного, антибактериального, противоаллергического, иммунодепрессивного и противовирусного действия. Показано воздействие некоторых производных бензотиазола на развитие иммунологических реакций, в том числе синтез цитокинов и пролиферацию Т-клеток иммунной системы [41]. Также показано негативное влияние бензотиазола на уровень андрогенов [42], что опосредованно может снижать привлекательность особей с повышенным содержанием бензотиазола в моче.

Однако, не стоит упускать из виду возможный механизм комплексного восприятия запаха, при котором реакция реципиента зависит не столько от содержания конкретных отдельных компонентов, сколько от относительного содержания их групп [7, 20]. Общая композиция всех 30 исследованных соединений также отличалась у иммунизированных и контрольных самцов в нашем исследовании.

Как и наблюдалось в предыдущих тестах бинарного выбора, проведенных для аутбредных линий мышей [6, 14], самки BALB/c в нашем исследовании тратили меньше времени на обнюхивание образцов мочи, собранных у иммунизированных самцов на 3-й день, по сравнению с образцами, контрольных животных. При этом мы не наблюдали снижения времени обнюхивания образца у самок C57Bl/6. Известно, что мыши исследуемых линий существенно различаются по чувствительности

к запаховым стимулам: мыши линии C57BL/6 на два порядка слабее реагировали на предъявляемые запахи, чем мыши линии BALB/c [43]. В нашей работе зафиксирован значительно меньший интерес к обнюхиванию стимула самками линии C57BL/6: среднее время обнюхивания было меньше на порядок и не была зарегистрирована дискриминация по этому показателю образцов мочи контрольных и антигенстимулированных самцов, для которых была обнаружена разница в компонентном составе. Тем не менее, самки линии C57BL/6 характеризовались большим, чем самки BALB/c временем, затраченным на груминг и рытье подстилки. При этом было обнаружено достоверно меньшее время груминга в тестах с мочой иммунизированных самцов. Известно, что груминг в ольфакторном тестировании мочи конспецифика противоположного пола отражает интерес к потенциальному взаимодействию [44, 45]. Так самцы демонстрировали большую продолжительность груминга в тестах с мочой эстральных самок, а при кастрации время груминга значительно снижалось независимо от типа стимула [44]. Самки C57BL/6 также распознали иммунизированных самцов, но их реакция была выражена другим типом поведения.

Таким образом, наши данные подтверждают предыдущие исследования, показавшие, что у мышей на начальных этапах антителообразования, т.е. на 3-и сутки после введения чужеродного антигена, наблюдается поведенческая дискриминация между контрольными и иммунизированными обонятельными раздражителями. При этом различное восприятие запахов контрольных и иммунизированных самцов взрослыми самками имеет химическую основу. Установлены статистически значимые различия между мочой контрольных и иммунизированных самцов мышей по общей композиции ЛОС и общим уровням 4 из этих соединений, изменяющихся однонаправленно независимо от типа иммунного реагирования у мышей разных линий.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данное исследование проведено в соответствии с международными правилами содержания и обращения с животными (Директива Европейского сообщества от 22 сентября 2010 г. — Directive 2010/63/EU) и одобрено межинститутской биоэтической комиссией Института Цитологии и Генетики СО РАН (протокол 8 от 19.03.2012 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-14-00179.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием животных ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддерживаемых в рамках бюджетного проекта № FWNR-2022-0004.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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)
2. Penn DJ (2002) The scent of genetic compatibility: sexual selection and the major histocompatibility complex. *Ethology* 108: 1–21. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.2002.00768.x>
3. Koyama S (2016) Primer Effects by Murine Pheromone Signaling: Pheromonal Influences on Reproductive Conditions. Springer.
4. Dougherty LR (2020) Designing mate choice experiments. *Biol Rev* 95: 759–781. <https://doi.org/10.1111/brv.12586>
5. Thom MD, Stockley P, Jury F, Ollier WE, Beynon RJ, Hurst JL (2008) The direct assessment of genetic heterozygosity through scent in the mouse. *Cur Biol* 18: 619–623. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.03.056>
6. Zala SM, Bilak A, Perkins M, Potts WK, Penn DJ (2015) Female house mice initially shun infected males, but do not avoid mating with them. *Behav Ecol Sociobiol* 69: 715–722. <https://doi.org/10.1007/s00265-015-1884-2>
7. Schaefer ML, Wongravee K, Holmboe ME, Heinrich NM, Dixon SJ, Zeskind JE, Kulaga HM, Brereton RG, Reed RR, Trevejo JM (2010) Mouse urinary biomarkers provide signatures of maturation, diet, stress level, and diurnal rhythm. *Chemical Senses* 35: 459–471. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjq032>
8. Arakawa H, Arakawa K, Deak T (2010) Sickness-related odor communication signals as determinants of social behavior in rat: A role for inflammatory processes. *Horm Behav* 57: 330–341. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.01.002>
9. 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 biology* 16: 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0512-9>
10. Khotkina 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 Genetic Breed* 27: 480–487. <https://doi.org/10.18699/VJGB-23-58>
11. Beltran-Bech S, Richard FJ (2014) Impact of infection on mate choice. *Animal Behaviour* 90: 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.01.026>
12. Kavaliers M, Colwell DD (1995) Discrimination by female mice between the odours of parasitized and non-parasitized males. *Proc Royal Soc London. Ser B: Biol Sci* 261: 31–35. <https://doi.org/10.1098/rspb.1995.0113>
13. Новиков ЕА, Петровский ДВ, Кондратьев ЕЮ, Литвинова ЕА, Мושкин МП (2004) Поведение самцов джунгарского хомячка, *phodopus sungorus* (rodentia, muridae), при прямом или ольфакторном контактах с антиген-стимулированными особями. *Зоол журн* 83: 486–492. [Novikov EA, Petrovskij DV, Kondratyuk EYu, Litvinova EA, Moshkin MP (2004) Povedenie samcov dzhungarskogo homyachka, *phodopus sungorus* (rodentia, muridae), pri pryamom ili ol'faktornom kontaktah s antigenstimulirovannymi osobyami. *Zool Zhurn* 83: 486–492. (In Russ)].
14. Gerlinskaya LA, Shnayder EP, Dotsenko AS, Maslennikova SO, Zavjalov EL, Moshkin MP (2012) Antigen-induced changes in odor attractiveness and reproductive output in male mice. *Brain Behav Immun* 26: 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.11.010>
15. Akulov AE, Petrovskii DV, Moshkin MP (2009) Antigen stimulation modifies social behavior and chemosignals in male laboratory mice. *Zhurn Vyshei Nervn Deiat Im IP Pavlova* 59: 335–343.
16. Arakawa H, Arakawa K, Deak T (2009) Acute illness induces the release of aversive odor cues from adult, but not prepubertal, male rats and suppresses social investigation by conspecifics. *Behav Neurosci* 123: 964–978. <https://doi.org/10.1037/a0017114>
17. Conger JD, Lewis GK, Goodman JW (1981) Idiotype profile of an immune response. I. Contrasts in idiotypic dominance between primary and secondary responses and between IgM and IgG plaque-forming cells. *J Exp Med* 153: 1173–1186. <https://doi.org/10.1084/jem.153.5.1173>
18. Romanyukha, AA, Rudnev, SG, Sidorov IA (2006) Energy cost of infection burden: An approach to understanding the dynamics of host–pathogen interactions. *J Theor Biol* 241: 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2005.11.004>
19. Zawislak C, Beaulieu A, Loeba G, Karoa J, Cannera D, Bezmanic N, Lanierc L, Rudenskaya A, Suna J (2013) Stage-specific regulation of natural killer cell homeostasis and response against viral infection by microRNA-155. *Proc Nat Acad Sci* 110: 6967–6972. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304410110>
20. 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>

21. *Luzynski KC, Nicolakis D, Marconi MA, Zala SM, Kwak J, Penn DJ* (2021) Pheromones that correlate with reproductive success in competitive conditions. *Sci Rep* 11: 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01507-9>
22. *Penn DJ, Zala SM, Luzynski KC* (2022) Regulation of sexually dimorphic expression of major urinary proteins. *Front Physiol* 13: 1–23. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.822073>
23. *Miekisch W, Schubert J, Noeldge-Schomburg G* (2004) Diagnostic potential of breath analysis — focus on volatile organic compounds. *Clin Chim Acta* 347: 25–39. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.04.023>
24. *Boots AW, Berkel JJ, Dallinga JW, Smolinska A, Wouters EF, Schooten FJ* (2012) The versatile use of exhaled volatile organic compounds in human health and disease. *J Breath Res* 6: 1–22. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/6/2/027108>
25. *Mejri N, Franscini N, Rutti B, Brossard M* (2001) Th2 polarization of the immune response of BALB/c mice to *Ixodes ricinus* instars, importance of several antigens in activation of specific Th2 subpopulations. *Parasite Immunol* 23: 61–69. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2001.00356.x>
26. *Darville T, Andrews Jr CW, Sikes JD, Fraley PL, Braswell L, Rank RG* (2001) Mouse strain-dependent chemokine regulation of the genital tract T helper cell type 1 immune response. *Infection Immun* 69: 7419–7424. <https://doi.org/10.1128/iai.69.12.7419-7424.2001>
27. *Harris JR, Markl J* (1999) Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron* 30(6):597–623. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(99\)00036-0](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(99)00036-0)
28. *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>
29. *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. *Analytic Chim Acta* 879: 10–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.012>
30. *Brereton RG, Lloyd GR* (2014) Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *J Chemometric* 28: 213–225. <https://doi.org/10.1002/cem.2609>
31. *Jemiolo B, Harvey S, Novotny M* (1986) Promotion of the Whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. *Proc Nat Acad Sci* 83: 4576–4579. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.12.4576>
32. *Novotny MV, Ma W, Wiesler D, Zidek L* (1999) Positive identification of the puberty-accelerating pheromone of the house mouse: the volatile ligands associating with the major urinary protein. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biol Sci* 266: 2017–2022. <https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0880>
33. *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 Rep* 7: 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02259-1>
34. *Brechbühl J, Moine F, Klaey M, Nenniger-Tosato M, Hurni N, Sporkert F, Giroud C, Broillet MC* (2013) Mouse alarm pheromone shares structural similarity with predator scents. *Proc Nat Acad Sci* 110: 4762–4767. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214249110>
35. *Bigdai EV, Samoilo V, Sinegubov AA* (2021) The Mechanisms of Chemoreception and Thermoreception in the Grueneberg Ganglion. *Biophysics* 66: 91–97. <https://doi.org/10.1134/S0006350921010139>
36. *Magalhães-Junior JT, Mesquita PRR, Oliveira WFDS, Oliveira FS, Franke CR, Rodrigues FDM, Andrade JB, Barrouin-Melo SM* (2014) Identification of biomarkers in the hair of dogs: new diagnostic possibilities in the study and control of visceral leishmaniasis. *Analyt Bioanal Chem* 406: 6691–6700. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8103-2>
37. *Chai HC, Chua KH* (2021) The potential use of volatile biomarkers for malaria diagnosis. *Diagnostics* 11: 1–11. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11122244>
38. *Berna AZ, Odom John AR* (2022) Breath metabolites to diagnose infection. *Clinical Chemistry* 68: 43–51. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvab218>
39. *Holland ML, Rhodes GR, Wiesler D, Novotny M* (1984) Chromatographic profiling of urinary volatile and organic acid metabolites of normal and diabetic C57BL/Ks mice. *J Chromatograph B: Biomed Sci Appl* 306: 23–37. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)80866-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)80866-X)
40. *Achiraman S, Archunan G* (2006) 1-Iodo-2methylundecane, a putative estrus-specific urinary chemo-signal of female mouse (*Mus musculus*). *Theriogenology* 66: 1913–1920. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.05.010>
41. *Khan KM, Mesaik MA, Abdalla OM, Rahim F, Soomro S, Halim SA, Mustafa G, Ambreen N, Khalid AS, Taha M, Perveen S, Alam MT, Hameed A, Ul-Haq Z, Ullah H, Rehman ZU, Siddiqui RA, Voelter W* (2016) The immunomodulation potential of the synthetic derivatives of benzothiazoles: Implications in immune system disorders through in vitro and in silico studies. *Bioorganic Chem* 64: 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.11.004>
42. *Li Y, Cai Z, Li R, Leng P, Liu H, Liu J, Mahai G, Li Y, Xu S, Xia W* (2022) Associations of benzotriazoles and benzothiazoles with estrogens and androgens among pregnant women: a cohort study with repeated measurements. *Sci Total Environ* 838: 155998. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155998>
43. *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)
44. *Achiraman S, Ganesh DS, Kannan S* (2014) Response of male mice to odours of female mice in different stages of oestrous cycle: Self-grooming behaviour and the effect of castration.
45. *Ferkin MH* (2018) Odor communication and mate choice in rodents. *Biology* 7: 1–18. <https://doi.org/10.3390/biology7010013>

IMMUNIZATION OF MALE BALB/C AND C57BL/6 MICE SIMILAR MODULATES CHEMICAL SIGNALS DETECTED IN BOTH CHROMATOGRAPHIC AND BEHAVIORAL TESTS

A. S. Khotskina^{a, #}, Y. V. Patrushev^b, D. I. Yusupova^a, L. A. Gerlinskaya^a, D. V. Petrovskii^a,
M. P. Moshkin^a and E. L. Zavjalov^a

¹ *The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia*

² *The Federal Research Center Boreskov Institute of Catalysis of the Siberian Branch Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia*

[#] *e-mail: dotcenko@bionet.nsc.ru*

The odor plays a key role in communication between animals and the choice of a mate. The odor of urine of males becomes less attractive to mature females after infection or activation of the immune system. The development of the immune response in the early stages is related with the production of both pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. To investigate the chemical basis of the observed differences and examine the influence of female interactions with the odor of antigen-treated males, we immunized males of inbred BALB/c (Th1) and C57BL/6 (Th2) mice with hemocyanin (KLH). For females of both tested strains, the attraction of the odor of male urine collected 3 days after immunization was lower compared with the odor of control males. Herewith, BALB/c females sniffed the urine of immunized males less frequently, and C57BL/6 females demonstrated a shorter duration of grooming in olfactory tests with urine of immunized males. The altered response of females to the odor of male urine collected on day 3 after KLH injection matched with antigen-induced modulation of relative levels of volatile organic compounds (VOCs) detected in urine samples by gas chromatography and mass spectroscopy (GC-MS). In males of both strains, after KLH injection, an increase in the content of nonanal, benzothiazole, as well as 2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazole, and [1,4,5]-oxadithiepane was shown. At the same time, no compounds were found, the content of which changes in different directions in the urine of males after immunization, depending on the strain of the animal.

Keywords: Mice immunization, mating preference, urine odor, olfactory test, nonanal, benzothiazole, 2-sec-butyl-4,5-dihydro-thiazole, SBT