

© Т.С. Глинин¹, П.А. Старшова¹,
В.А. Шубина¹, М.В. Анисимова²,
А.А. Бондаренко¹, М.П. Мошкин²,
Е.В. Даев¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург;

² Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск

Изучали влияние хемосигналов мочи самцов домашней кошки (*Felis catus* L.) на стабильность генома клеток костного мозга и уровень кортикостерона в плазме крови у мышей-реципиентов (*Mus musculus* L.). Показано, что двухчасовое предоставление летучих хемосигналов приводит к увеличению частоты клеток костного мозга с поврежденной ДНК, а 24-часовая экспозиция с хемосигналами приводит к увеличению частоты хромосомных aberrаций в этих клетках. Таким образом, в работе впервые продемонстрирован эффект индукции геномной нестабильности в клетках костного мозга домовой мыши хемосигналами хищника. При этом ни через 30, ни через 60 минут после начала воздействия хемосигналами мочи кошек не выявлено увеличения уровня кортикостерона в плазме крови. Обсуждаются физиологические факторы, способствующие накоплению повреждений ДНК в клетках костного мозга, а также отдаленные последствия действия этих хемосигналов на стабильность генома.

✿ **Ключевые слова:** запах хищника; дестабилизация генома; кортикостерон; хромосомные aberrации; ДНК-кометы; костный мозг; *Felis catus*; мышь.

Поступила в редакцию 22.11.2016
Принята к публикации 07.03.2017

ЗАПАХ ХИЩНИКА ДЕСТАБИЛИЗИРУЕТ ГЕНОМ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА МЫШИ

ВВЕДЕНИЕ

Взаимодействие «хищник — жертва» является классической моделью для изучения врожденных поведенческих и физиологических реакций у животных [1, 2]. В процессе длительного сосуществования и генетической коэволюции у видов-«жертв» в ходе эволюции развивается целый ряд защитных механизмов, включающих системы распознавания хищников, и специализированное поведение избегания и защиты [3, 4]. У грызунов одним из главных механизмов распознавания хищников является обоняние. В частности, хемосигналы хищников вызывают врожденную реакцию избегания у крыс, мышей и полевок [5]. Кроме того, показано, что моча домашней кошки может вызывать изменения уровня различных гормонов в плазме крови [6–8] и увеличение частоты генетических нарушений в мейотически делящихся клетках грызунов [9]. Ранее было показано, что индуцировать дестабилизацию генома могут даже внутривидовые хемосигналы. Например, стресс-феромон — 2,5-диметилпиразин, выделяемый самками мышей в условиях переуплотненного содержания [10], увеличивает частоту хромосомных aberrаций в клетках костного мозга и семенников самцов-реципиентов своего вида [11, 12].

Можно полагать, что некоторые межвидовые хемосигналы (особенно хищников) оказывают более сильное стрессорное действие на организм потенциальной «жертвы». Тем не менее влияние таких факторов на стабильность генома соматических клеток, как и пути их действия на животных-реципиентов, остаются неизученными.

Целью данной работы было изучение влияния хемосигналов мочи самцов домашней кошки на стабильность генома клеток костного мозга и уровень кортикостерона в плазме крови самцов мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании были использованы самцы высокоинбредной линии СВА, полученные из питомника Рапполово и из Центра генетических ресурсов ФИЦ ИЦиГ СО РАН в возрасте от 2 до 4 месяцев. После группировки (по 5–6 животных в группе) и десятидневной адаптации к условиям содержания в виварии биологического факультета СПбГУ или Центра генетических ресурсов ФИЦ ИЦиГ СО РАН было проведено два эксперимента по выявлению физиологических и генетических эффектов хемосигналов мочи кошки.

Ольфакторное воздействие

Действующим фактором служили летучие хемосигналы мочи самцов домашней кошки (*Felis catus*) (в дальнейшем сокращенно — МК (моча котов)). Донорами мочи служили два половозрелых беспородных самца в возрасте полутора лет, диета которых включала мясные продукты. Сразу после сбора мочи ее замораживали и хранили до использования не более двух месяцев при температуре –20 °С.

Для воздействия МК на решетках клеток с мышами с внешней стороны размещалась перфорированная капсула с фильтровальной бумагой, содержащей 100 мкл смеси мочи обоих котов, разбавленной 400 мкл дистиллированной воды. В качестве контроля использовали капсулу с дистиллированной водой. Прямой контакт с веществом исключался. Таким образом, воздействие осуществлялось только летучими веществами.

Эксперимент 1. Изучение влияния мочи котов на стабильность генома клеток костного мозга

Для анализа стабильности генома после запахового воздействия хемосигналами мочи кошки было сформировано четыре экспериментальные группы по пять мышей в каждой. Особей первой и второй групп подвергали 2- и 24-часовому воздействию МК. Животным двух соответствующих контрольных групп предоставляли дистиллированную воду. Для проверки работоспособности теста ДНК-комет еще двум мышам за 6 часов до взятия костного мозга была сделана инъекция акриламида (100 мг/кг), что, по литературным данным, приводит к возникновению повреждений ДНК [13].

Сразу после завершения экспозиции с хемосигналами мышей забивали методом цервикальной дислокации, из бедренных костей извлекали костный мозг, используемый в дальнейшем для приготовления препаратов ДНК-комет и давленных препаратов для ана-телофазного анализа (только для мышей, подвергнутых 24-часовому воздействию).

Эксперимент 2. Изучение влияния мочи котов на уровень кортикостерона в крови

Животных рассаживали поодиночке и через два дня подвергали воздействию МК. Для каждого варианта воздействия (30- и 60-минутного) использовали по шесть самцов. На решетки клеток с контрольными животными (по шесть мышей на вариант) помещали капсулы с дистиллированной водой на аналогичные промежутки времени. После завершения экспозиции мышей забивали методом декапитации и собирали по 0,3 мл крови, которую сразу же центрифугировали при 10000 оборотах в минуту в течение 10 минут при 4 °С. Полученную плазму замораживали при температуре –70 °С и хранили для последующего анализа уровня кортикостерона.

Кометный электрофорез

Для оценки поврежденности генома клеток костного мозга проводили щелочной кометный электрофорез по стандартной методике с небольшими модификациями [14]. Образцы костного мозга помещали в 3 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ), не содержащего Ca^{2+} и Mg^{2+} , и суспензировали. Концентрацию клеток в образце определяли при помощи камеры Горяева и доводили до конечной концентрации $2-3 \times 10^5$ клеток в 1 мл. Далее 150 мкл разбавленной суспензии вноси-

ли в пробирки с 150 мкл 1,5 % раствора легкоплавкой агарозы (Type VII, Sigma-Aldrich) в ФСБ, подогретым до 38 °С (CH-100, BioSan), и ресуспензировали.

Из каждого образца костного мозга готовили два микропрепарата. С этой целью 300 мкл суспензии клеток в агарозе наносили на два предметных стекла (по 150 мкл), предварительно покрытых 1 % раствором универсальной агарозы, накрывали покровным стеклом и выдерживали 10 минут при температуре 4 °С. Далее все операции проводили при зеленом свете. После затвердевания агарозы покровные стекла осторожно удаляли, на микропрепараты наносили 150 мкл лизирующего раствора (10 мМ Tris-HCl (pH = 10), 2,5 М NaCl, 100 мМ EDTA- Na_2 , 1 % TritonX-100), предварительно охлажденного до $T = 4$ °С. Далее каждый микропрепарат накрывали полоской герметизирующей пленки (Parafilm) и инкубировали 1 час. Затем микропрепараты переносили в охлажденную до 4 °С камеру для электрофореза (CSL-COM10, Cleaver Scientific) с электрофоретическим буфером (300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA- Na_2 (pH > 13)) и инкубировали в течение 20 минут, после чего проводили электрофорез в течение 20 минут при напряженности поля 1 В/см и силе тока ~300 мА. По окончании электрофореза микропрепараты отмывали в течение 5 мин в ФСБ и фиксировали в течение 15 минут в 70 % растворе этилового спирта.

После фиксации микропрепараты высушивали и хранили до анализа при комнатной температуре. Непосредственно перед микроскопированием препараты окрашивали флуоресцирующим красителем SYBR Green I (1 : 2000 в дистиллированной воде) в течение 20 минут в темноте. Цифровые изображения с микропрепаратов получали при увеличении $\times 200$ на флуоресцентном микроскопе Axio Scope.A1 (Zeiss), совмещенном с высокочувствительной цифровой камерой (QImaging, QI Click). С полученных на каждый микропрепарат 20–30 изображений в программе Comet Score™ анализировали не менее 100 ДНК-комет. В качестве показателя поврежденности ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвосте комет. В случае если хвост кометы содержал более 5 % ДНК, то комету считали маркером повреждения ДНК исходной клетки. Ядро считали слабоповрежденным при содержании ДНК в хвосте кометы от 5 до 20 %. Если же содержание ДНК в хвосте кометы превышало 20 %, ядро считали сильно поврежденным.

Анализ хромосомных aberrаций

Для цитогенетической оценки влияния экспериментальных воздействий в делящихся клетках использовали ана-телофазный метод анализа нарушений митоза [11]. После извлечения костный мозг помещали в фиксатор Кларка (3 части 96 % этилового спирта к 1 части ледяной уксусной кислоты) и хранили до исследования. Для дальнейшего изучения костный мозг окрашивали 2 % раствором ацетоорсеина (Sigma-Aldrich) и готовили давленные препараты по стандартной методике [15].

К нарушениям относили мосты, фрагменты и отставшие хромосомы. При наличии в клетке двух и более повреждений ее относили к классу «множественные нарушения» [11]. Учитывали не менее 200 делений на стадии анафазы — телофазы на животное.

Оценка уровня кортикостерона

После разморозки образцы плазмы крови анализировали на содержание кортикостерона с помощью коммерческого набора для ИФА-анализа (Mouse Corticosterone ELISA Kit, Cusabio), следуя всем инструкциям производителей. Для определения оптической плотности использовали планшетный спектрофотометр (Bio-Rad).

Статистический анализ

В обоих экспериментах весь собранный материал был закодирован для непредвзятого получения первичных данных.

Статистическую обработку начинали с расшифровки первичных данных и их проверки на гомогенность и нормальность распределения анализируемых показателей [16]. Если распределение данных хотя бы одной группы было ненормальным, для оценки достоверности межгрупповых различий использовали критерий Манна — Уитни. В случае нормального распределения внутригрупповых данных достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка поврежденности ДНК клеток костного мозга самцов мышей линии СВА в обеих контрольных группах, выполненная методом ДНК-комет, показала, что данные гомогенны как внутри, так и между группами. Это позволило объединить все индивидуальные данные по всем животным в одну общую группу — «Контроль» (рис. 1, а; К). Общая частота поврежденных ядер у животных «Контроля» составила 15 %.

Двухчасовое воздействие летучими хемосигналами МК повышало частоту поврежденных ядер до 25 %. При этом внутрибрюшинное введение акриламида (положительный контроль) повышало частоту поврежденных ядер в клетках костного мозга самцов мышей до 71 %. После 24-часового воздействия МК достоверный эффект выявлен не был.

Раздельный анализ изменений частоты слабо- и сильно поврежденных ядер выявил достоверное увеличение обоих типов поврежденных ядер у мышей после воздействия мочой котов в течение 2 часов (рис. 1, б, в). При 24-часовом воздействии МК достоверных отличий от контроля не обнаружено.

Параллельно с кометным электрофорезом у мышей, подвергнутых 24-часовому воздействию МК, был проведен анализ генетических повреждений на хромосомном уровне (рис. 2). Оценка частоты хромосомных aberrаций

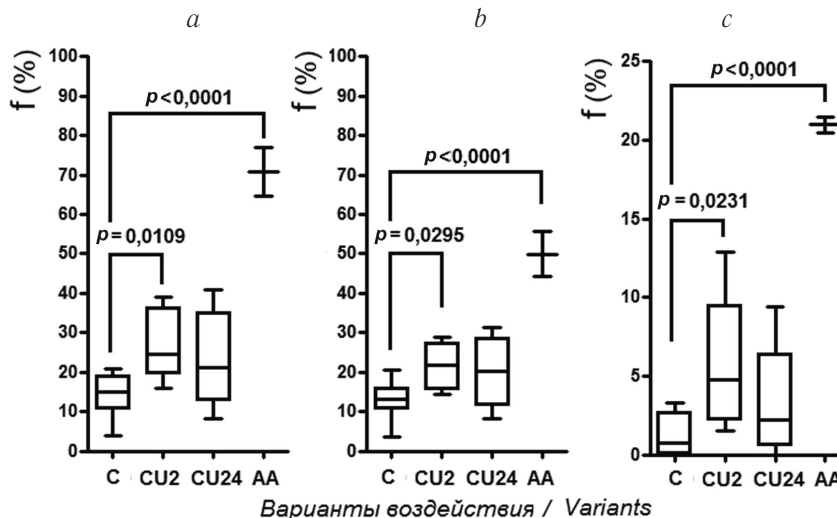


Рис. 1. Общая частота поврежденных ядер с содержанием ДНК в хвосте кометы > 5 % (а), частоты слабо- (б) и сильноповрежденных (в) ядер клеток костного мозга с содержанием ДНК в хвосте комет 5–20 % и >20 % соответственно у самцов мышей линии СВА после воздействия мочой котов. Варианты воздействия: С — контроль; CU2 и CU24 — 2- и 24-часовое воздействие мочой котов соответственно; АА — инъекция акриламида. Приведены значения медиан, границ первого и третьего квартилей, минимальное и максимальное значения, скобками сверху указаны достоверно отличающиеся варианты (критерий Манна — Уитни)

Fig. 1. (a) The total frequency of damaged cells in bone marrow of mouse CBA males with percentage of DNA in the comet tail >5%. (b) The frequency of “slightly damaged” cells with percentage of DNA in the comet tail 5-20%. (c) The frequency of “highly damaged” cells with percentage of DNA in the comet tail >20%. Variants of treatment: CU2 and CU24 — olfactory exposure with cat urine for 2 and 24 hours; C — control olfactory exposure with water; AA — acrylamide injection. The median, first and third quartiles, the minimum and the maximum values are shown (comparisons by Mann-Whitney test)

ана-телофазным методом показала, что животные внутри групп гомогенны по анализируемому показателю, а полученные данные распределены нормально.

Показано, что общая частота учитываемых типов митотических нарушений у самцов, подвергнутых 24-часовому воздействию МК, составила 4,5%, что достоверно выше (в 1,6 раза), чем у животных контрольной группы (*t*-критерий Стьюдента, $p = 0,0014$).

Анализ уровня кортикостерона в плазме крови мышшей обеих контрольных групп при крайне высокой гетерогенности индивидуальных показателей не выявил достоверных межгрупповых различий, поэтому данные были объединены (рис. 3; К). При этом не было выявлено достоверного изменения концентрации кортикостерона в плазме ни после 30, ни после 60 минут воздействия МК.

ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день проведено большое количество исследований влияния хемосигналов кошек на поведение грызунов, которые в целом демонстрируют ярко аверсивное врожденное поведение вида — «жертвы» [17–20]. При сравнительном анализе эффекта различных запахов хищника на домовую мышшь выявлен более выраженный ответ мышшей на хемосигналы кошки по сравнению, например, с запахом змеи [21], крысы [22] и лисьим феромоном триметил-тиазолином (ТМТ) в естественной концентрации [23].

Помимо поведенческих эффектов исследователи изучают рецепцию хемосигналов кошки с последующей активацией различных отделов головного мозга у мышшей-реципиентов [24]. В частности, показана активация областей гипоталамуса, ответственных за распознавание опасности [21].

Результаты наших экспериментов демонстрируют существование нового эффекта — индукции геномной нестабильности у самцов-реципиентов домовой мышши при кратковременной (двухчасовой) экспозиции с МК. Так, в клетках костного мозга выявлено повышение частоты как слабо поврежденных (содержание ДНК в хвосте кометы от 5 до 20 %), так и сильно поврежденных (содержание ДНК в хвосте кометы больше 20 %) ядер. При этом общая доля клеток с поврежденной ДНК достигает 25 %, что говорит о силе наблюдаемого эффекта — повреждения выявлены в каждой четвертой клетке костного мозга.

Сила 2-часового воздействия МК, опосредованного центральной нервной системой (ЦНС) животного-реципиента, оказывается значительно слабее влияния химического мутагена — акриламида.

После 24-часового воздействия МК достоверного отличия от контрольной группы методом ДНК-комет не выявлено. Это может говорить либо о привыкании мышши к длительному действию запахового сигнала,

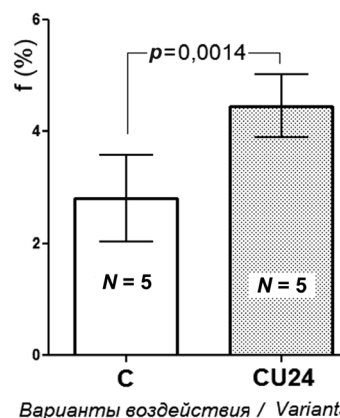


Рис. 2. Общая частота хромосомных aberrаций (Mean ± 95 % SD) в делящихся клетках костного мозга самцов мышшей линии СВА после 24-часового воздействия летучими хемосигналами мочи котов. С — контроль (вода); CU 24 — 24-часовое воздействие мочой котов; для выявления различий использовался *t*-критерий; N — число животных в группе

Fig. 2. Total frequency of chromosome aberrations (Mean ± 95%SD) in dividing bone marrow cells of mouse CBA males after 24 hour treatment by volatile cat urine chemosignals. C — control treatment with water, CU24 — 24 hour exposure with cat urine volatile chemosignals, N — number of animals in group (comparisons by *t*-test)

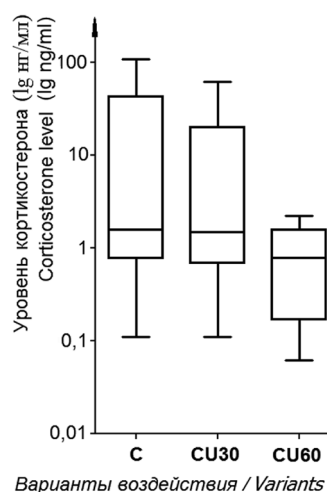


Рис. 3. Уровень кортикостерона в плазме крови самцов мышшей линии СВА после воздействия хемосигналами мочи котов. С — контроль; CU30 и CU60 — 30 и 60-минутное воздействие хемосигналами мочи котов, соответственно. Для каждого варианта отмечены медианы, границы первого и третьего квартилей, минимальное и максимальное значения (критерий Манна — Уитни, $p > 0,1$)

Fig. 3. The level of whole plasma corticosterone in mouse CBA males after treatment by volatile compounds of cat urine. C — control; CU30 and CU60 — 30 and 60 minutes exposure with cat urine volatile chemosignals respectively. The median, first and third quartiles, the minimum and the maximum values are shown (Mann-Whitney test, $p > 0,1$)

либо о наличии первичного всплеска геномных нарушений в ответ на появление МК с дальнейшей репарацией этих повреждений. О стрессорной природе хемокоммуникационного воздействия и о роли репарационных механизмов в формировании ответной реакции на МК может говорить схожий эксперимент, в ходе которого мышей подвергали действию динамического стрессора (пятиминутное плавание в холодной воде). Это привело к повышению уровня двунитевых разрывов ДНК в кардиомиоцитах через час после воздействия и полному восстановлению уровня повреждений до контрольного через 24 часа [25].

Тем не менее после 24-часового воздействия МК было обнаружено достоверное увеличение количества хромосомных aberrаций в делящихся клетках костного мозга по сравнению с контролем. Хромосомные aberrации (мосты и фрагменты), наблюдаемые в анафазе или телофазе, являются результатом неправильной репарации повреждений ДНК на стадии интерфазы и/или ошибок репликации [26]. То есть повреждающее событие, приводящее к формированию aberrации, происходит задолго до его реализации на уровне митотической хромосомы. Учитывая среднюю продолжительность клеточного цикла, составляющую 23–24 часа для клеток костного мозга мыши [27], можно предположить, что наблюдаемое увеличение частоты хромосомных aberrаций является следствием повреждений ДНК, часть из которых выявляется методом ДНК-комет уже через 2 часа после начала воздействия МК на самцов мышей.

Повреждения ДНК, выявляемые при анализе комет через 2 часа после начала предоставления МК, индуцированы какими-то внутриорганизменными триггерами нейроэндокринной природы, не только участвующими в передаче хемокоммуникационного сигнала в ЦНС, но и способными передавать команды ЦНС периферийным органам-мишеням, в том числе клеткам костного мозга. Известно, что, с одной стороны, при действии хемосигналов кошек в некоторых исследованиях наблюдали увеличение уровня кортикостерона в плазме крови мышей [8, 28, 29]. С другой стороны, 30-минутная экспозиция клеток фибробластов мышей Т3Т с кортикостероном приводила к увеличению повреждений ДНК [30].

Анализ уровня кортикостерона плазмы крови, проведенный в нашем исследовании, не выявил достоверных отличий от контроля ни через 30, ни через 60 минут после начала воздействия летучими хемосигналами МК. Отсутствие повышения концентрации кортикостерона в плазме крови мышей при действии запаха котом наблюдали и в других исследованиях [31, 32]. Одной из возможных причин, мешающих обнаружить выброс кортикостерона, может быть слишком большой промежуток времени от начала воздействия до забора материала. В большинстве исследований, в которых в ответ на хемосигналы кошки обнаруживали повы-

шение уровня кортикостерона, забор крови проводили в пределах первых 20 минут от начала воздействия [7, 28, 33], а не через 30, как в нашем случае. В нашем случае можно предположить, что либо кортикостерон уже в течение первых минут после начала воздействия МК запускает цепь реакций, ведущих к последующей дестабилизации генома клеток костного мозга, либо он не является ключевым фактором индукции геномной нестабильности при действии МК. Другими гормонами-кандидатами на роль индукторов поврежденности генома могут являться катехоламины: норадреналин и адреналин. В частности, для адреналина показана роль в формировании двунитевых разрывов ДНК у мышей при хроническом стрессе [34, 35]. Также известно, что феромональный стресс у мышей приводит к исчезновению норадреналина из нервных окончаний сосудистой слизистой оболочки носа и сосудистой оболочке семенников [36], что сопровождается последующим увеличением уровня хромосомных aberrаций в клетках костного мозга и семенников [37].

Усиление мутагенеза в соматических клетках, в частности в клетках костного мозга, может приводить к снижению жизнеспособности особи. Известно, что повреждения ДНК могут индуцировать опухолеобразование [38] и способствуют старению [39]. Кроме того, геномный стресс в клетках костного мозга может приводить к снижению гематопоетической и иммунной функций [40]. Выявленное здесь дестабилизирующее влияние запаха хищника (кошки) на генетический материал в клетках костного мозга животного-жертвы (мышь) демонстрирует, на наш взгляд, существование специфического эволюционно сложившегося механизма реакции на «хищника». Иммуносупрессия и другие, не исследованные пока нейрогормональные эффекты МК у мышей могут, с одной стороны, вести к снижению их жизнеспособности, с другой — подобные хемосигналы являются дополнительным селекционным фактором, способствующим отбору на оптимальную стрессоустойчивость особей.

Исследование поддержано грантом РФФИ 16-04-00678. Приобретение лабораторных животных и использование инструментальных ресурсов было обеспечено средствами государственного задания по проекту № 0324-2015-0004 и гранта Президента РФ НШ-9513.2016.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sowards TV, Sowards MA. Innate visual object recognition in vertebrates: Some proposed pathways and mechanisms. *Comparative Biochemistry and Physiology. A Molecular and Integrative Physiology*. 2002;132(4):861-891. doi: 10.1016/S1095-6433(02)00119-8.

2. Banks PB, Norrdahl K, Korpimäki E. Mobility decisions and the predation risks of reintroduction. *Biological Conservation*. 2002;103(2):133-138. doi: 10.1016/S0006-3207(01)00110-0.
3. Apfelbach R, Blanchard CD, Blanchard RJ, et al. The effects of predator odors in mammalian prey species: A review of field and laboratory studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2005;29(8):1123-1144. doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.05.005.
4. Curio E. The functional organization of anti-predator behaviour in the pied flycatcher: A study of avian visual perception. *Animal Behaviour*. 1975;32(1):1-12. doi: 10.1016/0003-3472(75)90056-1.
5. Hegab IM, Kong S, Yang S, et al. The ethological relevance of predator odors to induce changes in prey species. *Acta Ethologica*. 2014;18(1):1-9. doi: 10.1007/s10211-014-0187-3.
6. Kavaliers M, Choleris E, Colwell DD. Brief exposure to female odors «emboldens» male mice by reducing predator-induced behavioral and hormonal responses. *Hormones and behavior*. 2001;40(4):497-509. doi: 10.1006/hbeh.2001.1714.
7. Munoz-Abellan C, Armario A, Nadal R. Do odors from different cats induce equivalent unconditioned and conditioned responses in rats? *Physiology & Behavior*. 2010;99(3):388-394. doi: 10.1016/j.physbeh.2009.12.008.
8. Voznessenskaya VV, Malanina TV. Effect of chemical signals from a predator (*Felis catus*) on the reproduction of *Mus musculus*. *Doklady. Biological Sciences*. 2013;453(1):362-364. doi: 10.1134/S0012496613060057.
9. Vasilieva NY, Cherepanova EV, Von Holst D, Apfelbach R. Predator odour and its impact on male fertility and reproduction in *Phodopus campbelli* hamsters. *Naturwissenschaften*. 2000;87(7):312-314. doi: 10.1007/s001140050728.
10. Novotny M, Jemiolo B, Harvey S, et al. Adrenal-mediated endogenous metabolites inhibit puberty in female mice. *Science*. 1986;231(4739):722-725. doi: 10.1126/science.3945805.
11. Daev EV, Kazarova VE, Vyborova AM, Dukel'skaya AV. Effects of "Pheromone-Like" pyrazine-containing compounds on stability of genetic apparatus in bone marrow cells of the male house mouse *Mus musculus* L. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2009;45(5):589-595. doi: 10.1134/S0022093009050053.
12. Daev EV. Genetic consequences of olfactory stresses in mice. St Petersburg. Gos. Univ. [dissertation] Saint Petersburg; 2006.
13. Sasaki YF, Sekihashi K, Izumiyama F, Nishidate E, et al. The Comet Assay with Multiple Mouse Organs: Comparison of Comet Assay Results and Carcinogenicity with 208 Chemicals Selected from the IARC Monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. *Critical Reviews in Toxicology*. 2000;30(6):629-799. doi: 10.1080/10408440008951123.
14. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Анисина Е.А., и др. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений: Методические рекомендации. — М., 2006 [Durnev AD, Zhanataev AK, Anisina EA, et al. *Primenenie metoda shchelochnogo gel'-elektroforeza izolirovannykh kletok dlya otsenki genotoksicheskikh svoystv prirodnykh i sinteticheskikh soedinenii: Metodicheskie rekomendatsii*. Moscow; 2006. (In Russ.)]
15. Макаров В.Б., Сафронов В.В. Цитогенетические методы анализа хромосом. — М.: Наука, 1978. — С. 85. [Makarov VB, Safronov VV. *Cytogenetic Methods of Chromosome Analysis*. Moscow: Nauka; 1978. P. 85. (In Russ.)]
16. Глотов Н.В., Животовский Л.А., Хованов Н.В., Хромов-Борисов Н.Н. Биометрия. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. — С. 264. [Glotov NV, Zhivotovskii LA, Khovanov NV, Khromov-Borisov NN. *Biometry*. Leningrad: Izdatelstvo LGU; 1982. P. 264. (In Russ.)]
17. McGregor IS, Schrama L, Ambermoon P, Dielenberg RA. Not all 'predator odours' are equal: cat odour but not 2,4,5 trimethylthiazoline (TMT; fox odour) elicits specific defensive behaviours in rats. *Behavioural Brain Research*. 2002;129(1-2):1-16. doi: 10.1016/S0166-4328(01)00324-2.
18. Bowen MT, Keats K, Kendig MD, et al. Aggregation in quads but not pairs of rats exposed to cat odor or bright light. *Behavioural Processes*. 2012;90(3):331-336. doi: 10.1016/j.beproc.2012.03.014.
19. Xu HY, Liu YJ, Xu MY, et al. Inactivation of the bed nucleus of the stria terminalis suppresses the innate fear responses of rats induced by the odor of cat urine. *Neuroscience*. 2012;221:21-27. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.06.056.
20. Hegab IM, Wang A, Yin B, et al. Behavioral and neuroendocrine response of Brandt's voles, *Lasiopodomys brandtii*, to odors of different species. *European Journal of Wildlife Research*. 2014;60(2):331-340. doi: 10.1007/s10344-013-0790-z.
21. De Oliveira Crisanto K, de Andrade Wylqui MG, de Azevedo Silva KD, et al. The differential mice response to cat and snake odor. *Physiology and Behavior*. 2015;152:272-279. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.10.013.
22. Dent CL, Isles AR, Humby T. Measuring risk-taking in mice: Balancing the risk between seeking reward and danger. *European Journal of Neuroscience*. 2014;39(4):520-530. doi: 10.1111/ejn.12430.
23. Hacquemand R, Choffat N, Jacquot L, Brand G. Comparison between low doses of TMT and cat odor exposure in anxiety- and fear-related behaviors in mice.

- Behavioural Brain Research*. 2013;238(1):227-231. doi: 10.1016/j.bbr.2012.10.014.
24. Papes F, Logan DW, Stowers L. The Vomeronasal Organ Mediates Interspecies Defensive Behaviors through Detection of Protein Pheromone Homologs. *Cell*. 2010;141(4):692-703. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.037.
25. Mikhailov VM, Vezhenkova IV. Double-strand Breaks of DNA of C57BL and mdx Mouse Cardiomyocytes after Dynamic Stress. *Cell and Tissue Biology*. 2007;1(4):328-333. doi: 10.1134/S1990519X07040049.
26. Aguilera A, García-Muse T. Causes of Genome Instability. *Annual Review of Genetics*. 2013;47:1-32. doi: 10.1146/annurev-genet-111212-133232.
27. Meijer L, Guidet S, Vogel L. Progress in cell cycle research. *Springer Science & Business Media*. 2012:284.
28. Roy V, Belzung C, Delarue C, Chapillon P. Environmental enrichment in BALB/c mice: Effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. *Physiology and Behavior*. 2001;74(3):313-320. doi: 10.1016/S0031-9384(01)00561-3.
29. Sotnikov SV, Markt PO, Umriukhin AE, Landgraf R. Genetic predisposition to anxiety-related behavior predicts predator odor response. *Behavioural Brain Research*. 2011;225(1):230-234. doi: 10.1016/j.bbr.2011.07.022.
30. Flint MS, Baum A, Chambers WH, Jenkins FJ. Induction of DNA damage, alteration of DNA repair and transcriptional activation by stress hormones. *Psychoneuroendocrinology*. 2007;32(5):470-479. doi: 10.1016/j.psyneuen.2007.02.013.
31. Munoz-Abellan C, Andero R, Nadal R, Armario A. Marked dissociation between hypothalamic-pituitary-adrenal activation and long-term behavioral effects in rats exposed to immobilization or cat odor. *Psychoneuroendocrinology*. 2008;33(8):1139-1150. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.06.002.
32. File SE, Zangrossi H, Sanders FL, Mabbutt PS. Dissociation between behavioral and corticosterone responses on repeated exposures to cat odor. *Physiology and Behavior*. 1993;54(6):1109-1111. doi: 10.1016/0031-9384(93)90333-B.
33. Munoz-Abellan C, Daviu N, Rabasa C, et al. Cat odor causes long-lasting contextual fear conditioning and increased pituitary-adrenal activation, without modifying anxiety. *Hormones and Behavior*. 2009;56(4):465-471. doi: 10.1016/j.yhbeh.2009.08.002.
34. Hara MR, Kovacs JJ, Whalen EJ, et al. A stress response pathway regulates DNA damage through β 2-adrenoreceptors and β -arrestin-1. *Nature*. 2011;477(7364):349-353. doi: 10.1038/nature10368.
35. Hara MR, Sachs BD, Caron MG, Lefkowitz RJ. Pharmacological blockade of a β 2AR- β -arrestin-1 signaling cascade prevents the accumulation of DNA damage in a behavioral stress model. *Cell Cycle*. 2013;12(2):219-224. doi: 10.4161/cc.23368.
36. Daev EV, Vorob'ev KV, Shustova TI, et al. Genotype-Specific Changes in Functional Parameters of Immunocompetent Cells in Laboratory Male Mice under Conditions of Pheromonal Stress. *Russian Journal of Genetics*. 2000;36(8):872-876.
37. Daev EV. Stress, chemocommunication, and the physiological hypothesis of mutation. *Russian Journal of Genetics*. 2000;43(10):1082-1092. doi: 10.1134/S102279540710002X.
38. Cha HJ, Yim H. The accumulation of DNA repair defects is the molecular origin of carcinogenesis. *Tumor Biology*. 2013;34(6):3293-3302. doi: 10.1007/s13277-013-1038-y.
39. Moskalev AA, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, et al. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Research Reviews*. 2013;12(2):661-684. doi: 10.1016/j.arr.2012.02.001.
40. Flach J, Bakker ST, Mohrin M, et al. Replication stress is a potent driver of functional decline in ageing haematopoietic stem cells. *Nature*. 2013;512(7513):198-202. doi: 10.1038/nature13619.

PREDATOR ODOR INDUCES GENOME INSTABILITY IN THE MOUSE BONE MARROW CELLS

T.S. Glinin, P.A. Starshova, V.A. Shubina,
M.V. Anisimova, A.A. Bondarenko, M.P. Moshkin,
E.V. Daev

For citation: Ecological genetics. 2017;15(1):4-11

✿ **SUMMARY: Background.** Long coevolution of prey and predator species of mammals creates specific mechanisms of their interaction, e. g. prey's innate behavior aversive to the predator odor. However, little is known about genetic responses in the prey organism. We assessed genome instability of the bone marrow cells in mice affected by the cat's odor influence, and proposed pathway of such action. **Materials and methods.** CBA mouse males were exposed to volatiles from adult cat urine for 2 or 24 hours. To estimate the genetic effect, ana-telophase method of chromosome aberration analysis and comet assay were used. The level of corticosterone was also measured after the exposure for 30 or 60 minutes. **Results.** The exposure to cat's urine volatiles for 2 hours induced damage of DNA in bone marrow cells of the mouse males as was shown by the DNA comet analysis. The exposure for 24 hours elevated the frequency of chromosome aberrations in mitotically dividing cells at ana-telophase stage. No significant changes were found in the level of corticosterone in the peripheral blood. **Conclusion.** We have shown that volatile chemosignals from predator's urine induce genomic instability in bone marrow cells of a prey. The hormonal pathway of such influence is still unknown. Intraorganismic paths leading to genome damage are discussed as well as far consequences of discovered effects.

✿ **KEYWORDS:** predator odor; genome instability; corticosterone; chromosome aberrations; comet DNA; bone marrow; *Felis catus*; mouse.

✿ Информация об авторах

Тимофей Сергеевич Глинин — аспирант, кафедра генетики и биотехнологии. Санкт-Петербургский государственный университет.
E-mail: t.glinin@gmail.com.

Полина Андреевна Старшова — студент, кафедра генетики и биотехнологии. Санкт-Петербургский государственный университет.
E-mail: pstrsh@gmail.com.

Виктория Андреевна Шубина — студент, кафедра генетики и биотехнологии. Санкт-Петербургский государственный университет.
E-mail: viktory.shubina@gmail.com.

Маргарита Владимировна Анисимова — аспирант, лаборатория генетики лабораторных животных. Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения РАН.
E-mail: anisimova@bionet.nsc.ru.

Антон Александрович Бондаренко — студент, кафедра генетики и биотехнологии. Санкт-Петербургский государственный университет.
E-mail: emptybox1267@gmail.com.

Михаил Павлович Мошкин — д-р биол. наук, заведующий отделом генетических ресурсов лабораторных животных. Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения РАН. E-mail: mmp@bionet.nsc.ru.

Евгений Владиславович Даев — д-р биол. наук, профессор, кафедра генетики и биотехнологии. Санкт-Петербургский государственный университет. E-mail: mouse_gene@mail.ru.

✿ Information about the authors

Timofey S. Glinin — PhD student. Department of Genetics and Biotechnology. St Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia.
E-mail: t.glinin@gmail.com.

Polina A. Starshova — student. Department of Genetics and Biotechnology. St Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia.
E-mail: pstrsh@gmail.com.

Victoria A. Shubina — student. Department of Genetics and Biotechnology. St Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia.
E-mail: viktory.shubina@gmail.com.

Margarita V. Anisimova — PhD student. Department of Genetic Resources of Experimental Animals. Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia.
E-mail: anisimova@bionet.nsc.ru.

Anton A. Bondarenko — student. Department of Genetics and Biotechnology. St Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia.
E-mail: emptybox1267@gmail.com.

Mikhail P. Moshkin — Dr. of Sci. Department of Genetic Resources of Experimental Animals. Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia.
E-mail: mmp@bionet.nsc.ru.

Eugene V. Daev — Professor, Department of Genetics and Biotechnology. St Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia.
E-mail: mouse_gene@mail.ru.