

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Študijný program: Biológia

Študijný obor: Zoológia



**Ing. Zuzana Černá**

Sociálna komunikácia myši domácej (*Mus musculus*)

Social communication in the house mouse (*Mus musculus*)

Diplomová práca

Školiteľ: doc. Mgr. Pavel Stopka, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Romana Stopková, Ph.D.

Praha, 2019



## **Prehlásenie**

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a uviedla všetky použité informačné zdroje aj literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 23. 4. 2019

.....  
Zuzana Černá



## **Pod'akovanie**

Rada by som poďakovala svojmu školiteľovi Pavlovi Stopkovi a svojej konzultantke Romane Stopkovej za odborné vedenie diplomovej práce a cenné rady pri jej zostavovaní. Pavlovi Stopkovi chcem poďakovať najmä za pomoc so štatistickým spracovaním údajov.



## Abstrakt

Chemická komunikácia je najdôležitejším spôsobom dorozumievania sa u myši domácej. Tradične bola v tejto súvislosti skúmaná predovšetkým moč, z dôvodu jej pomerne ľahkého získavania a analýzy, a typického spôsobu jej prezentácie pomocou močových značiek. Analýza fyzickej interakcie dvoch myší však ukazuje, že existuje viacero ďalších komunikačne dôležitých chemických signálov. Etologická analýza ukázala, že pri prvotnej interakcii jedincov opačného pohlavia dochádza k preskúmvaniu orofaciálnej oblasti, a následne k orálnemu kontaktu, pri ktorom dochádza k výmene slín. Zároveň výsledky tejto práce preukázali zásadný vplyv štádia reprodukčného cyklu samice na štruktúru chovania u oboch pohlaví. Jedným z významných zdrojov signálov sú sliny, ktoré sú v interakcii jedincov opačného pohlavia aktívne oňuchávané a dokonca aj fyzicky vymieňané. Chemická analýza slín urobená pomocou plynovej chromatografie s hmotnostným spektrometrom (GC-MS) ukázala, že sú pohlavne dimorfným chemickým signálom a dokonca môžu predstavovať nástroj individuálneho pachového podpisu jedinca. Unikátnosť pachového signálu nie je založená na prítomnosti jedinečných substancií, ale na ich špecifickom pomere v zmesi. Táto práca môže slúžiť ako základ k ďalšiemu podrobnejšiemu skúmaniu chemických signálov a ich významu v sociálnej komunikácii myši domácej.

**Kľúčové slová:** *Mus musculus*, chemická komunikácia, sociálne chovanie, estrálny cyklus, plynová chromatografia, GS-MS





## **Abstract**

Chemical communication is the most important way of communication in the house mouse. Traditionally, the urine of the house mouse was the most studied source of signals. Typical way of scent marking, relatively simple way of collection and analysis was the main reason. The analysis of physical interaction of two mouse conspecifics has shown that there are several other very important sources of chemical signals. My ethological analysis has revealed that during the first interaction of two individuals of opposite sex, the most investigated body part is the orofacial region, and that the oral contact with salivary exchange is very frequent. At the same time, the results of this research have demonstrated the significant influence of reproductive status on behavioural patterns in individuals of both sex. One of these important sources of chemical signals is the saliva. During the interaction between two individuals, saliva is actively investigated by sniffing and physically exchanged. Gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) was used for chemical analysis of saliva. It has revealed that saliva is a sexually dimorphic signal, which may represent individual odour profiles. Uniqueness of this odour is not based on the presence of special substances typical just for one sex, unique is the blend, the mixture of the substances. This work may serve to provide the basis for further research on chemical signals and their importance in social communication of the house mouse.

**Key words:** *Mus musculus*, chemical communication, social behaviour, oestrous cycle, gas chromatography, GS-MS



# Obsah

1.	Úvod .....	1
1.1.	Myš domáca ( <i>Mus musculus</i> ) .....	5
1.2.	Chemická komunikácia.....	7
1.3.	Moč .....	10
1.4.	Vaginálne sekréty.....	13
1.5.	Slzy a sliny .....	15
2.	Ciele diplomovej práce .....	17
2.1.	Analýza chovania pri interakcii samca a samice myši domácej .....	17
2.2.	Analýza slín, ako jedného z dôležitých chemických signálov.....	18
3.	Metodika.....	19
3.1.	Analýza chovania .....	19
3.1.1.	Myš domáca .....	19
3.1.2.	Pozorovanie a záznam chovania .....	19
3.1.3.	Odber vzoriek a určenie fázy estrálneho cyklu.....	19
3.1.4.	Spracovanie etologického pozorovania.....	22
3.1.5.	Štatistická analýza chovania.....	24
3.2.	Analýza slín.....	25
3.2.1.	Odber vzoriek.....	25
3.2.2.	GS-MS.....	25
3.2.3.	Štatistická analýza údajov z GC-MS .....	26
4.	Výsledky .....	27
4.1.	Analýza chovania .....	27
4.2.	Analýza slín.....	34
5.	Diskusia .....	41
6.	Záver .....	46
7.	Referencie .....	48



# 1. Úvod

Už viac ako storočie si etológovia kladú otázku: Prečo robia zvieratá to čo robia? Na túto zdanlivo elementárnu otázku existuje viacero, navzájom sa doplňujúcich, odpovedí. Tieto odpovede sa však zasadne líšia podľa úrovne analýzy sledovaného chovania (Tinbergen, 1963; Sherman, 1988). Prvá úroveň skúma mechanistické príčiny chovania, druhá sa zaoberá ontogenézou chovania v živote jedinca, tretia skúma dopady chovania na individuálnu fitness a štvrtá evolúciou daného typu chovania. Prvé dve predstavujú tzv. proximátne príčiny chovania, ďalšie dve sú označované ako ultimátne príčiny chovania. Rozlišovanie medzi týmito dvoma kategóriami je kritické pre správne pochopenie a vysvetlenie skúmaného javu. Takto je napríklad možné rozlíšiť príčiny značkovania u myši domácej (*Mus musculus*). Proximátne príčiny značkovania sú napríklad hormonálne riadené zmeny v koncentrácii prechavých látok v moči, naopak ultimátne príčiny sú napríklad komunikácia dominantného či submisívneho postavenie v sociálnej skupine.

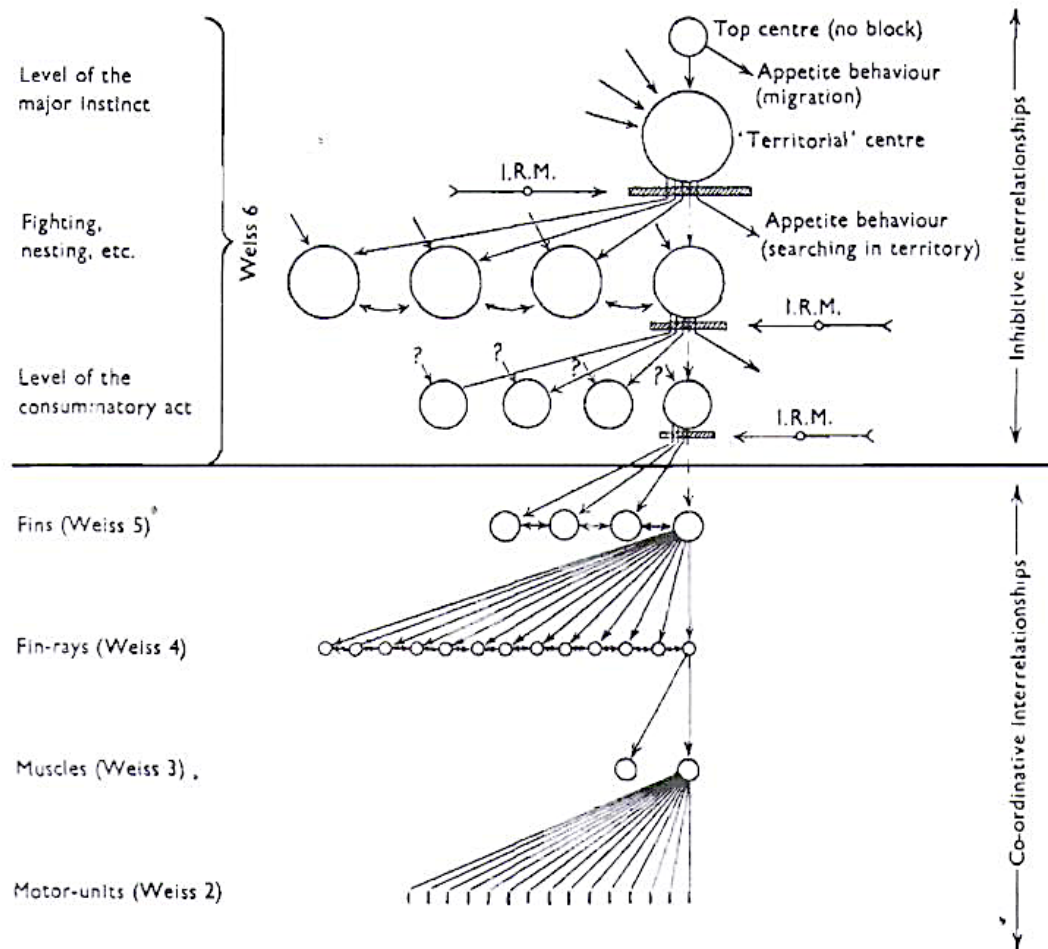
Správne určenie a pochopenie príčin chovania, a tým aj samotného pozorovaného javu, však závisí taktiež na odhalení komplikovaného mechanizmu, ktorý sa za ním ukrýva. Každé chovanie totiž predstavuje určitú reťazovú reakciu, zloženú z kratších separátnych reakcií, kde každá z nich je závislá na špecifickom súbore podnetov (Tinbergen, 1942). Typickou indikáciou reťazovej vlastnosti chovania je jeho náhle prerušenie v priebehu procesu. Túto charakteristiku chovania popísal v roku 1927 von Frisch na včelách medonosných. Včely hľadajúce potravu reagujú, ako prvé, na vizuálny stimul, v ktorom hrá hlavnú úlohu farba. Žlté a modré kvety priťahujú včely už zo značnej vzdialenosti. Papierové atrapy takýchto kvetov, boli použité ako prvý stimul. Včely sa však po priblížení na vzdialenosť asi 1 cm zastavili, na kvet ani nedosadli a stratili o neho záujem. Iná situácia nastala, keď bol na kvety pridaný správny pach, zodpovedajúci prirodzenej vôni kvetov. Včely na kvet dosadli a začali hľadať nektár. Druhým stimulom bol teda pach. Úplným zakončením procesu hľadania potravy je ale, sanie nektáru. To však nastane až po zapojení ďalšieho stimulu, ktorým je povrch kvetu. Až stimulácia hmatových receptor včely vyvolá konečnú reakciu, a to sanie nektáru. Takže to čo sa na prvý pohľad môže zdať ako pomerne jednoduché chovanie, hľadanie potravy, je vlastne relatívne dlhá reťaz reakcií závislých na vizuálnom, chemickom a hmatovom stimule.

Asi najpodrobnejšiu analýzu reťazového chovania však urobil Nikolaas Tinbergen na páriacom chovaní u pichľavky sivej (*Gasterosteus aculeatus*). Samec pichľavky hibernuje v morskej vode, kým ho neprebudí reprodukčný inštinkt. Následne migruje do plytkých sladkých vôd, kde hľadá správnu vegetáciu, ktorá bude predstavovať jeho teritórium. Výber teritória závisí na stimule, ktorým je jednak zvýšená teplota vody, ale taktiež na vizuálnom stimule, ktorým je špecifický typ vegetácie. S týmto teritóriom sú zviazané všetky jeho reprodukčné aktivity: obhajovanie pred konkurenčnými samcami, stavanie hniezda, lákanie samice, a konečne aj, oplodnenie vajícok a starostlivosť o nich. Všetky tieto dielčie chovania sú závislé, ako na externých stimuloch, tak aj na tzv. interných impulzoch (Tinbergen, 1950). Práve tieto interné impulzy, ktorými sú v tomto prípade gonadálne hormóny, spustia potrebu samca, rozmnožovať sa. Z toho vyplýva, že aj samotná schopnosť reagovať na vonkajšie stimuly, ako napríklad prítomnosť iného samca, je závislá na primárnej aktivácii reprodukčného inštinktu ako celku. Potom čo je tento inštinkt aktivovaný, následné chovania, ako sú hľadanie teritória či jeho obhajovanie, sú závislé na špecifických prídavných stimuloch. Obhajovanie teritória napríklad, je spustené vizuálnym stimulom, ktorým je iný samec v svadobnom šate. A samotné obhajovanie teritória môže byť uskutočnené rôznymi spôsobmi. Každý z nich závisí opäť na ďalších, ešte viac špecifických stimuloch. Napríklad odpoveďou na útok sprevádzaný uhryznutím, je spätné uhryznutie. Reakciou na útek je prenasledovanie a podobne. Takto pozorované usporiadanie priviedlo Nikolaasa Tinbergena k záveru, že chovanie riadi akýsi neurologický mechanizmus, ktorý má nepochybne hierarchickú štruktúru. Model, ktorý na základe tohoto poznania vytvoril, nazval Hierarchický systém centier (Tinbergen, 1950).

Hierarchický systém centier je systém určitých nervových centier, kde centrá na vyššej úrovni kontrolujú centrá na nižšej úrovni, a každé z týchto nižších centier kontroluje určitý počet, o úroveň nižšie položených centier atď. Konečnou úrovňou a samotným cieľom chovanie je tzv. akt dovriešenia (z angl. consummatory act) (Craig, 1918). Naopak úrovňou prvou je samotný počiatok inštinktu. Jednotlivé centrá predstavujú akési zberne impulzov pochádzajúcich z rôznych zdrojov. Môžu to byť napríklad impulzy pochádzajúce z vplyvu hormónov, či z internej alebo externej aktivácie zmyslových receptorov. Aby mohli tieto impulzy pokračovať do ďalšej úrovne a vyvolať tak, hierarchicky ďalší typ chovania, je nutné, aby bol jedinec vystavený špecifickej kombinácii spúšťacích podnetov. Iba podnety majú schopnosť

odstrániť pomyselný blok a prepustiť impulzy do ďalšej úrovne. Tinbergen tieto podnety nazval vrozeným spúšťacím mechanizmom (z angl. innate releasing mechanism, skr. IRM). Pokiaľ nie je tento blok odstránený, impulzy vyvolajú tzv. apetenčné chovanie. Apetenčné chovanie predstavuje aktívne hľadanie, práve tohoto, vrozeného spúšťacieho mechanizmu. V príklade o pichľavke sivej, predlžovanie dňa a tým vyvolaná zvýšená produkcia gonadálnych hormónov, aktivujú u samca najvyššie centrum hierarchickej štruktúry reprodukčného inštinktu. Následná migrácia predstavuje apetenčné chovanie. To pretrváva až do doby, kedy je jedinec vystavený adekvátnym IRM, ktoré odstránia blok a uvoľnia impulzom cestu do ďalšej úrovne. Výsledkom tohoto je, že zviera prestane migrovať. V ďalšej úrovni opäť nastáva obdobná situácia. Do doby kým bude odstránený blok pre stavanie hniezda, či obhajovanie teritória, prebieha apetenčné chovanie. To v tejto úrovni predstavuje neustále plávanie v teritóriu a hľadanie stavebného materiálu či potenciálnych rivalov. Na tomto princípe pokračuje vývoj chovanie, až kým nie je dosiahnutý akt dovŕšenia.

Je taktiež dôležité uviesť, že typy chovania v rámci jednej úrovne sa navzájom inhibujú. To znamená, že chovanie vyúsťujúce z jedného centra, zabraňuje prejavu chovania z iného centra na rovnakej úrovni. Dôkazom tohoto tvrdenia je tzv. preskokové chovanie (z angl. displacement activities) (Tinbergen, 1939, 1940; Kortlandt, 1940). Preskokové chovanie je jav, kedy sa pozorované chovanie javí ako nijak nesúvisiace s chovaním, ktoré ho tesne predchádzalo, alebo ktoré po ňom ihneď nasleduje. V rámci pozorované chovania ako celku sa javí ako nezmyslené. Typickým príkladom sú dvaja samci kura domáceho, ktorí sa uprostred boja začnú kŕmiť na okolitej vegetácii. Situácie typické pre preskokové chovania sa vyznačujú motivačným konfliktom medzi dvoma rovnako silnými potrebami, alebo silnou motiváciou k určitému chovaniu, avšak s nedostatkom externých stimulov.



**Obr. č. 1: Ilustračný náčrt hierarchického systému centier.**

Prevzaté z Tinbergen, 1950

Základy princípu hierarchickej organizácie chovania boli okrem pichľavky popísané aj u kutilky rodu *Ammophila* (Baerends, 1941), u domácich moriakov (*Meleagris gallopavo*) (Räber, 1948), a u rôznych druhov cichlid (Baerends, 1950). Tieto práce potvrdili správnosť prístupu Nikolaasa Tinbergena a prispeli tak k vytvoreniu modelu hierarchickej organizácie centier. Za tento objav, a taktiež za ďalšie prínosy v oblasti etológie, bol Nikolaas Tinbergen v roku 1973, spolu s Konradom Lorenzom a Karlom von Frischom, ocenený Nobelovou cenou za fyziológiu a medicínu. Či už bol tento model v neskoršej dobe podporený (Hinde, 1953), alebo rozporovaný (Hinde, 1956; Sachs, 2007), jeho prínos v nahliadaní na štruktúru chovania a následne aj v spôsobe samotnej analýzy chovania, je nepopierateľný. Práve preto bol tento prístup zvolený ako teoretický základ pre analýzu chovania v tejto diplomovej práci.



## 1.1. Myš domáca (*Mus musculus*)

Myš domáca je v súčasnosti jedným z najrozšírenejších cicavcov na svete. Pôvodne pochádza z oblasti dnešnej severnej Indie, avšak od doby kedy sa jej areál skrížil s prvými farmármi, bol ďalší vývoj tohoto druhu spätý s človekom. Postupne sa rozšíril na všetky kontinenty, a čo viac, do takmer všetkých laboratórií sveta. Spôsob života myši domácej (typický r-stratég) a jej ekologické nároky, vyústili nielen v masívne množenie a šírenie, ale taktiež v jej úspech ako jedného z hlavných modelových organizmov v prírodných vedách. V prvej polovici 20. storočia bola myš domáca skúmaná hlavne s cieľom udržať jej populácie pod kontrolou (Laurie, 1946; Southern and Laurie, 1946; Newsome, 1971; Singleton et al., 2007). Myš sa stala vážnym škodcom a jej invázie do nových ekosystémov mali neblahé dopady na miestnu faunu i flóru (Simberloff, 2009). Postupne sa však stala objektom štúdia systematickej biológie, či populačnej a evolučnej genetiky. Jej genetická podobnosť s človekom umožnila použitie tohoto druhu naprieč biomedicínskymi obormi. A nakoniec, vďaka dobre preskúmanej anatómii a fyziológii, je taktiež klasickým modelom v etológii.

*Mus musculus* je druh žijúci v skupine s hierarchickým usporiadaním. Sociálna hierarchia je udržiavaná fyzicky i pachovo prezentovanou dominanciou. Obvykle sa jedná o polygamné usporiadanie, kde dominantný samec obhajuje svoju možnosť páriť sa s viacerými samicami (Patris and Baudoin, 1998; Wright and Brown, 2000). Samica môže mať, rovnako, postavenie dominantné alebo submisívne. Len samice s dominantným postavením majú možnosť sa páriť, estrus submisívnych samíc je potlačený pachovými signálmi dominantných, páriacich sa, samíc (Champlin, 1971). Veľkosť a usporiadanie skupiny závisí na populačnej hustote. Všeobecne platí, že iní samci sú nežiadúci, a sú aktívne napádaní dominantnými samcami. Samica môže mať v priebehu jedného roka až 10 vrhov, o priemernom počte 5 mláďat, obvykle s rovnakým pomerom pohlaví (Berry, 1970; Berry and Bronson, 1992). Mláďatá sú odstavované vo veku 3 týždňov, a pohlavne dospievajú približne vo veku 5 až 6 týždňov (Meehan, 1984). Mladí samci v tomto veku opúšťajú hniezdo s cieľom nájsť si vlastné teritórium (Berry, 1970). Pokiaľ tak neučinia, napríklad kvôli veľkej populačnej hustote, sú vystavení riziku napadnutia zo strany dominantného samca, ich otca (Bronson, 1979; Gerlach, 1990). Mladé samice môžu buď hniezdo opustiť alebo zostať v rodinnej skupine. V druhom prípade sú však ich reprodukčné aktivity obmedzené (Champlin, 1971) a ich úlohou je napomáhať s výchovou mláďat, aktívne

sa rozmnožujúcich samíc (Gerlach, 1990; Berry and Bronson, 1992). Jedinci, ktorí skupinu opustili, si hľadajú nové teritórium a vhodného partnera na párenie. Keďže sa od tohoto výberu odvíja životaschopnosť budúci mláďat, je tento proces kriticky dôležitý. Vypovedá o tom aj množstvo chemických signálov, ktoré sú produkované vyslovene za týmto účelom (Whitten et al., 1968; Novotny, Ma, Židek, et al., 1999; Novotny, 2003; Roberts et al., 2010). Jednými z nich sú napríklad chemické signály indikujúce hladiny pohlavných hormónov u samca (Thiessen and Rice, 1976; Kempnaers et al., 2008). S tým úzko súvisí ďalší faktor výberu, a to sociálny status jedinca. Samice jednoznačne preferujú dominantných samcov, pred tými submisívnymi (Mossman and Drickamer, 1996). Samica však hodnotí samca aj podľa určitých zdravotných indikátorov. Samice preto preferujú samcov s lepšou rezistenciou voči patogénom (Lenington et al., 1992; Ehman and Scott, 2001; Penn et al., 2002), a naopak diskriminujú samcov umelo nakazených parazitmi (Kavaliers and Colwell, 1995). Dôležitú úlohu však zohráva aj diskriminácia jedincov s podobným histokompatibilným komplexom (MHC, z angl. Major histocompatibility complex) (Jordan and Bruford, 1998). Tým sa predchádza nežiadúcemu inbreedingu (Eklund, 1996) a podporuje sa genetická diverzita potomstva (Penn et al., 2002).

Ako už z predchádzajúceho textu vyplýva, myšiemu svetu dominuje čuch. Na základe rozpoznávania pachov hľadá myš potravu, pohybuje sa v priestore, identifikuje vlastné či cudzie teritórium, rozpoznáva iných jedincov svojho druhu, nachádza a vyberá si vhodného partnera, či deteguje prítomnosť predátora. Je to práve čuch, ktorý umožňuje fungovanie sociálneho usporiadania myších kolónií. Pachové signály určujú postavenie jedincov v hierarchii, ovplyvňujú reprodukčné aktivity, zabráňujú inbreedingu a tým všetkým udržujú dynamiku skupiny a jej kontinuálne prežívanie. Extrémnu dôležitosť čuchu dokladajú aj experimenty, kedy chirurgické odstránenie vomeronasálneho orgánu spôsobilo, až nečakane, razantné zmeny v chovaní jedinca myši domácej (Clancy et al., 1984; Liebenauer and Slotnick, 1996).

## 1.2. Chemická komunikácia

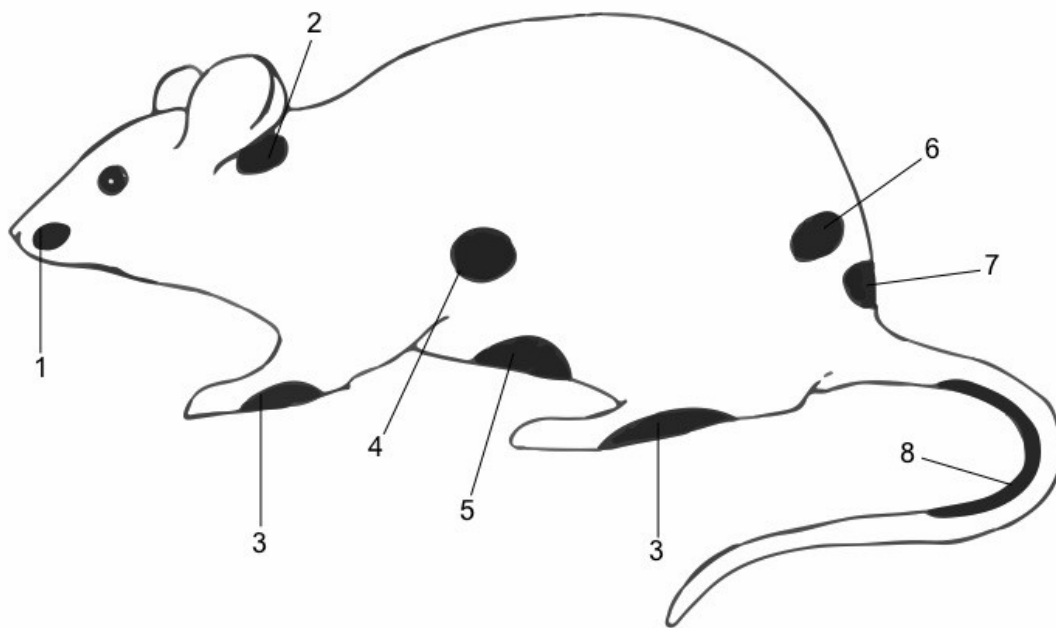
### *Signál*

Tradične bol chemický signál označovaný ako feromón. Termín feromón vznikol ako popis chemického signálu u hmyzu. Je to substancia sekretovaná do vonkajšieho prostredia konkrétnym jedincom a prijímaná druhým jedincom rovnakého druhu, vyvolávajúc tak behaviorálnu či fyziologickú reakciu (Karlson and Lüscher, 1959). Užívanie tohoto termínu v biológii cicavcov, je však v rozpore s jeho definíciou. Fyziológia a chovanie cicavcov nie sú pevne dané, naopak, sú flexibilné, závislé od okolností a podliehajúce skúsenosti a učeniu (Doty, 1986; McClintock, 2002). Preto bude v tejto práci namiesto termínu feromón, používaný výraz chemický signál, prípadne skrátene chemosignál.

Ďalej je potrebné si zodpovedať otázku, či môže chemický signál u cicavcov predstavovať len jedna konkrétna substancia. Existuje evidencia o jednotlivých látkach, ktoré sú schopné vyvolať určitú behaviorálnu alebo fyziologickú reakciu (Vandenbergh, 1983; Novotny, Ma, Židek, et al., 1999). Veľa ďalších výskumov však dokazuje, že zvieratá, a aj človek, vnímajú pach ako celok, ako akúsi pachovú zmes (Bell et al., 1987; Laing, 1991; Johnston, 2003). V tomto prípade sa často krát nejedná len o jednotlivé zložky, ale aj o ich vzájomné pomery v celkovom pachu. Príkladom takýchto signálov je napríklad rozpoznávanie identity jedinca či vzájomnej príbuznosti (Belcher et al., 1988; Cantoni et al., 1996). K identifikácii jedinca slúži unikátny pach, s unikátnym zložením a pomerom látok, tzv. pachový podpis (Gorman, 1976; Gorman et al., 1984; Smith et al., 2001). Tento prístup podporujú aj zistenia, že niektoré látky považované za jedinečný chemický signál daného druhu, boli objavené aj u druhu úplne odlišného (Ingersoll and Launay, 1986; Rasmussen et al., 1996). U myši domácej bolo identifikovaných takmer desať substancií, ktoré niektorí autori nazývajú feromóny (Novotny, 2003). Ukázalo sa však, že časť týchto látok nielenže vyvoláva rovnaké reakcie, viacero z nich má dokonca viacnásobné funkcie (Novotny, 2003). Toto je samo osebe v rozpore s popisovanou jedinečnosťou signálu. To opäť podporuje domnienku, že nie látky samotné, ale ich súčasť v celkovom pachu sú tým zásadným, informáciu sprostredkujúcim, signálom. Navyše v experimentoch, kedy boli tieto látky podávané len v roztoku s vodou, nevyvolávali očakávanú reakciu. Ta sa dostavila až po pridaní tejto látky do moči kastrovaného jedinca (Novotny et al., 1985).

### *Chemosenzorický systém*

Chemické signály u myši domácej pochádzajú z rôznych zdrojov. Produkujú ich jednak exokrinné žľazy, ako napríklad lakrimálna žľaza, plantárna (chodidlová) žľaza, bočná žľaza a podobne. Ďalším zdrojom sú produkty vylučovacej sústavy, moč a trus, ale taktiež telesné tekutiny ako vaginálne sekréty, sliny a slzy. Prehľad kožných štruktúr ako zdroja chemických signálov u myši domácej znázorňuje obrázok č. 2.



**Obr. č. 2: Kožné štruktúry hlodavcov.** Prevzaté z (Gaisler and Zima, 2018)

1 – perná žľaza, 2 – záušná žľaza, 3 – chodidlové žľazy, 4 – bočná žľaza, 5 – brušná žľaza, 6 – zadochrbtová žľaza, 7 – nadchvostostová žľaza, 8 – podchvostová žľaza

Chemické signály u myši domácej deteguje a spracováva jednak hlavný čuchový epitel (skr. MOE, z angl. main olfactory epithelium), a taktiež prídavný čuchový orgán, vomeronasálny orgán (skr. VNO, z angl. vomeronasal organ). Nedávne výskumy nasvedčujú tomu, že bunky vo VNO sú nielenže primárne zodpovedné za sprostredkovanie hormonálnej reakcie, sú dokonca špecializované na konkrétne typy substancií (Leinders-Zufall et al., 2000). Naopak bunky MOE sú síce rovnako citlivé ako tie vo VNO, každá bunka však reaguje na viacero druhov látok (Ziesmann et al., 2002).

### *Chemické signály a fyziológia*

Chemické signály majú schopnosť vyvolať zásadné fyziologické reakcie. U myši domácej boli popísané štyri takéto efekty súvisiacich s reprodukciou.

**Vandenberghov efekt** = Akcelerácia puberty. U pohlavne nedospelých samíc, vystavených samičím pachovým značkám bol pozorovaný urýchlený nástup puberty (Vandenbergh, 1969). Tento nástup bol ešte rýchlejší pokiaľ došlo aj k fyzickej interakcii samíc a dospelých samcov (Bronson and Maruniak, 1975).

**Whittenov efekt** = Vyvolanie ovulácie. Prítomnosť chemický signálov dospelých samcov má schopnosť u skupinovo-chovaných samíc navodiť ovuláciu, a to mimo dobu očakávaného estra. (Marsden and Bronson, 1964; Whitten et al., 1968).

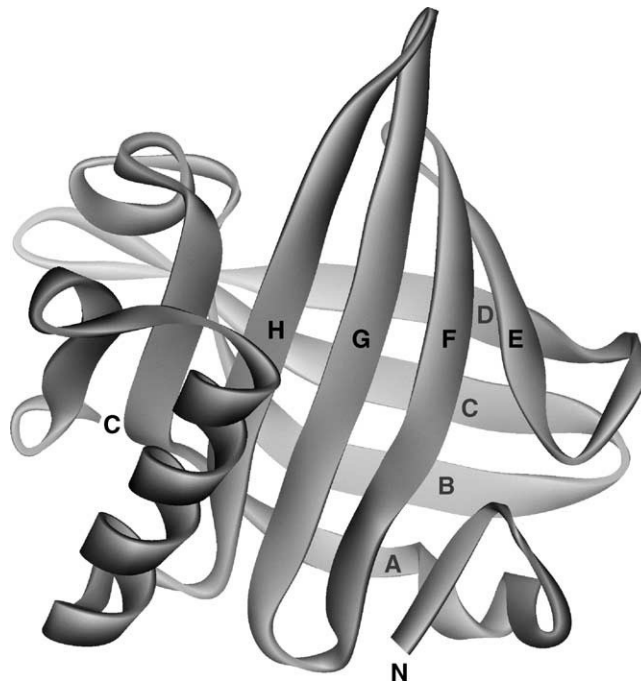
**Lee-Bootov efekt** = Potlačenie ovulácie. Samice vystavené pachom samíc chovaných v skupine, vykazovali poruchy estrálnej cyklicity (Van der Lee and Boot, 1955). Pôsobenie rovnakého faktoru taktiež vyvolá, u pohlavne nedospelých samíc, oddialenie nástupu puberty (Colby and Vandenberg, 1974).

**Bruce efekt** = Blokácia gravidity. Samice po nedávnom párení vykazovali vysokú mieru neúspešnej gravidity potom, čo boli vystavené pachu samca, iného než toho, s ktorým kopulovali (Bruce, 1959).

### 1.3. Moč

Moč je najpreskúmanejším zdrojom chemických signálov u myši domácej. Typickým spôsobom komunikácie tohoto signálu je značkovanie. Každý člen skupiny prezentuje svoje sociálne postavenie a vzájomnú príbuznosť zanechávaním močových značiek (Hurst, 1987; Drickamer, 1989). Signály takto sprostredkované majú mnoho funkcií a schopnosť vyvolať zásadné zmeny v chovaní aj fyziológii (pozri predchádzajúci text).

Moč myši domácej obsahuje špecifické proteíny, ktoré sú schopné viazať a transportovať rôzne typy prchavých ligandov. Tieto proteíny patria do rodiny lipokalinov. Je to skupina malých extracelulárnych proteínov o veľkosti 17-40kDa a špecifickej terciárnej štruktúre. Sú tvorené ôsmymi antiparalelnými beta-listmi, spojenými vodíkovými mostíkmi, a tak utvárajú tzv.  $\beta$ -barel. Tento  $\beta$ -barel predstavuje väzobné miesto pre rôzne ligandy.



**Obr. č. 3: Štruktúra hlavného močového proteínu.** A – H označuje 8 beta-listov, ktoré vytvárajú  $\beta$ -barel. C, N označujú N-terminálny a C-terminálny koniec proteínu. Prevzaté z (Beynon and Hurst, 2004).

U myši existuje niekoľko skupín lipokalinov, z ktorých hlavné močové proteíny (skr. MUP, z angl. major urinary protein) a odoranty viažuce proteíny (skr. OBP, z angl. odorant binding protein) sú najčastejšie študované v spojení s chemickou komunikáciou.

Hlavné močové proteíny (MUP) sú najpreskúmanejšou skupinou lipokalinov. Sú syntetizované hlavne v pečeni, odkiaľ sa krvným riečiskom dostávajú do obličiek, kde sa glomerulárnou filtráciou dostávajú do moči. Tým, že na seba viažu látky s nízkou molekulovou hmotnosťou, prepravujú ich von z tela a následne zabezpečujú ich pomalé uvoľňovanie, zohrávajú nenahraditeľnú úlohu pri značkovaní. Ligandami naviazanými v  $\beta$ -barele MUP môžu byť jednak degradačné produkty metabolizmu, ale taktiež látky sprostredkovávajúce určitú informáciu. Nie je ani vylúčené, že sa tak môže diať zároveň (Kwak et al., 2016). Komplex proteín-ligand, nesený ligand, ale podľa niektorých autorov aj samotný proteín, môže predstavovať pachový signál (Singer et al., 1987; Roberts et al., 2010). MUP teda nie sú dôležité len v odvádzaní odpadných látok z tela, ale majú zásadnú úlohu aj v chemickej komunikácii.

Zatiaľ bolo popísaných 21 hlavných močových proteínov, ktorých expresia sa u myši domácej značne líši nielen medzi pohlaviami, ale aj medzi jedincami (Hurst et al., 2001; Beynon and Hurst, 2003). Zmeny hladiny expresie MUP sú dokonca zaznamenané aj v priebehu estrálneho cyklu. Najvyššia hladina expresie MUP u samíc bola zaznamenaná práve deň pred estrom, čo koreluje s maximálnou hladinou estradiolu. Samice teda pomocou značkovania, a v rámci toho pomocou zmien k koncentrácii MUP, zverejňujú svoje štádium v estrálnom cykle (Stopka et al., 2007). U samcov všeobecne platí, že vykazujú vyššie hladiny expresie MUP než samice (Stopková et al., 2007). Ako dokazujú nedávne výskumy, MUP sú nenahraditeľnou súčasťou sociálnej komunikácie myši (Janotova and Stopka, 2011; Lee et al., 2017; Thoß et al., 2019). Získanie teritória u samcov je sprevádzané takmer zdvojnásobením produkcie MUP v moči. Dominantní samci prezentujú svoje postavenie taktiež takýmto rapidným nárastom. Naopak samice, ktoré boli vystavené spoločnosti so samcami, znížili produkciu MUP. Z uvedeného vyplýva, že regulácia expresie MUP, napomáha jedincovi prispôbiť sa rôznym sociálnym kontextom (Stopka et al., 2007).

Aj samotné ligandy môžu predstavovať chemický signál. U určitých látok boli preukázané zásadné vplyvy na fyziológiu a chovanie u jedincov myši domácej (Novotny, 2003). Tak napríklad 2,5-dimethylpyrazine, prenášaným hlavným močovým proteínom, spôsobuje oneskorenie puberty (Jemiolo and Novotny, 1994), a teda, už

vyššie popísaný, Lee-Boot efekt. Naopak 2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazol pubertu akceleruje a vyvoláva synchronizáciu estra u spolu žijúcich samíc (Jemiolo et al., 1986; Novotny, et al., 1999). Terpenické látky  $\alpha$ - a  $\beta$ -farnesen prítomné v moči samcov sú jednak pohlavne špecifické, ale taktiež predstavujú tzv. averzivný signál, pomocou ktorého dominantní samci demonštrujú svoje sociálne postavenie a vymedzujú vlastné teritórium. Sú to zároveň látky, ktorým je prisudzovaná funkcia samičích atraktantov (Novotny et al., 1990). Zoznam všetkých, takto preskúmaných, ligandov uvádza tabuľka č. 1.

Názov	Zdroj	Pohlavie	Funkcia
2,5-dimethylpyrazine	moč	♀	Oddialenie puberty
2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazol	moč	♂	Urýchlenie nástupu puberty, synchronizácia estra, atrahovanie samíc, agresívne chovanie u samcov
2,3-dehydro-exo-brevicomín	moč	♂	Urýchlenie nástupu puberty, synchronizácia estra, agresívne chovanie u samcov
E,E-a-farnesene, E-b-farnesene	prepuciálna žľaza	♂	Urýchlenie nástupu puberty, synchronizácia estra, agresívne chovanie u samcov
2-heptanone	moč	♀	Synchronizácia estra
6-hydroxy-6-methyl-3-heptanone	moč	♂	Urýchlenie nástupu puberty
methylthiomethanethiol	moč	♂	Atrahovanie samíc

**Tab. č. 1: Chemické signály u myši domácej.** Prevzaté z (Stopka et al., 2012).

Odoranty viažuce proteiny (OBP) sú menej preskúmanou skupinou lipokalinov vyskytujúcich sa u myši domácej. Majú typickú štruktúru, ktorá im umožňuje viazať prchavé ligandy. OBP sa okrem moči (Stopkova et al., 2010) hojne vyskytujú v nazálnej mukóze (Pes et al., 1992; Kuntová et al., 2018), slinách (Stopkova et al., 2010), slzách (Stopkova et al., 2017) a vaginálnych sekrétoch (Kruhøffer et al., 1996; Briand et al., 2004; Černá et al., 2017). Nepochybne zastávajú rôzne dôležité funkcie, je preto potreba napredovať v ich skúmaní.



## 1.4. Vaginálne sekréty

Vaginálne sekréty a ich zložky predstavujú dôležitý signál v reprodukčnom chovaní hlodavcov. Prvý študovaný druh v tejto oblasti bol škrečok zlatý (*Mesocricetus auratus*). Samice tohoto druhu vylučujú vo svojich vaginálnych sekrétoch proteín zvaný afrodisin. Tento proteín patriaci do skupiny OBP, stimuluje u samcov škrečka zlatého kopulačné chovanie (Singer et al., 1986, 1987). Pri jeho objave sa predpokladalo, že proteín samotný je zodpovedný za vyvolanie behaviorálnej reakcie, a že je jedným z mála doložených neprchavých chemických signálov. Neskoršie výskumy však potvrdili, že samotný proteín očakávanú reakciu nevyvoláva (Singer and Macrides, 1990). Je preto zrejmé, že len komplex proteín-ligand plní funkciu chemického signálu.

Z pozorovaného chovania myši domácej je zrejmé, že aj u tohoto druhu vaginálne sekréty samcov atrahujú a poskytujú im určité informácie (Brown, 1985; Latham and Mason, 2004). Aj keď existuje evidencia, že vaginálne sekréty ovulujúcich samíc navodzujú kopulačné chovanie u samcov (Hayashi and Kimura, 1974), nebola doposiaľ u myši objavená žiadna funkčná analógia afrodisinu. Výskumy lipokalinov z vaginálnych sekrétoch však ukázali jednoznačnú cyklicitu produkcie hlavných močových proteínov (MUP9, MUP17, MUP20), a taktiež proteínu OBP5, ktorý je ortológom afrodisinu u škrečka (Černá et al., 2017). Tie dosahujú maximálnych hladín práve tesne pred estrom, a ako už bolo uvedené, sú hlavným transportérom potenciálnych chemických signálov. Je preto pravdepodobné, že hrajú dôležitú úlohu v sexuálnej signalizácii. Vaginálne sekréty, spolu s močom, využívajú samice ako hlavný indikátor nastávajúceho estra.

Rôzne fázy estrálneho cyklu sa líšia nielen produkciou lipokalinov, ale aj zložením, a hlavne množstvom, vaginálnej mikrobioty (Cowley and Heiss, 1991). V období proestra a estra, je činnosť imunitného systému v reprodukčnom trakte znížená, čo spôsobuje nárast populácie baktérií. Ako už bolo spomenuté, jednou z funkcií lipokalinov je odvádzať potenciálne škodlivé látky z tela. Je preto pravdepodobné, že zvýšená produkcia MUP v období estra súvisí s nárastom bakteriálnej populácie. Funkcia lipokalinov ako akejsi „upratovacej čaty“ je totiž pravdepodobne paralelná, najskôr aj pôvodná, s ich funkciou komunikačnou (Stopková et al., 2009). Tento vzájomný vývoj popisuje tzv. hypotéza toxického odpadu (z angl. toxic waste hypothesis) (Stopková et al., 2009). Tá tvrdí, že pôvodnou funkciou

lipokalinov bol transport toxických substancií von z tela. Práve tieto substancie, hlavne tie pohlavne-dimorfne, boli následne ideálnym zdrojom pre selekciu a utváranie chemickej signalizácie (Stopková et al., 2009). Zároveň totiž vypovedajú o metabolickej aktivite jedinca a jeho individuálnej kvalite, v zmysle, schopnosti obrany proti patogénom.

## 1.5. Slzy a sliny

Prvý krát bola signalizačná funkcia slíz, konkrétne sekrétov lakrimálnych žliaz, doložená u škrečka zlatého (*Mesocricetus auratus*) (Payne, 1976, 1979). Stery z Harderovej žľazy odhalili, že sú tieto sekréty pohlavne-dimorfné, a taktiež veľmi atraktívne či už pre sexuálne naivných alebo skúsených samcov. Z uvedeného pokusu vyplynulo, že samičie sekréty boli pre samcov signifikantne atraktívnejšie než tie samčie. Predpokladalo sa preto, že chemické signály z oblasti hlavy majú veľký význam u tunely-tvoriacich hlodavcov. Neskôršie výskumy ukázali, že sekréty Harderovej žľazy sú pohlavne dimorfné aj u druhu *Microtus pennsylvanicus* (Ferkin and Johnston, 1995).

Aj keď si myš domáca tunely v zásade nehrabe, je doložené, že pri sociálnom kontakte je najčastejšie preskúmanou oblasťou tela oblasť cefalická (Luo et al., 2003). Už to nasvedčuje tomu, že sekréty tejto časti tela hrajú v chemickej komunikácii myši veľmi dôležitú úlohu. Lakrimálne žľazy a následne ich ústie, oči, sú pomocou nasolakrimálnych duktov spojené s nosnou dutinou, dutinou vomeronasálneho orgánu a finálne aj s dutinou ústnou. Kvôli tomuto, v podstate kontinuálnemu prepojeniu, je nevyhnutné skúmať chemické signály celej tejto oblasti vo vzájomnej súvislosti. Nie je preto prekvapujúce, že určité látky nachádzané v slinách môžu mať pôvod napríklad v slzných žľazách (Stopka et al., 2016). Pri selfgroomingu sa následne tieto látky za pomoci slín dostávajú na srst', kde môžu ďalej slúžiť ako chemický signál. U hraboša pennsylvánskeho (*Microtus pennsylvanicus*) bolo pozorované, že samci vystavení pachom jedincov opačného pohlavia vykazovali vyššiu mieru selfgroomingu než tí, vystavení pachom rovnakého pohlavia. Ďalším zaujímavým poznatkom bola zvýšená intenzita selfgroomingu u samcov, ako odpoveď na pachy kastovaných samíc s hormonálnou substitúciou, oproti pachom kastovaných samíc bez hormonálnej substitúcie (Ferkin et al., 1996). Je preto pravdepodobné, že takéto pachové značky nielenže hrajú dôležitú úlohu v sociálnej komunikácii, majú najskôr aj funkciu v aktívnom výbere sexuálneho partnera.

V myších slzách boli v nedávnom výskume detegované pohlavne-dimorfné proteíny, patriace do rodiny lipokalinov. Sekréty lakrimálnych žliaz teda slúžia ako pohlavne-špecifický chemický signál. Naopak tu boli u oboch pohlaví objavené aj proteíny, ktoré boli doposiaľ považované len za čisto samčie, ako sú MUP20 a OBP6 (Stopkova et al., 2017). Veľa ďalších objavených proteínov slúži pravdepodobne k ich

primárnej funkcii, a to odvádzaniu škodlivých látok. Tieto objavy opäť vypovedajú o pravdepodobnej polyfunkčnosti tejto skupiny proteínov a správnosti hypotézy koevolúcie odstraňovania odpadu a chemickej komunikácie (Stopková et al., 2009).

Sliny sú ďalším dôležitým chemosignálom u hlodavcov. U škrečka zlatého vykazovali estrálne samice signifikantne väčší záujem o sliny samčie než o tie samičie (Gray et al., 1984). Samci tohoto druhu a taktiež samci hraboša pensylvánskeho, jednoznačne diskriminovali sliny samčie pred tými samičimi (Ferkin and Johnston, 1995; Johnston, 2003). U myši domácej bolo v slinách popísaných až 21% pohlavne-dimorfných proteínov (Stopka et al., 2016). Sliny teda predstavujú, v poradí už ďalší, pohlavne-špecifický chemosignál u myši. Selfgroomingom sú navyše rozťierané po tele jedinca a majú tak veľký potenciál pôsobiť aj ako dlhotrváčne, postupne sa uvoľňujúce, značky. Ústna dutina je zároveň miestom zberu exogenných látok (vdýchnutých či požitých) i vlastných produktov nasolakrimálnych dutín, a taktiež miestom prvých tráviacich procesov. Dochádza tu k metabolickej degradácii za uvoľňovania rôznych, napr. aj prchavých, látok. Je preto pravdepodobné, že akákoľvek chemická komunikácia spojená so slinami, bude najskôr poskytovať aj informáciu o zdravotnom stave jedinca, či miery jeho obranyschopnosti proti patogénom. Pre pochopenie komplexnosti informácie, ktorú sliny poskytujú, je teda nevyhnutné, detailné preskúmanie jednotlivých zložiek slín.

## **2. Ciele diplomovej práce**

### **2.1. Analýza chovania pri interakcii samca a samice myši domácej**

Tradične bolo skúmanie chovania súvisiaceho s chemickou signalizáciou u myši domácej zamerané prevažne na močové značky. Z dôvodu vysokého obsahu MUP v moči, bola moč dlho považovaná za primárny signál v komunikácii myši, aj napriek tomu, že je to signál asynchrónny. To znamená, že je vysielaný bez ohľadu na prítomnosť prijímajúceho jedinca. Hlavnou funkciou močových značiek je poskytovať a uchovávať signál aj v neprítomnosti zdroja signálu. To je nepochybne obrovskou výhodou u druhov žijúcich solitérnym spôsobom života. Myš domáca je však druh sociálny, koloniálny, preto je nevyhnutné skúmať aj signály spojené s interakciami, ktoré tento spôsob života prináša. Je doložené, že v sociálnej komunikácii je najviac preskúmanou časťou tela myši hlava (Luo et al., 2003). Myši majú v tejto oblasti viacero významných zdrojov chemických signálov. Doposiaľ však nebola urobená detailná analýza, popisujúca priebeh primárnej interakcie dvoch jedincov opačného pohlavia. Predpokladom totiž je, že práve preskúvanie tejto časti tela poskytuje myšiam základné informácie o identite jedinca, vzájomnej príbuznosti či jeho fyzickej kondícii a zdravotnom stave. Až následne po zhodnotení vhodnosti jedinca k páreniu, je zisťovaný jeho reprodukčný stav. Práve analýza sociálnych interakcii jedincov myši domácej môže priniesť nové poznatky o pôvode a dôležitosti jednotlivých chemických signálov. Výsledky takejto analýzy môžu následne viesť k upresneniu zdroja dôležitých chemických signálov a stáť sa tak vstupným bodom pre ďalšie podrobné skúmanie. Cieľom tejto časti diplomovej práce je detailne charakterizovať presnú sekvenciu primárnej interakcie medzi samcom a samicou a stanoviť variabilitu tejto interakcie v rôznych fázach estrálneho cyklu samice.

## **2.2. Analýza slín ako jedného z dôležitých chemických signálov**

Sliny predstavujú v komunikácii myši domácej nezastupiteľnú úlohu. Zbiehajú sa tu ústia nasolakrimálnych dutín a s nimi aj všetky signály pochádzajúce z týchto oblastí. Zároveň tu dochádza k prvým metabolickým procesom, čo prináša nový spôsob nahliadania na pôvod potenciálneho signálu. Chemický signál totiž nemusí vždy predstavovať látka syntetizovaná samotným organizmom. Často krát túto úlohu zohrávajú látky exogénneho pôvodu, či už látky produkované baktériami alebo vznikajúce ich degradáciou alebo látky pochádzajúce z potravy. Navyše sú sliny pomocou selfgroomingu rozťierané po srsti rôznych častí tela a tým zastávajú funkciu pachových značiek, ktoré si jedinec nosí vždy so sebou. Volateľné látky tak môžu byť postupne zo srsti uvoľňované a poskytovať rôzne informácie počas sociálneho kontaktu.

Cieľom analýzy slín je zistiť, či existujú rozdiely v zložení volateľných látok medzi pohlaviami, a či by mohli sliny fungovať ako primárny pohlavne špecifický signál. Ďalej je cieľom preskúmať jednotlivé substancie nachádzajúce sa v slinách a pokúsiť sa zistiť ich pôvod.

## **3. Metodika**

### **3.1. Analýza chovania**

#### **3.1.1. Myš domáca**

V experimente boli použítí dospelí jedinci druhu *Mus musculus*, pochádzajúci z odchyty v Českej republike, konkrétne v lokalite Světlá Hora a Bohnice. Odchyt sa uskutočnil v roku 2017. Celkovo sa experimentu zúčastnilo 14 jedincov, 7 samíc a 7 samcov. Myši boli umiestnené oddelene, v plastových nádobách s podstielkou, s prístupom k pitnej vode a štandardnej kŕmnej zmesi ST-1 (Velaz) ad libitum. Teplota v miestnosti bola udržiavaná na  $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  a vlhkosť vzduchu na približne 32%. Svetelný režim bol nastavený na 14 hodín svetla a 10 hodín tmy. Deň pred zahájením experimentu, bola do nádob so samicami umiestnená malá časť podstielky so samčím močom.

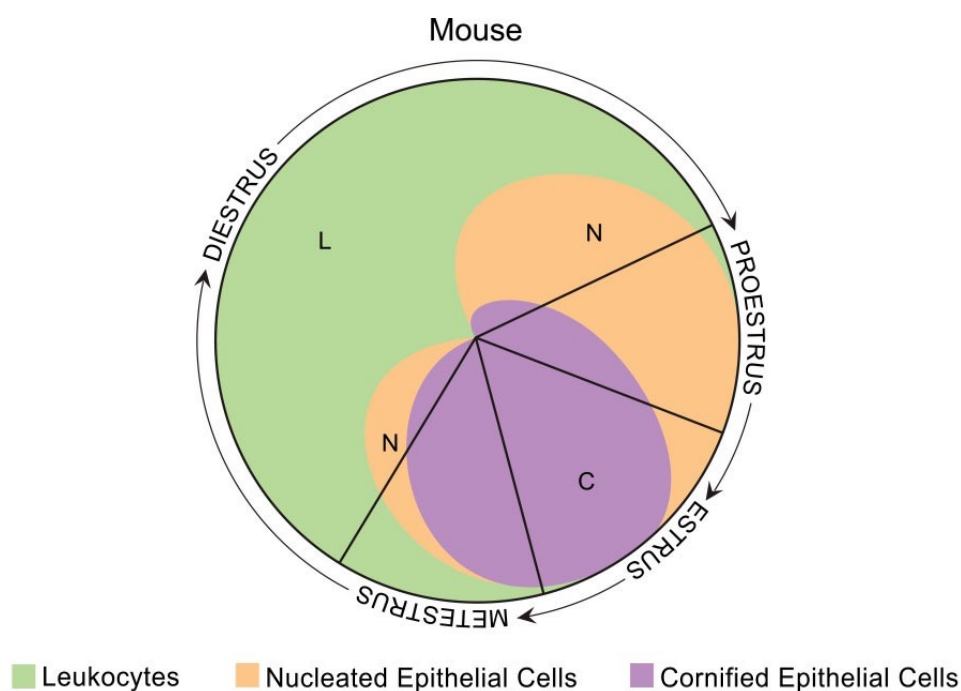
#### **3.1.2. Pozorovanie a záznam chovania**

Pozorovanie a záznam chovania prebiehalo 7 po sebe nasledujúcich dní. Každý deň bolo zloženie pozorovaného páru obmieňané tak, že sa v priebehu 7 dní vystriedali všetky samice so všetkými samcami. Interakcia samca a samice sa odohrávala v otvorenej plastovej aréne. Pred spustením záznamu boli samec a samica umiestnení v oddelených sklenených nádobách. Pozorovanie a záznam prebiehalo 5 minút. Konalo sa vždy medzi 17:00 až 20:00. Pozorovanie bolo nahrávané pri tlmenom svetle, kamerou s vysokým rozlíšením. Kamera bola umiestnená tesne nad arénou s myšami tak, aby snímala celé pole. Po ukončení pozorovania a odbere vzoriek, boli myši opäť umiestnené oddelene do príslušných nádob.

#### **3.1.3. Odber vzoriek a určenie fázy estrálneho cyklu**

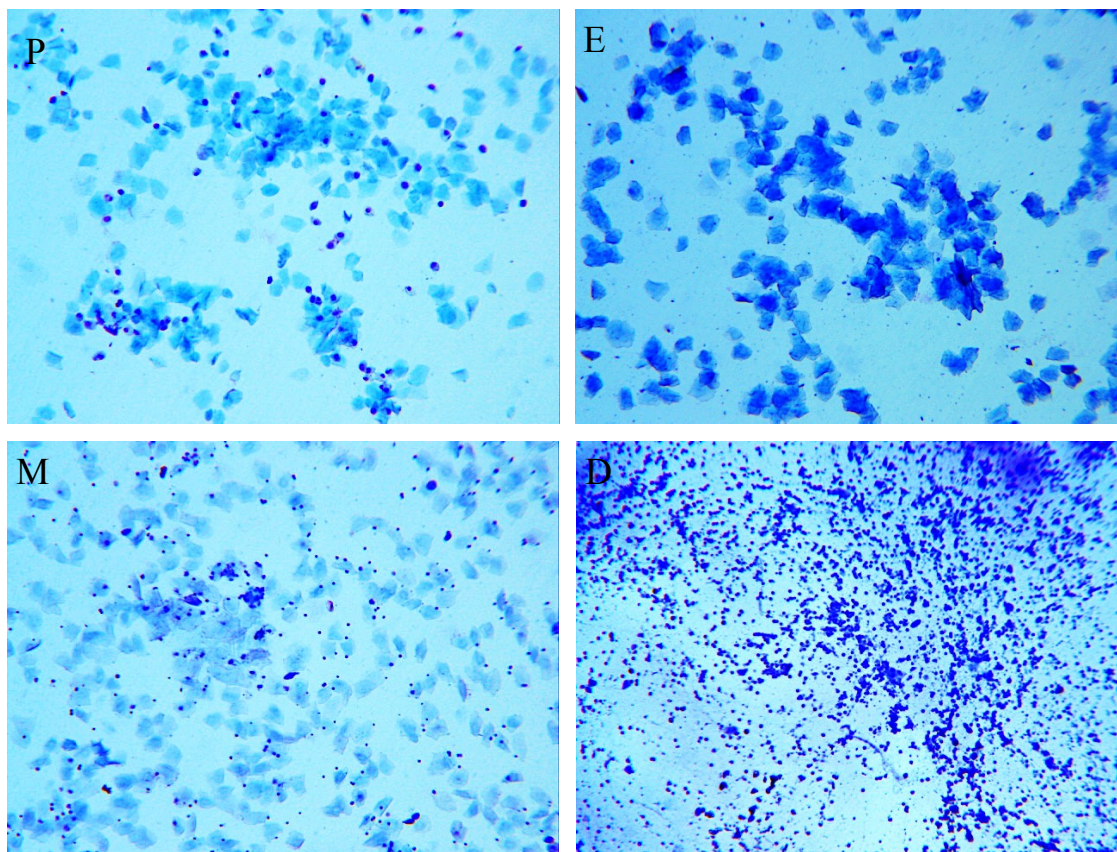
Po ukončení každého pozorovania bol samici urobený vaginálny výplach s pomocou pipety a 20  $\mu\text{l}$  fyziologického roztoku. Ihneď po odbere boli odobrané vzorky umiestnené na podložné sklíčko. Po zaschnutí boli po dobu 5 minút farbené v roztoku May-Grünwald, následne vložené na 1 minútu do PBS pufru a nakoniec

ponechané ďalších 7 minút v Giemsa roztoku. Po vyschnutí takto nafarbeného preparátu boli sklíčka analyzované pod mikroskopom. Bolo rozlišované medzi 4 fázami estrálneho cyklu: proestrus, estrus, metestrus a diestrus, a to na základe rôznych pomerov troch typov buniek: epiteliálne bunky s jadrom, keratinizované epiteliálne bunky bez jadra a leukocyty. Pomery buniek v jednotlivých fázach ilustruje obrázok č. 4. Ukážky histologických preparátov jednotlivých fáz cyklu zobrazuje obrázok č. 5.



**Obr. č. 4: Estrálny cyklus.** Grafické znázornenie pomerov jednotlivých typov buniek v priebehu estrálneho cyklu. Prevzaté z (Cora et al., 2015).





**Obr. č. 5: Ukážky mikroskopických preparátov vaginálnych sterov pod svetelným mikroskopom.**

Označenie fáz: P – proestrus, E – estrus, M – metestrus, D – diestrus.

Farbené pomocou May-Grünwald a Giemsa roztoku. Zväčšenie: 200x.

### 3.1.4. Spracovanie etologického pozorovania

Pozorované chovanie bolo vyhodnocované pomocou softwaru The Observer 8.0. Chovanie bolo rozdelené do 14 kategórií, z toho kategória oňuchávanie (angl. sniff) mala ďalších 9 tzv. upresňujúcich prvkov (angl. modifiers). Sledované kategórií sú uvedené v tabuľke č. 2. Celkovo bolo vyhodnotených 49 pozorovaní.

Kategórie chovania	Popis
approach	jedinec sa približujem k druhému jedincovi
approach anogenitals	jedinec sa približuje k anogenitálnej oblasti druhého jedinca
contact	jedinci sú v tesnej blízkosti, ale bez prejavov iných kategórií chovania
defend	jedinec sa bráni kontaktu s druhým jedincom
escape	jedinec uniká pred druhým jedincom
explore	jedinec skúma okolie, neprejavuje záujem o druhého jedinca
groom	jedinec sa čistí
nonsocial	oba jedinci sú od seba vzdialený a neprejavujú o seba záujem
oral contact	ústne otvory oboch jedincov sú vo fyzickom kontakte
oral contact anogenitals	ústny otvor jedinca je vo fyzickom kontakte s anogenitálnou oblasťou druhého jedinca
sniff : anogenitals, back, chest, ear, eye, flank, mouth, nose, tail	oňuchávanie rôznych oblastí tela druhého jedinca: anogenitálie, chrbát, hrud', ucho, oko, bok, ústa, nos, chvost
sniff mark	oňuchávanie vylúčenej moči alebo trusu
squeak	hlasová vokalizácia
wait	jedinec zotrúva v stabilnej polohe v prítomnosti druhého jedinca, neprejavuje o kontakt záujem

Tab. č. 2: Etogram.



**Obr. č. 6: Ilustračné fotografie rôznych typov chovania.**

**Z archívu Mgr. Romany Stopkové, Ph.D.**

A – approach, B – sniff nose, C – sniff mouth, D – sniff eye,  
E – sniff ear, F – sniff back, G – squeak, H – sniff anogenitals

## Význam kategórií chovania v kontexte pozorovania

U niektorých kategórií chovania je potrebné upresniť ich význam v kontexte celého pozorovania. *Approach anogenitals* – prístup k anogenitálnej oblasti za účelom získania chemických signálov emitovaných v tejto časti tela. Dôvodom je pravdepodobne zistenie reprodukčného štádia samice. *Sniff* – oňuchávanie akejkoľvek časti tela dokladá, že chemické signály tohoto pôvodom majú pre jedinca dôležitú informáciu. *Contact* a *wait* sú kategórie s takmer rovnakým významom, používané z technických dôvodov. Obe tieto kategórie vypovedajú o tolerovaní fyzického kontaktu s druhým jedincom, a patria k tzv. kontaktným kategóriám. Termín kontaktné kategórie je používaný v nasledujúcich kapitolách a jeho hlavný význam je opak kategórie tzv. nekontaktných, či obranných typov chovania. K skupine nekontaktných kategórií patrí najmä *defend*, *escape*, *squeak*, *explore*. Všetky vypovedajú o odmietaní fyzického kontaktu s druhým jedincom.

### 3.1.5. Štatistická analýza chovania

Pozorované chovanie bolo skúmané pomocou analýzy dyadických interakcií metódou neurálnych sietí. Pre analýzu neurálnych sietí boli použité matice s dyadickými behaviorálnymi tendenciami. Tieto tendencie, ktoré možno nazývať aj motivačnými indexmi, vyjadrujú pomer počtu prechodov chovania A do chovania B a celkového výskytu chovania A, vzťahnutý k priemernej dĺžke behaviorálnej kategórie A. Matice jednotlivých štádií estrálneho cyklu, proestrus, estrus a metestrus, boli medzi sebou korelované pomocou Mantelovho permutačného testu. Metestrus a diestrus boli zlúčené do jednej kategórie, a to metestrus. Na identifikáciu kategórií, ktoré najviac odlišovali jednotlivé fázy bola urobená redukcia interakcií o 50% (odstránenie tendencií s hodnotami menšími než 0,3). Na znázornenie najdôležitejších prvkov chovania v každej fáze cyklu boli zostrojené sieťové grafy, naznačujúce jadro, či uzol, siete.



## 3.2. Analýza slín

### 3.2.1. Odber vzoriek

V druhom experimente boli použité rovnakí jedinci druhu *Mus musculus* ako v prvom experimente, ale počet bol navýšený o 6 jedincov, tri samice a troch samcov. Celkovo sa tejto časti zúčastnilo 20 jedincov, v pomere pohlaví 1:1.

Odber slín bol vykonaný výplachom ústnej dutiny 20  $\mu$ l fyziologického roztoku. U každého jedinca to bolo zopakované trikrát. Vzorky boli uložené do - 80 °C.

### 3.2.2. GS-MS

Prchavé látky zo slín myši domácich boli vzorkované metódou mikroextrakcie vláknom nad kvapalnou fázou slín ( angl. headspace SPME). Bolo použité vlákno s extrakčnou fázou tvorenou zmesou divinylbenzen/carboxen/polydimethylsiloxan (DVB/CAR/PDMS – šedé; Supelco, USA). Extrakcia látok prebiehala pri teplote 55 °C po dobu 10 minút. Nasorbované látky boli následne analyzované metódou komprehensnej dvojrozmernej plynovej chromatografie s hmotnostnou detekciou (GCxGC-TOF/MS). Bol použitý prístroj Pegasus 4D od firmy Leco scientific vybavený kryomodulátorom na kvapalnú dusík a robotickým autosamplerom MPS (Gerstel, Nemecko). Separácia prebiehala na kolónach TR FAME (primárna kolóna, Thermo Scientific, USA) a Rxi-5sil MS (sekundárna kolóna, Restek, Austrália). Analýza prebiehala za nasledujúcich podmienok: teplota nástrekového priestoru 245 °C, nástrekový mód – splitless, rýchlosť nosného plynu (hélium) 1ml/min. Obe kolóny boli umiestnené každá v nezávislej vyhrievacej peci (primárna a sekundárna). Teplotný program na primárnej peci bol nastavený nasledovne: 35 °C (1 min) - 10 °C /min do 250 °C (3 min). Teplota na sekundárnej peci bola nastavená tak, aby bola po celú dobu analýzy o 5 °C vyššia než teplota v primárnej peci. Modulačná perióda trvala 4 sekundy, horúci aj chladný pulz bol nastavený na 1 sekundu. Teplota transferline do hmotnostného detektoru bola nastavená na teplotu 280 °C. Hmotnostný detektor bol vybavený elektrónovou ionizáciou (EI) a Time-of-Flight (TOF) hmotnostným analyzátorom. Prístroj bol ovládaný programom ChromaTOF 4.51 (Leco, USA) a rovnaký program bol použitý aj na vyhodnotenie nameraných dát. Hmotnostné

spektrá nájdených látok boli porovnané s knižnicou hmotnostných spektier (NIST MS 2.2, USA). Retenčné indexy boli analytom priradené na základe porovnania retenčného chovania s lineárnymi uhľovodíkmi. Údaje boli filtrované podľa Fisherovho pomeru. Analyty s hodnotou vyššou než 3 boli použité do analýzy pohlavného dimorfizmu.

### **3.2.3. Štatistická analýza údajov z GC-MS**

Vstupnými údajmi bolo 20 analytov s Fisherovým pomerom väčším než 3. Súbor nemal normálne rozloženie, preto bol na analýzu rozdielov v intenzite signálov použitý neparametrický Kruskal-Wallisov test. Na zistenie vplyvu pohlavia na rozloženie nášho súboru bola použitá metóda sPLS-DA (z angl. Sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis). Táto metóda funguje obdobne ako metóda analýzy hlavných komponentov (skr. PCA, z angl. Principal Component Analysis), avšak na určenie komponentov vysvetľujúcich pozorovanú variabilitu využíva metódu najmenších štvorcov. Všetky analýzy boli robené pomocou softwaru R.

## 4. Výsledky

### 4.1. Analýza chovania

V tejto diplomovej práci je na chovanie nahliadané ako na určitý hierarchicky organizovaný proces. Preto boli na jeho analýzu použité metódy neurálnych sietí. Pre analýzu týchto neurálnych sietí boli použité matice s dyadickými behaviorálnymi tendenciami. Tieto tendencie predstavujú určitú motiváciu, či pravdepodobnosť, s akou bude po chovaní typu A nasledovať chovanie typu B. Tieto behaviorálne tendencie boli analyzované v 3 kategóriách, a to podľa štádia estrálneho cyklu. Štádium metestrus a diestrus boli zlúčené do jedného. Analyzované boli teda matice pozorovaní v proestre, estre a metestre. Matice v každej kategórii boli spriemerované a následne medzi sebou korelované pomocou Mantelovho permutačného testu. Test preukázal, že všetky tri matice sú signifikantne korelované, to znamená, že medzi jednotlivými štádiami je veľká podobnosť štruktúry interakcií. Celkový korelačný koeficient  $r$  je však relatívne nízky ( $r=0.2719$ ,  $p=0.001$ ). Na detekciu korelácií medzi štádiami bol použitý Mantelov test pre jednotlivé páry a z výsledku je zrejmé, že najviac korelované sú štádia estrus a metestrus, ale rozdiely korelačných koeficientov medzi štádiami nie sú nijak výrazné (P~E:  $r=0.56$ ,  $p=0.003$ ; E~M:  $r=0.67$ ,  $p=0.003$ ; M~P:  $r=0.59$ ,  $p=0.003$ ). Pre identifikáciu kategórií chovania, ktoré významne odlišujú jednotlivé štádia, bola preto nutná redukcia dát v maticiach. Počet interakcií v maticiach bol znížený o polovicu (50%) tak, že všetky tendencie menšie než  $t = 0,3$  boli odstránené. Následne bola opäť urobená analýza korelácií a tie sa významne znížili a zhoršila sa aj hladina významnosti ( $r=0.2112$ ,  $p=0.03$ ). Korelácie medzi jednotlivými fázami sa taktiež znížili (P~E:  $r=0.28$ ,  $p=0.06$ ; E~M:  $r=0.28$ ,  $p=0.06$ ; M~E:  $r=0.32$ ,  $p=0.012$ ) a signifikantná zostala len korelácia medzi proestrom a metestrom ( $p=0.012$ ). Estrus sa tak po redukcii dát stal unikátnym štádiom, odlišným od proestra a metestra. Graficky tieto výsledky znázorňujú sieťové grafy pre jednotlivé štádia cyklu, uvedené na obrázku č. 7. Každá kategória chovania má priradený kruh, ktorý predstavuje jej latenciu. Čím väčší je obvod tohoto kruhu, tým bola latencia tohoto chovania väčšia. Latencie sú vyjadrené v sekundách, a teda kruhy s najmenším obvodom sú kategórie chovania, ktoré sa vyskytovali ako prvé. Farby predstavujú pohlavia. Rúžová samice, modrá samcov. Šípky medzi kruhmi prezentujú tendencie, či motivačné indexy, medzi kategóriami chovania. Čím hrubšia je šípka, tým väčšia je tendencia s akou bude

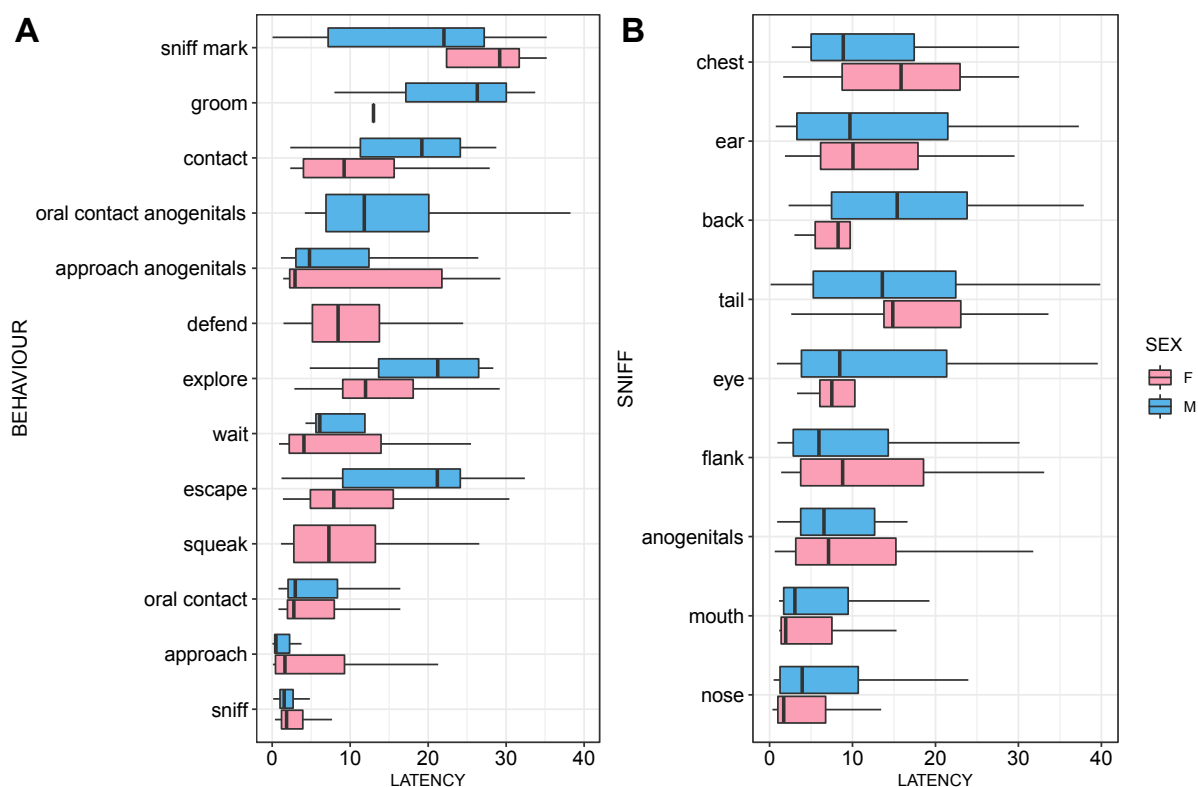
nasledovať chovanie, ku ktorému šípka smeruje. Grafy v prvom rade (proestrus, estrus, metestrus) predstavujú siete všetkých kategórií chovania v troch štádiách cyklu. V každom z týchto grafov je zrejmý tzv. sieťový uzol, či jadro, ku ktorému sa zbieha najviac kategórií chovania. Najzreteľnejší uzol je v štádiu estrus a predstavuje ho kategória s názvom M.sniff. Toto chovanie popisuje oňuchávanie samice samcom, a vyvoláva ho najviac behaviorálnych kategórií, či už samčích alebo samičích (predovšetkým samičích). Zo štruktúry taktiež vyplýva, že prevládajúcimi kategóriami v tomto štádiu sú kategórie kontaktné. Konkrétne oblasti najviac oňuchávané počas estra znázorňuje graf v druhom rade, ESTRUS(sniff). Z grafu vyplýva, že najprv je preskúmaná orofaciálna oblasť samice, následne stredná časť tela, konkrétne bok, a nakoniec časť anogenitálna. To presne zodpovedá predpokladanému záujmu samca u ovulujúcej samice. V prípade proestra je sieť menej organizovaná. To znamená, že neexistuje jediné jadro siete. Dôležitou kategóriou je tu opäť M.sniff, ale ďalšou významnou je kategória F.defend. F.defend predstavuje obranné chovanie samice pri kontakte so samcom. Je dôležité si všimnúť, že v mimocentrálnej oblasti je dôležitá kategória F.squeak, ktorá je alternatívou defenzívneho chovania samice, prejavujúca sa pískaním. V centre siete sa však nachádza aj F.sniff, kategória predstavujúca záujem samice o samca. Značný význam obranného chovania v tejto fáze naznačuje súvislosť s nepripravenosťou samice k páreniu.

Taktiež fáza metestra má neorganizovanú sieť. Objavuje sa tu viacero dôležitých centier. V dvoch z nich sa opäť nachádza F.defend a F.squeak. V ďalšom znova M.sniff. Oproti predchádzajúcim dvom štádiám sa javí metestrus ako najmenej štruktúrované štádium, s pravdepodobne najväčšou variabilitou. To môže súvisieť aj s rôznymi dĺžkami jednotlivých fáz cyklu. Metestrus spolu s diestrom totiž tvorí prevažnú časť reprodukčného cyklu.





Okrem behaviorálnych tendencií sme skúmali aj latencie jednotlivých kategórií chovania. Latencie popisujú čas, kedy dôjde k určitému typu chovania od začiatku pozorovania. Výsledné poradie jednotlivých kategórií u oboch pohlaví zobrazuje graf č. 1A. Graf č. 1B zobrazuje latencie pre jednotlivé kategórie chovania oňuchávanie. Z výsledku je zrejmé, že prvou aktivitou pri interakcii myší je oňuchávanie orofaciálnej oblasti, často nasledované orálnym kontaktom. Pri tomto kontakte pravdepodobne dochádza k fyzickému kontaktu so slinami druhého jedinca. Z toho jednoznačne vyplýva, že chemické signály celej orofaciálnej oblasti poskytujú myšiam nenahraditeľné informácie o identite a vlastnostiach jedinca. Graf latencií taktiež ukazuje, že až ako posledná aktivita sa umiestnilo oňuchávanie pachovej značky. Táto značka je predstavovaná močom a/alebo trusom jedinca opačného pohlavia. Z toho je zrejmé, že signály v značkách slúžia primárne ku komunikácii v neprítomnosti emitujúceho jedinca, a preto skúmanie chemickej signalizácie u myší len pomocou moči nie je dostačujúce.

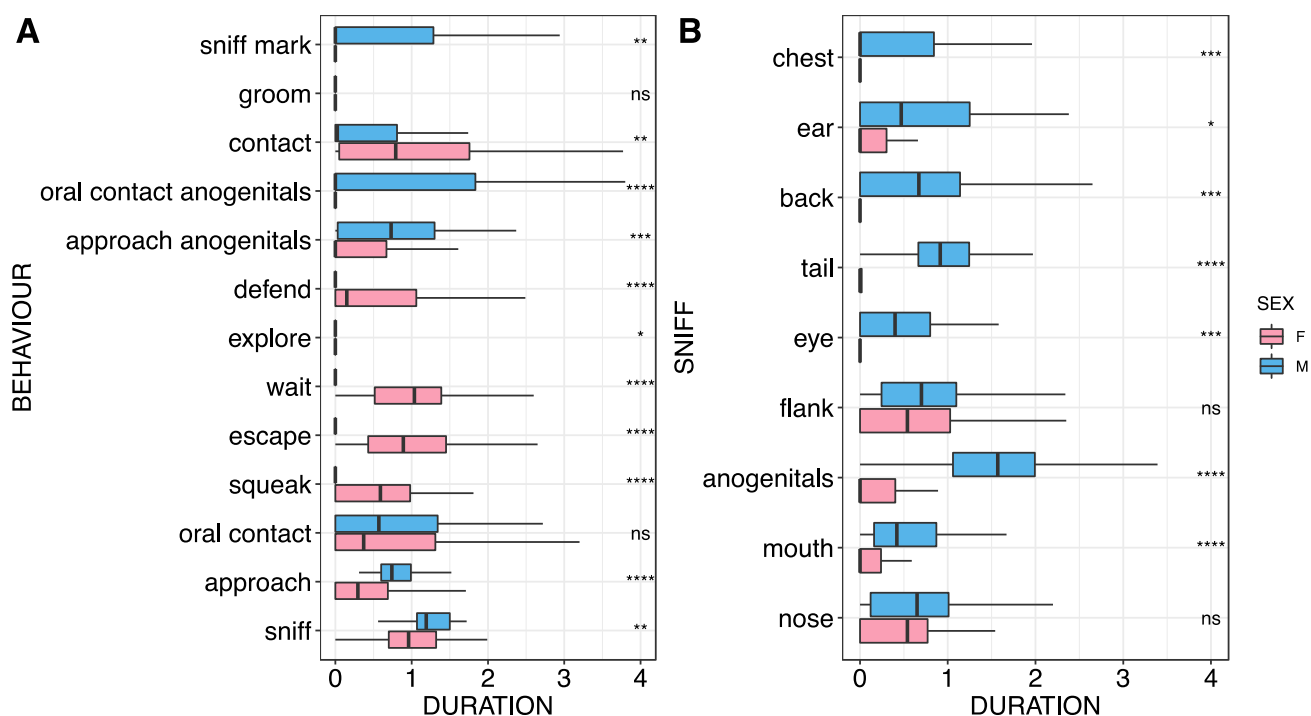


**Graf č. 1: Latencie behaviorálnych kategórií u oboch pohlaví.**

A – základné kategórie chovania. B – kategórie chovania oňuchávanie (sniff).

Rúžová farba – samice. Modrá farba – samci.

Ďalším parametrom, ktorý sme sledovali, a ktorý vypovedá o dôležitosti jednotlivých typov chovania v interakcii myši, je doba trvania jednotlivých behaviorálnych kategórii. Rozdiely v dĺžkach jednotlivých kategórii medzi samcom a samicou ukazuje graf č. 2. U oboch pohlaví bola značná časť interakcie venovaná oňuchávaniu, a to najmä orofaciálnej oblasti. Z hľadiska investovaného času do prístupu i samotného kontaktu, vyšiel u samcov jednoznačne veľký záujem o anogenitálnu oblasť samice.



**Graf č. 2: Doby trvania jednotlivých behaviorálnych kategórií u oboch pohlaví.**

A – základné kategórie chovania. B – kategórie chovania oňuchávanie (sniff).

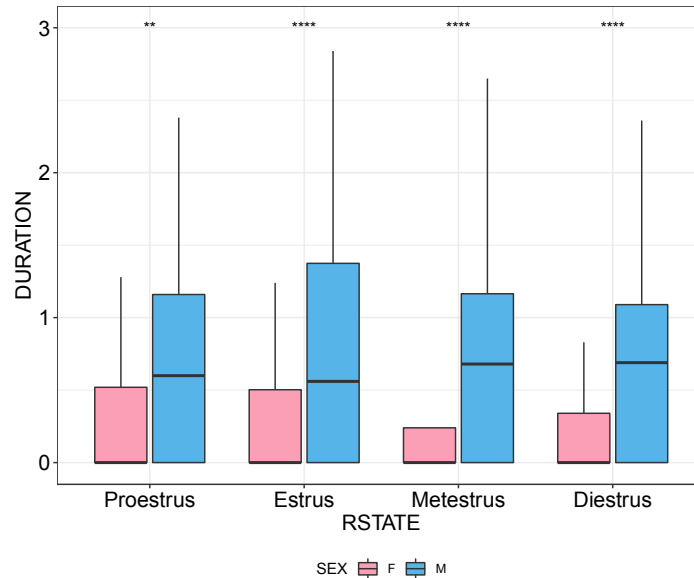
Rúžová farba – samice. Modrá farba – samci.

Legenda k signifikancii p-hodnoty:

'\*\*\*\*' – p-hodnota < 0.00005, '\*\*\*' – p-hodnota < 0.0005,

'\*\*' – p-hodnota < 0,005, '\*' – p-hodnota < 0.05, 'NS' – p-hodnota > 0.05

Graf č. 3 dokladá, že samci celkovo, naprieč všetkými reprodukčnými štádiami samice, investujú dvakrát toľko času do skúmania pachov než samice. Preto bola ako ďalší krok urobená analýza kategórie oňuchávanie (sniff) u samcov.



**Graf č. 3: Porovnanie doby trvania kategórie oňuchávanie medzi pohlaviami v rôznych štádiách reprodukčného cyklu.**

Rúžová farba – samice. Modrá farba – samci.

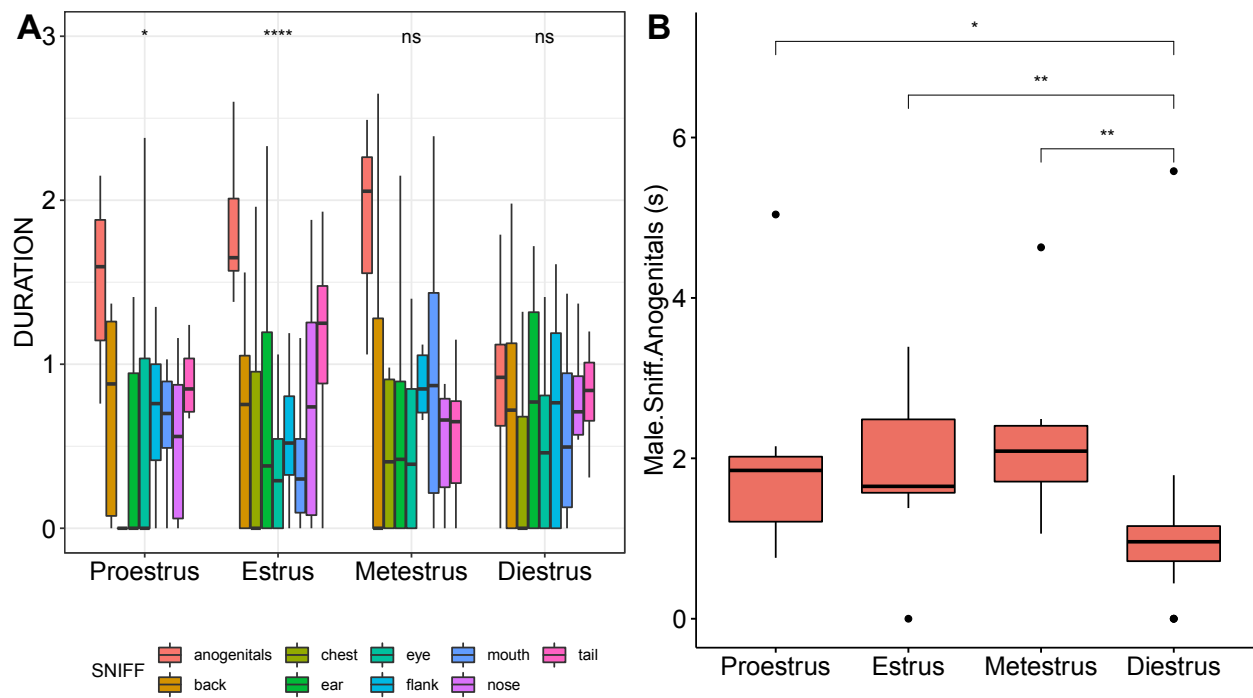
Legenda k signifikancii p-hodnoty:

'\*\*\*\*' – p-hodnota < 0.00005, '\*\*\*' – p-hodnota < 0.0005,

'\*\*' – p-hodnota < 0,005, '\*' – p-hodnota < 0.05, 'NS' – p-hodnota > 0.05

Graf č. 4A zobrazuje analýzu kategórie oňuchávanie u samcov. Je zrejmé, že anogenitálna oblasť je pre samcov zaujímavá hlavne vo fázach proestrus, estrus a metestrus. V diestre nie je zásadný rozdiel v oňuchávaných oblastiach. Ostatné časti tela samice sú investigované kontinuálne a približne rovnakou mierou počas celého cyklu. V estre je ešte zjavný zvýšený záujem o oblasť chvosta, kde sa pravdepodobne nachádza podchvostová žľáza (Gaisler and Zima, 2018)

Graf č. 4B ukazuje výsledok testovania signifikancie rozdielov v intenzite samčieho oňuchávania anogenitálnej oblasti samice, počas všetkých reprodukčných štádií. Výsledok dokladá pokles záujmu o túto oblasť v období diestra.



**Graf č. 4: Detailný rozbor trvania kategórie oňuchávanie (sniff) u samcov, vo všetkých štádiách reprodukčného cyklu.**

A – všetky kategórie chovania oňuchávanie (sniff) u samcov počas estrálneho cyklu.

B – oňuchávanie anogenitálnej oblasti počas estrálneho cyklu.

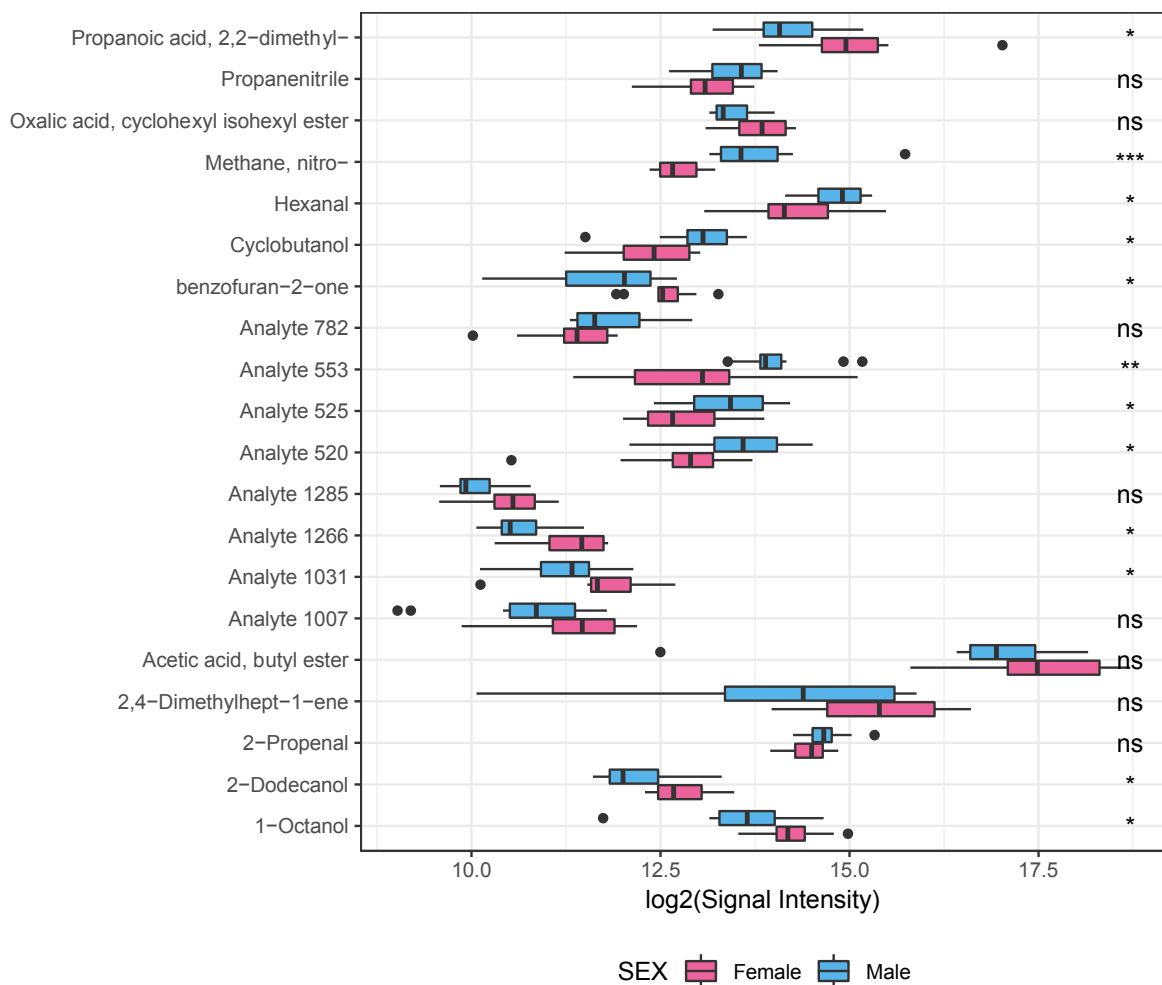
Legenda k signifikancii p-hodnoty:

'\*\*\*\*' – p-hodnota < 0.00005, '\*\*\*' – p-hodnota < 0.0005,

'\*\*' – p-hodnota < 0,005, '\*' – p-hodnota < 0.05, 'NS' – p-hodnota > 0.05

## 4.2. Analýza slín

Pomocou plynovej chromatografie sme vyseletovali 20 pohlavne dimorfných analytov. Miera pohlavného dimorfizmu bola testovaná dvoma spôsobmi: neparametrickým Kruskal-Wallisovým testom a ordinačnou analýzou sPLS-DA (skr. z angl. Sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis). Použitím Kruskal-Wallisovho testu sme u 12 analytov potvrdili signifikantný pohlavný dimorfizmus. Pohlavný dimorfizmus, charakterizovaný rozdielmi v intenzitách signálu, bol teda pozorovaný u 60% skúmaných látok. Zoznam týchto látok a mieru ich signifikancie uvádza tabuľka č. 3. Grafické znázornenie pohlavného dimorfizmu u jednotlivých analytov poskytuje graf č. 5.



**Graf č. 5: Pohlavný dimorfizmus v intenzite signálu jednotlivých látok.**

Os X – intenzita signálu. Os Y – jednotlivé analyty.

Boxploty vyjadrujúce variabilitu dát sú farebne odlišené pre obe pohlavia.

Rúžová - samice. Modrá – samci.

Legenda k signifikancii p-hodnoty:

'\*\*\*' – p-hodnota = 0 - 0.001, '\*\*' – p-hodnota = 0.001 - 0.01,

'\*' – p-hodnota = 0.01 - 0.05, 'NS' – p-hodnota > 0.05

Analyt	p-hodnota	signifikancia
1-Octanol	0,03429	*
2-Dodecanol	0,01911	*
2-Propenal	0,15093	NS
2,4-Dimethylhept-1-ene	0,11241	NS
benzofuran-2-one	0,01017	*
Acetic acid, butyl ester	0,0963	NS
Analyte 1007	0,05878	NS
Analyte 1031	0,02329	*
Analyte 1266	0,01014	*
Analyte 1285	0,0963	NS
Analyte 520	0,02831	*
Analyte 525	0,03429	*
Analyte 553	0,00514	**
Analyte 782	0,11241	NS
Cyclobutanol	0,02831	*
Hexanal	0,04125	*
Methane, nitro-	0,00038	***
Oxalic acid, cyclohexyl isohexyl ester	0,06964	NS
Propanenitrile	0,0821	NS
Propanoic acid, 2,2-dimethyl-	0,01261	*

**Tab. č. 3: Zoznam analytov a ich signifikancie pohlavného dimorfizmu.**

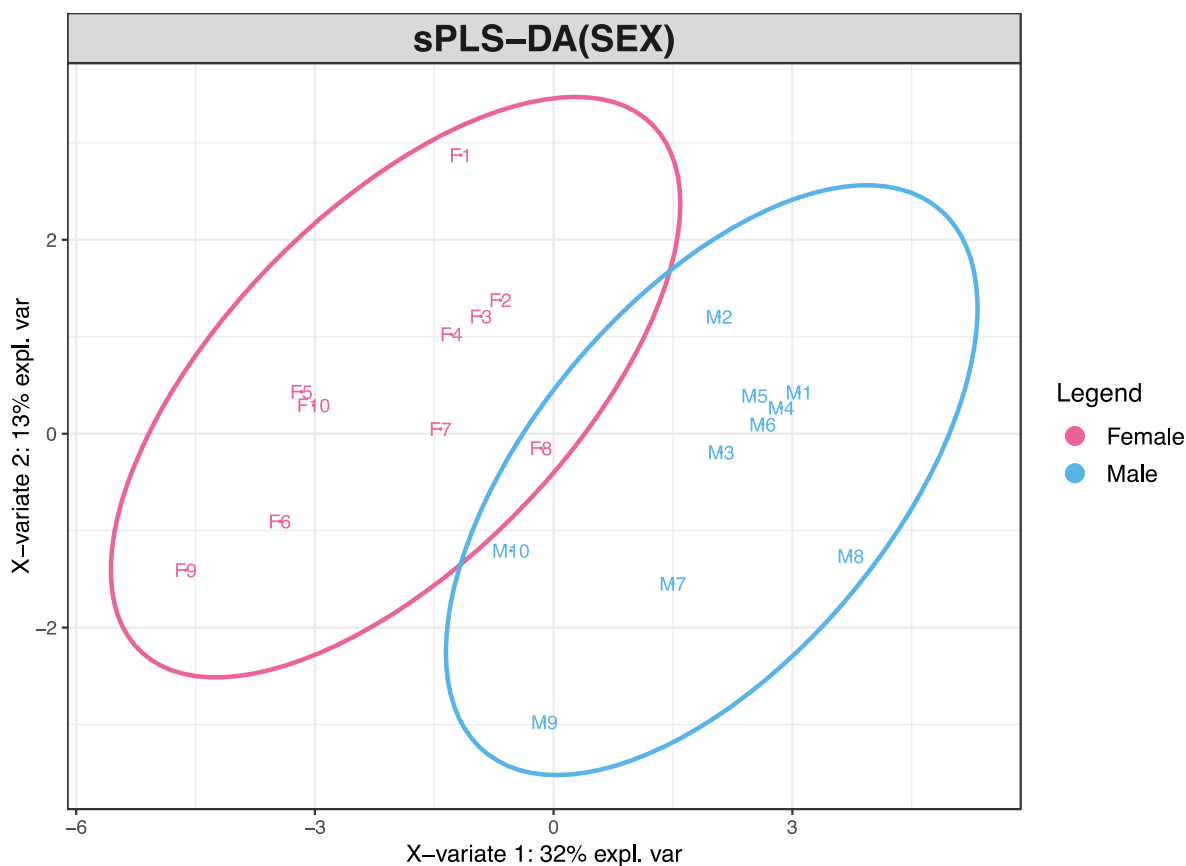
Legenda k signifikancii p-hodnoty:

'\*\*\*' – p-hodnota = 0 - 0.001, '\*\*' – p-hodnota = 0.001 - 0.01,

'\*' – p-hodnota = 0.01 - 0.05, 'NS' – p-hodnota > 0.05

Na zistenie vplyvu faktoru pohlavia na variabilitu detegovaných analytov bola použitá sPLS-DA analýza. Výsledkom tejto analýzy je fakt, že variabilita nášho súboru je preukazne vysvetliteľná pohlavným dimorfizmom. Graficky tento výsledok dokladá graf č. 6. Tento graf zároveň prezentuje to, že pozorovanú variabilitu najlepšie vysvetľuje komponent 1 a 2. Komponent 1 vysvetľuje až 32% variability a komponent 2 13% variability. Spolu teda vysvetľujú až 45% variability. Je preto zrejmé, že práve pohlavie je tým faktorom, ktorý vysvetľuje pozorovanú variabilitu abundancie analytov.





**Graf č. 6. Výsledok sPLS-DA analýzy. Vplyv pohlavia na variabilitu.**

Os X – komponent 1, vysvetľujúci 32% pozorovanej variability.

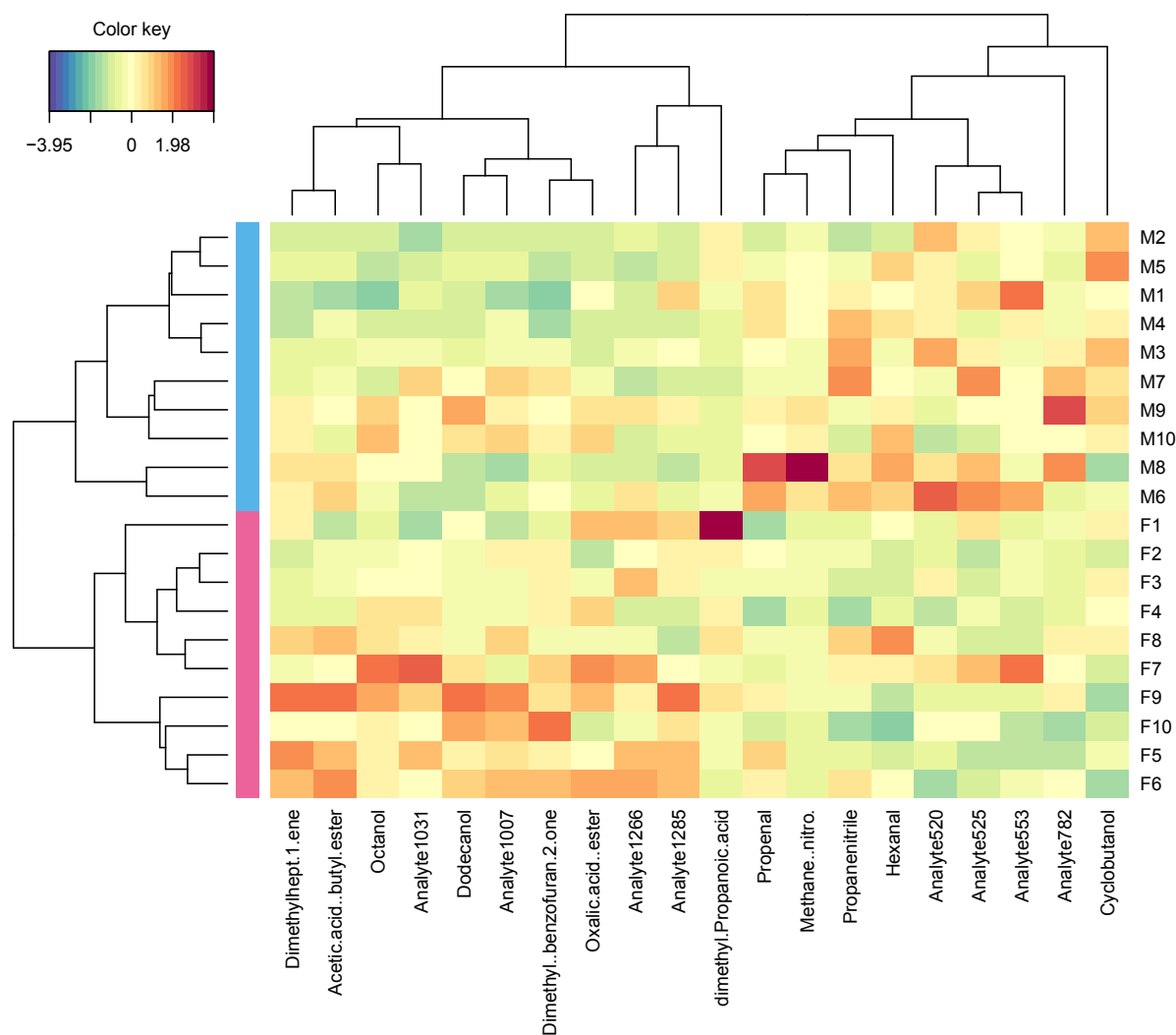
Os Y – komponent 2, vysvetľujúci 13% pozorovanej variability.

Pohlavia sú rozlíšené farbou. Růžová – samice. Modrá – samci.

Mieru pohlavného dimorfizmu jednotlivých analytov u konkrétnych jedincov znázorňuje graf č. 7. Je to mapa zostrojená na základe hierarchického klastrovania (z angl. clustered image map). Farebná škála predstavuje vzdialenosti hodnôt z distančnej matice z analýzy sPLS-DA. Hierarchickým klastrovaním vzniklo dvojité bimodálne rozdelenie, jednak u pohlaví a taktiež u analytov. Z toho výsledku je opäť zrejмый jednoznačný vplyv pohlavia na rozloženie súboru analytov.

Analyty, u ktorých bolo možné popísať pravdepodobný metabolický pôvod, sú uvedené v tabuľke č. 4.

Diskriminačnou analýzou sme zároveň posudzovali vplyv jednotlivých analytov na celý súbor. Z výsledkov vyplýva, že pohlavne dimorfné nie sú konkrétne látky, ale ich zmes ako celok. Je preto pravdepodobné, že sliny môžu slúžiť ako ďalší zdroj, v predchádzajúcich kapitolách popisovaného, individuálneho pachového podpisu.



**Graf č. 7: Mapa zostrojená hierarchickým klastrovaním zobrazujúca individuálny pohlavný dimorfizmus.**

Názov	Popis	Pôvod	Zdroj
Hexanal	Hexanal je nasýtený aldehyd mastných kyselín. Nachádza sa v rôznych telesných tekutinách a exkrétoch. U ľudí je známy napríklad v materskom mlieku, ale aj ako močový metabolit.	Pôvod tejto látky je endogénny. Nachádza sa telesných tekutinách a exkrétoch (sliny, moč, krv, mozkomiešny mok, trus).	Databáza HMDB (Human Metabolome Database) a PubChem
1-Octanol	Oktanol sa prirodzene nachádza vo forme esterov v rôznych esenciálnych olejoch. Bol však detegovaný aj v bunkách a bunčných membránach rôznych orgánoch a tkanív.	Pôvod v slinách môže byť endogénny aj exogénny.	Databáza HMDB (Human Metabolome Database)
Oxalic acid, cyclohexyl isohexyl ester (Methyl dihydrojasmonate)	Metyldihydrojasmonát je ester odvodený od kyseliny jasmonovej. Estery kyseliny jasmonovej, ako napríklad metyl jasmonat, majú dôležitú úlohu vo vývojových procesoch rastliny, v obrane rastliny a ako fytohormóny. Metyl dihydrojasmonat je taktiež používaný ako dochucovadlo s rastlinnou a citrusovou arómou.	Pôvod je exogénny, z potravy.	Databáza PubChem, (Cheong and Choi, 2003)
Methane, nitro-	Nitrometan je látka, ktorá sa synteticky vyrába pre svoje antimikrobiálne vlastnosti. Vystavenie nitrometanu spôsobuje iritáciu pokožky a nauzeu. U ľudí je dokonca považovaný za karcinogén. Oxidáciou nitrometanu vznikajú silne toxické volateľné látky.	Pôvod je neznámy. Pravdepodobne vzniká v procese rozkladu potravy či prítomných mikroorganizmov.	Databáza PubChem

Propanoic acid, 2,2-dimethyl-	2,2-dimetyl-propanová kyselina (alternatívny názov kyselina pivalová) je synteticky vyrábaná zlúčenina, ktorá je používaná predovšetkým ako tzv. pro-liek (napríklad u antibiotík). Pro-liek je biologicky neaktívna látka, ktorá sa môže metabolizmom zmeniť na aktívny liek.	Pôvod je pravdepodobne exogénny.	Databáza PubChem
Acetic acid, butyl ester	Butylester kyseliny octovej, iným názvom butylacetát, je súčasťou viacerých druhov ovocia, kde sa podieľa na ich charakteristickej chuti.	Pôvod je exogénny, z potravy.	Databáza PubChem
2,4-Dimethylhept-1-ene	2,4-Dimetyl-1-heptene je volateľný metabolit, napríklad ľudských pľúcnych buniek.	Pôvod je endogénny.	Databáza PubChem, (Filipiak et al., 2010)
7,7a-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-3H-benzofuran-2-one	Táto látka je veľmi podobná tzv. vinnému laktonu, ktorý je súčasťou rôznych druhov ovocia a esenciálnych olejov pochádzajúcich z ovocia.	Pôvod je exogénny, z potravy.	Databáza PubChem, (Bonnländer et al., 1998)
Cyclobutanol	Cyclobutanol je zlúčenina, vo veľkom množstve obsiahnutá, v kôre stromu orech kráľovský ( <i>Juglans regia</i> ). Je preto pravdepodobné, že sa nachádza aj v kôre iných druhov stromov.	Pôvod je exogénny, z podstielky.	(Ara et al., 2013)

**Tab. č. 4: Charakteristika analytov, u ktorých bol zistený metabolický pôvod.**

## 5. Diskusia

Chovanie či už potravné, rozmnožovacie alebo antipredačné, vždy vykazuje určitú hierarchickú štruktúru. Vo svete businessu by sa dalo popísať procesnou mapou, v neurovedách a pri vyvíjaní umelej inteligencie neurálnou sieťou, a v etológii hierarchickým systémom centier aký navrhol Nikolaas Tinbergen (Tinbergen, 1951). V prvej kapitole bol tento systém vysvetlený na príklade páriaceho chovania u pichľavky sivej (*Gasterosteus aculeatus*). Veľmi ľahko sa však dá aplikovať na náš modelový organizmus, myš domácu.

Myš je umiestnená do nového prostredia. Pokiaľ je v tomto prostredí sama, vydá sa ho preskúmať. Pokiaľ je však do tohoto prostredia umiestnený ešte ďalší jedinec, v našom prípade opačného pohlavia, vydá sa preskúmať jeho. Pri tejto prvotnej interakcii sme opakovane pozorovali rovnaký vzorec chovania. Myši sa priblížili na veľmi krátku vzdialenosť a ňufákmi zavetřili pachy prítomného jedinca. Pokiaľ nedošlo k tejto prvej výmene chemickým signálov, nenasledovali ďalšie časti interakcie. Tieto chemické signály predstavujú Tinbergenovo IRM, vrodenný spúšťací mechanizmus (z angl. innate releasing mechanism) a vyvolávajú ďalší typ chovania. Je pravdepodobné, že signály predstavujúce toto pomyselné IRM, informujú o druhovej príslušnosti jedinca. Následne dochádza k samotnej fyzickej interakcii, k oňuchávaniu nosa, ústneho otvoru, prípadnému orálnemu kontaktu a ďalším typom chovania. Je možné si predstaviť, že chemické signály z každého takto popísaného zdroja predstavujú špecifické IRM, spúšťajúce ďalšie špecifické typy chovania. Pokiaľ napríklad samec pri oňuchávaní orofaciálnej oblasti, a teoreticky aj zo slín, zistí, že jedinec je samica, pravdepodobne nepríbuzná, reprodukčne dospelá, jeho ďalšie chovanie bude typické snahou o získanie ďalších signálov z anogenitálnej oblasti. Sekréty anogenitálnej oblasti poskytnú samcovi informáciu o reprodukčnom štádiu samice, čo následne opäť vyvolá špecifický druh chovania. Z hľadiska samice je prirodzene priebeh interakcie iný. V momente kedy prebehne výmena základných informácií pri oňuchávaní najmä orofaciálnej oblasti, je ďalšie chovanie samice jednoznačne ovplyvnené jej reprodukčným štádiom.

Ako nakoniec dokladajú výsledky tejto diplomovej práce, chovanie samice sa v priebehu cyklu v určitých aspektoch značne líši. V proestre je veľmi častým typom chovania, chovanie defenzívne. Je predstavované odmietaním fyzického kontaktu so samcom, a to samotným útekom, ale aj aktívnym odháňaním, ako aj

defenzívnym/výstražným pískaním. Naopak v estre sa samičie chovanie vyznačuje hlavne kontaktnými typmi chovania a defenzívne chovanie je potlačené. Samec má prístup ku všetkým častiam tela a teda aj k potenciálnym chemickým signálom. Tieto poznatky znázorňuje obrázok č. 7. V metestre a diestre sa nedá jednoznačne povedať, ktorý typ behaviorálnych kategórií prevláda. Je to združené štádium vykazujúce veľkú variabilitu. Z inej časti analýzy však vieme, že záujem samca o samicu, čo do reprodukčných zámerov, pretrváva počas metestra, ale v diestre významne klesá (graf č. 4A,B). Je pravdepodobné, že z určitých chemických signálov samec rozpozná status samice a tým moduluje svoju motiváciu k páreniu. Iné štúdie skúmajúce zmenu v produkcii vaginálnych proteínov ukazujú, že v metestre zostáva hladina lipokalinov ešte stále pomerne vysoká (Černá et al., 2017). Je pravdepodobné, že k poklesu dochádza až v diestre kedy sa estrálny cyklus myši domácej tzv. reštartuje. To presne koreluje s výsledkami v tejto diplomovej práci, kedy záujem samca o anogenitálnu oblasť je v prvých troch štádiách cyklu vysoký, významne klesá až v diestre (graf č. 4B). Ako ukazuje sieťový graf pre štádium metestra (obrázok č. 7, časť c) METESTRUS) chovanie samice v metestre a diestre vykazuje dva hlavné, dosť protichodné, typy chovania. Jednak je to skupina tzv. kontaktných kategórií chovania, ako napr. *F.contact*, *F.wait*, *F.sniff*, *F.approach anogenitals*. A oproti tomu kategórie tzv. nekontaktné, ako *F.escape*, *F.defend*, *F.squeak* či *F.nonsocial*. Toto pomerne rovnomerné rozdelenie, značne protichodných chovaní, je možné vysvetliť variabilitou súboru spôsobenou veľkosťou tejto kategórie. Diestrus totiž tvorí prevažnú časť reprodukčného cyklu (Cora et al., 2015).

Druhá časť behaviorálnej analýzy skúma chovanie bez jeho vzťahu k reprodukčnému štádiu. Táto časť sa zameriava na postupnosť jednotlivých kategórií chovania v procese interakcie, s hlavným zameraním na kategóriu oňuchávanie. Zo záujmu o jednotlivé časti tela, predstavované ich intenzívnym oňuchávaním, je totiž možné vyvodiť dôležitosť tu emitovaných chemických signálov v sociálnej komunikácii myší. K tomuto účelu bol zostrojený graf latencií (graf č. 1) a graf porovnávajúci doby trvania jednotlivých kategórií (graf č. 2). Z výsledkov vyplýva, že najdôležitejšími signálmi v primárnej interakcii dvoch neznámych jedincov, sú chemické signály pochádzajúce z orofaciálnej oblasti hlavy.

Ak porovnáme detaily typických sekvencií interakcie, zistíme rozdiely v poradí behaviorálnych kategórií medzi samcom a samicou. Najčastejším vzorcom chovania u samca je nasledovná sekvencia: priblíženie sa – oňuchávanie – orálny kontakt –

približovanie sa k anogenitálnej oblasti – čakanie – orálny kontakt s anogenitálnou oblasťou. A oblasti chronologicky najčastejšie oňuchávané samcom sú: nos – ústa – bok – anogenitálna oblasť – oko – ucho – hrud' – chrbát – chvost. Z údajov o časovej investícii do oňuchávania rôznych častí tela samice navyše vyplýva, že všetky nami definované oblasti tela bezpochyby poskytujú samcovi dôležité informácie (graf č. 2B).

U samice je začiatok sekvencie identicky s tou samčou, v určitom bode sa však chovanie mení a jeho variabilita je jednoznačne ovplyvnené rôznymi štádiami estrálneho cyklu. Sekvencia je nasledovná: priblíženie sa – oňuchávanie – orálny kontakt – približovanie sa k anogenitálnej oblasti – čakanie – pískanie – útek – obrana – kontakt. Časti samčieho tela sú oňuchávané nasledovne: nos – ústa – anogenitálna oblasť – oko – bok – chrbát – ucho – chvost.

V určitých úsekoch sekvencií je chovanie u oboch pohlaví rovnaké. Preto signály, ktoré sú týmto chovaním sprostredkované, budú niesť rovnakú informáciu pre obe pohlavia. Môže sa jednať o informácie o identite jedinca, jeho pohlaví, kondícii či teoretickej príbuznosti. Z toho vyplýva, že napríklad počiatočná časť interakcie, ktorá sa vyznačuje rovnakým chovaním u oboch pohlaví, zabezpečuje výmenu dôležitých informácií pravdepodobne slúžiacich k bližšej identifikácii jedinca. Jedným z takto identifikovaných zdrojov týchto signálov sú sliny. Oňuchávanie úst, aj samotný kontakt ústnych otvorov, bol v tomto pokuse veľmi často pozorovaným typom chovania. Preto bola druhá časť tejto diplomovej práce zameraná na analýzu slín a chemických signálov, ktoré môžu sliny sprostredkovať.

Na chemickú analýzu slín bola použitá technológia plynovej chromatografie s hmotnostným spektrometrom. Táto metóda identifikovala v slinách myši 20 pohlavne dimorfných látok. Pohlavný dimorfizmus v intenzite signálu týchto analytov (testovaný Kruskal-Wallisovým testom) zobrazuje graf č. 5. Signifikantný pohlavný dimorfizmus bol potvrdený u 12 analytov. Samotný vplyv faktoru pohlavia na rozloženie tohoto súboru však musel byť otestovaný ďalšou metódou, metódou sPLS-DA (skr. z angl. Sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis). Výsledok jednoznačne dokladá, že práve pohlavie je faktorom zodpovedným za nami pozorovanú variabilitu. Rozdiel medzi pohlaviami však nie je spôsobený výskytom unikátnych látok len u jedného z pohlaví. Dimorfizmus je spôsobený špecifickým pomerom identifikovaných analytov, a teda ich jedinečnou zmesou. Ako dokladá graf č. 7 aj individuálna variabilita abundancie analytov je značná a teda zloženie slín

predstavuje určitý individuálny podpis. Výsledný pach následne pôsobí ako tzv. pachový podpis jedinca. Koncept pachového podpisu je už dlhšie diskutovaným modelom v chemickej komunikácii (Johnston, 2003). Bol popísaný u promyky zlatej (*Herpestes auropunctatus*) (Gorman, 1976) i kosmana bielofúzeho (*Callithrix jacchus*) (Smith et al., 2001). Bližšie je tento koncept predstavený v prvej kapitole. Výsledky tejto práce, ako aj výsledky predchádzajúcich štúdií, dokladajú, že považovať jednotlivé chemické látky za jedinečné nosiče informácie nie je jediným správnym prístupom k štúdiu chemickej komunikácie. Informácie zistené o pôvode nájdených analytov navyše naznačujú, že k chemickej komunikácii sú zväčša využívané látky exogénneho pôvodu. U slín, ako zdroja chemických signálov, pravdepodobne nedochádza k žiadnej vlastnej syntéze špecifických látok. Myši samé neprodujú špeciálne substancie, ale ku komunikácii využívajú zdroje, ktoré majú zároveň aj inú funkciu. Tento spôsob využívania externých zdrojov je značne efektívny. Príkladom môžu byť látky pochádzajúce z potravy. V našej analýze je to napríklad butylester kyseliny octovej či metyldihydrojasmonát. Výskyt týchto a ďalších pôvodom rastlinných látok, môže informovať o schopnosti jedinca získať kvalitnú potravu, či o kondícii jedinca vďaka príjmu kvalitnej potravy. Naopak látky pochádzajúce z metabolizmu patogénnych baktérií môžu svedčiť o zlom zdravotnom stave jedinca. To môže znamenať aj slabú imunologickú výbavu jedinca, ktorá je uvádzaná ako kľúčová pri výbere sexuálneho partnera. Určité látky prítomné v slinách môžu mať pôvod aj napríklad v nasolakrimálnych dutinách. Z predchádzajúcich publikácií je taktiež známe, že celkové zloženie proteomu slíz, exkretov nosnej dutiny a slín, vykazuje pohlavný dimorfizmus (Stopka et al., 2016; Stopkova et al., 2017; Kuntová et al., 2018). To poukazuje na to, že metabolizmus u oboch pohlaví bude odlišný a teda látky pochádzajúce z rovnakého zdroja môžu byť inak metabolované.

Iné látky môžu byť aktívne odvádzané z tela kvôli ich potenciálnej nebezpečnosti. Ako tvrdí hypotéza toxického odpadu (Stopková et al., 2009), môžu tieto látky v procese koevolúcie nadobudnúť aj ďalší a to komunikačný význam.

Výsledkom oboch analýz je jednoznačný dôkaz o tom, že sliny majú v komunikácii myši nenahraditeľný význam. Chemická analýza, doložená analýzou chovania potvrdzuje, že sliny nielenže poskytujú pohlavne dimorfny signál, sú aj nástrojom individuálneho pachového podpisu. Tradične bola táto funkcia prisudzovaná hlavne močovým značkám. Dekády výskumu myši domácej boli zamerané len na tento zdroj chemických signálov. U myši však existuje množstvo ďalších potenciálnych



zdrojov. Jednými z nich sú napríklad exokrinné žľazy a pozorovania ich aktívnej investigácie v priebehu interakcie sú toho dôkazom. Samotné výsledky tejto práce dokladajú, že systém komunikácie u myší je omnoho komplexnejší než sa na prvý pohľad zdá. Naprieč celým jej telom a v každej jej telesnej tekutine sa pravdepodobne nachádza bezpočetne dôležitých chemických signálov. Je zaujímavé, že na tak typickom biologickom modeli ako je myš domáca, je v otázkach chemickej komunikácie ešte toľko nepreskúmaného.

## 6. Záver

Dôvodom vzniku tejto diplomovej práce bola doterajšia nedostatočne preskúmaná chemická komunikácia počas sociálnych interakcií myši domácich. Prvým cieľom práce bolo podrobne charakterizovať tieto interakcie a popísať potenciálne zdroje dôležitých chemických signálov. Interakcie dvoch jedincov opačného pohlavia boli sledované v priebehu celého reprodukčného cyklu samice. Pri analýze sekvencií chovania boli skúmané rozdiely medzi pohlaviami, ako aj rozdiely medzi rôznymi štádiami estrálneho cyklu. Výsledky ukázali, že iniciačná časť interakcie vykazuje značnú homogenitu v chovaní oboch pohlaví. Interakcia je zahájená výmenou chemický signálov predovšetkým z orofaciálnej oblasti hlavy. To nasvedčuje tomu, že význam týchto signálov je pravdepodobne pre oboch jedincov rovnaký. Môže sa jednať napríklad o informácie upresňujúce identitu jedinca (pohlavie, zdravotný stav, príbuznosť, pohlavná zrelosť a pod.). Po preskúmaní tejto časti tela však nasledovala, najmä u samcov, aktívna investigácia všetkých nami popísaných zdrojov chemických signálov. Jednou z ďalších najviac preskúmaných oblastí bola anogenitálna oblasť. Samci vykazovali dvojnásobnú motiváciu v skúmaní tejto časti tela. Tento záujem bol kontinuálny počas prvých troch štádií cyklu, proestra, estra a metestra. Vo fáze diestra záujem samca o túto oblasť výrazne poklesol. To jasne koreluje s predpokladom, že preskúmanie anogenitálnej oblasti má samcovi poskytnúť informácie o reprodukčnom statuse samice, a zároveň pravdepodobne moduluje jeho motiváciu k páreniu. Z analýzy trvania jednotlivých kategórií chovania oňuchávanie však zároveň vyplýva, že aj ostatné nami definované oblasti jednoznačne poskytujú samcovi určité nenahraditeľné informácie. Vplyv reprodukčného štádia na štruktúru interakcie bol skúmaný metódou neurálnych sietí. Výstupom tejto analýzy je set sieťových grafov znázorňujúci vzťahy medzi, v danom štádiu signifikantne významnými, kategóriami chovania. Štádium proestrus sa vyznačuje častým výskytom defenzívnych typov chovania zo strany samice. Dôvodom toho je pravdepodobne fyzická nepripravenosť samice k páreniu. V ďalšom štádiu, v estre, tieto obranné kategórie chovania u samice chýbajú a nahrádzajú ich naopak kontaktné behaviorálne kategórie. Samica neodmieta kontakt so samcom, naopak ho sama vyhľadáva a poskytuje mu tak možnosť k preskúmaniu rôznych komunikačne aktívnych častí tela. V tomto štádiu vykazuje samec typický vzorec oňuchávania samice. Ten začína v oblasti hlavy, pokračuje bočnou žľazou a končí v anogenitálnej oblasti. V metestre a diestre nie je možné takto

jednoznačne určiť skupinu prevládajúcich typov chovania. Variabilita voči ostatným štádiám je značná a to sťažuje interpretáciu interakcie. Z celej tejto analýzy však nepochybne vyplýva, že štruktúra interakcie je z väčšej miery určená chovaním samice.

Druhým cieľom tejto diplomovej práce bola analýza slín ako potenciálneho zdroja chemických signálov. Z predchádzajúcej analýzy vyplynulo, že sliny sú jedným z dôležitých zdrojov chemosignálov. Zloženie slín bolo analyzované pomocou plynovej chromatografie s hmotnostným spektrometrom. Analýza ukázala, že myšie sliny sú pohlavne dimorfným signálom. Rozdiel medzi pohlaviami však nie je spôsobený odlišnými chemickými látkami, ale ich špecifickou zmesou. Výsledky navyše ukázali, že pomery chemických látok sú natoľko individuálne, že sliny pravdepodobne fungujú aj ako tzv. pachový podpis jedinca. Ako behaviorálna, tak aj chemická analýza preukázali, že sliny sú jedným z nenahraditeľných zdrojov signálov v chemickej komunikácii myší domácich.

## 7. Referencie

1. **Ara, I. et al. (2013)** 'Evaluation of Antimicrobial Properties of Two Different Extracts of *Juglans regia* Tree Bark and Search for Their Compounds Using Gas Chromatography-Mass Spectrum', 5(2), pp. 92–102. doi: 10.5539/ijb.v5n2p92.
2. **Baerends, G. P. (1941)** 'Fortpflanzungsverhalten und orientierung der grabwespe *Ammophila campestris* Jur?.
3. **Baerends, G. P. (1950)** 'An Introduction to the Study of the Ethology of the Cichlid Fishes'.
4. **Belcher, A. et al. (1988)** 'Volatile components of scent material from cotton-top tamarin (*Saguinus o. oedipus*)', *Journal of Chemical Ecology*, 14(5), pp. 1367–1384. doi: 10.1007/BF01020141.
5. **Bell, G. A., Laing, D. G. and Panhuber, H. (1987)** 'Odour mixture suppression: evidence for a peripheral mechanism in human and rat', *Brain Research*, pp. 8–18. doi: 10.1016/0006-8993(87)90419-7.
6. **Berry, R. J. (1970)** 'The natural history of the house mouse.', *Field studies*, 3(2), pp. 219–262.
7. **Berry, R. J. and Bronson, F. H. (1992)** 'Life History and Bioeconomy of the House Mouse', *Biological Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 67(4), pp. 519–550. doi: 10.1111/j.1469-185X.1992.tb01192.x.
8. **Beynon, R. J. and Hurst, J. L. (2003)** 'Multiple roles of major urinary proteins in the house mouse, *Mus domesticus*', *Biochemical Society Transactions*, 31, pp. 142–146. doi: 10.1042/.
9. **Beynon, R. J. and Hurst, J. L. (2004)** 'Urinary proteins and the modulation of chemical scents in mice and rats', *Peptides*, 25(9), pp. 1553–1563. doi: 10.1016/j.peptides.2003.12.025.
10. **Bonnländer, B. et al. (1998)** 'Isolation of Two Novel Terpenoid Glucose Esters from Riesling Wine', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. American Chemical Society, 46(4), pp. 1474–1478. doi: 10.1021/jf9706033.
11. **Briand, L., Trotier, D. and Pernollet, J.-C. (2004)** 'Aphrodisin, an aphrodisiac lipocalin secreted in hamster vaginal secretions', *Peptides*, 25(9), pp. 1545–1552. doi: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.10.026>.
12. **Bronson, F. H. (1979)** 'The Reproductive Ecology of the House Mouse', *The Quarterly Review of Biology*. The University of Chicago Press, 54(3), pp. 265–299. doi: 10.1086/411295.
13. **Bronson, F. H. and Maruniak, J. A. (1975)** 'Male-Induced Puberty in Female Mice: Evidence for a Synergistic Action of Social Cues', *Biology of Reproduction*, 13(1), pp. 94–98. doi: 10.1095/biolreprod13.1.94.
14. **Brown, R. E. (1985)** 'The rodents II: suborder Myomorpha', *Social odours in mammals*, 1, pp. 345–457.
15. **Bruce, H. M. (1959)** 'An Exteroceptive Block to Pregnancy in the Mouse', *Nature*, 184(4680), p. 105. doi: 10.1038/184105a0.
16. **Cantoni, D. et al. (1996)** 'Intra- and interindividual variation in flank gland secretions of free-ranging shrews *Crocidura russula*', *Journal of Chemical Ecology*, 22(9), pp. 1669–1688. doi: 10.1007/BF02272406.
17. **Clancy, N. et al. (1984)** 'Sexual Behaviour and Aggression in Male Mouse: Involvement of the

Vomeronasal System’.

18. **Colby, D. R. and Vandenberg, J. G. (1974)** ‘Regulatory Effects of Urinary Pheromones on Puberty in the Mouse’, *Biology of Reproduction*, 11(3), pp. 268–279. doi: 10.1095/biolreprod11.3.268.
19. **Cora, M. C., Kooistra, L. and 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’, *Toxicologic Pathology*. SAGE Publications Inc, 43(6), pp. 776–793. doi: 10.1177/0192623315570339.
20. **Cowley, H. M. and Heiss, G. S. (1991)** ‘Changes in Vaginal Bacterial Flora During the Oestrous Cycle of the Mouse’, *Microbial Ecology in Health and Disease*. Taylor & Francis, 4(4), pp. 229–235. doi: 10.3109/08910609109140147.
21. **Craig, W. (1918)** ‘General account of appetite and aversion.’, *Analysis*, pp. 91–107.
22. **Černá, M. et al. (2017)** ‘Differential regulation of vaginal lipocalins (OBP, MUP) during the estrous cycle of the house mouse’, *Scientific Reports*, 7(1), p. 11674. doi: 10.1038/s41598-017-12021-2.
23. **Doty, R. L. (1986)** ‘Odor-guided behavior in mammals’, *Experientia*, 42(3), pp. 257–271. doi: 10.1007/BF01942506.
24. **Drickamer, L. C. (1989)** ‘Patterns of deposition of urine containing chemosignals that affect puberty and reproduction by wild stock male and female house mice (*Mus domesticus*)’, *Journal of Chemical Ecology*, 15(5), pp. 1407–1421. doi: 10.1007/BF01012373.
25. **Ehman, K. D. and Scott, M. E. (2001)** ‘Urinary odour preferences of MHC congenic female mice, *Mus domesticus*: implications for kin recognition and detection of parasitized males’, *Animal Behaviour*, 62(4), pp. 781–789. doi: <https://doi.org/10.1006/anbe.2001.1805>.
26. **Eklund, A. (1996)** ‘The Effects of Inbreeding on Aggression in Wild Male House Mice (*Mus domesticus*)’, *Behaviour*. Brill, 133(11/12), pp. 883–901. Available at: <http://www.jstor.org/stable/4535401>.
27. **Ferkin, M. H. and Johnston, R. E. (1995)** ‘Meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*, use multiple sources of scent for sex recognition’, *Animal Behaviour*, 49(1), pp. 37–44. doi: 10.1016/0003-3472(95)80151-0.
28. **Ferkin, M. H., Sorokin, E. S. and Johnston, R. E. (1996)** ‘Self-grooming as a sexually dimorphic communicative behaviour in meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*’, pp. 801–810.
29. **Filipiak, W. et al. (2010)** ‘TD-GC-MS Analysis of Volatile Metabolites of Human Lung Cancer and Normal Cells In vitro’, 19(January), pp. 182–196. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0162.
30. **Gaisler, J. and Zima, J. (2018)** *Zoologie obratlovců*.
31. **Gerlach, G. (1990)** ‘Dispersal mechanisms in a captive wild house mouse population (*Mus domesticus* Ruddy)’, *Biological Journal of the Linnean Society*, 41(1–3), pp. 271–277. doi: 10.1111/j.1095-8312.1990.tb00835.x.
32. **Gorman, M. L. (1976)** ‘A Mechanism for Individual Recognition by Odour in *Hesperestes Auropunctatus*’, *Animal Behaviour*, 24, pp. 141–145.
33. **Gorman, M. L., Kruuk, H. and Leitch, A. (1984)** ‘Scent-marking with the subcaudal gland by the European badger, *Meles meles*’, *Animal Behaviour*, 32, pp. 899–907.
34. **Gray, B., Fischer, R. B. and Meunier, G. F. (1984)** ‘Preferences for salivary odor cues by female

- hamsters', *Hormones and Behavior*, 18(4), pp. 451–456. doi: [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(84\)90029-1](https://doi.org/10.1016/0018-506X(84)90029-1).
35. **Hayashi, S. and Kimura, T. (1974)** 'Sex-attractant emitted by female mice', *Physiology & Behavior*, 13(4), pp. 563–567. doi: [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(74\)90287-X](https://doi.org/10.1016/0031-9384(74)90287-X).
  36. **Hinde, R. A. (1953)** 'Appetitive Behaviour, Consummatory Act, and the Hierarchical Organisation of Behaviour- With Special Reference to the Great Tit (*Parus major*)'.
  37. **Hinde, R. A. (1956)** 'Ethological Models and the Concept of "Drive"', 6(24), pp. 321–331.
  38. **Hurst, J. L. (1987)** 'Behavioural variation in wild house mice *Mus domesticus* Ruddy: A quantitative assessment of female social organization', *Animal Behaviour*, 35(6), pp. 1846–1857. doi: [10.1016/S0003-3472\(87\)80077-5](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(87)80077-5).
  39. **Hurst, J. L. et al. (2001)** 'Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins', *Nature*. Macmillan Magazines Ltd., 414, p. 631. Available at: <https://doi.org/10.1038/414631a>.
  40. **Champlin, A. K. (1971)** 'Suppression of Oestrus in Grouped Mice: The Effect of Various Densities and the Possible Nature of the Stimulus', *Reproduction*. Bristol, UK: Bioscientifica Ltd, 27(2), pp. 233–241. doi: [10.1530/jrf.0.0270233](https://doi.org/10.1530/jrf.0.0270233).
  41. **Cheong, J. and Choi, Y. Do (2003)** 'Methyl jasmonate as a vital substance in plants', 19(7), pp. 409–413. doi: [10.1016/S0168-9525\(03\)00138-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00138-0).
  42. **Ingersoll, D. W. and Launay, J. (1986)** 'MURINE aggression induced by a boar chemosignal: A stimulus presentation dependency', *Physiology & Behavior*, 36(2), pp. 263–269. doi: [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(86\)90014-4](https://doi.org/10.1016/0031-9384(86)90014-4).
  43. **Janotova, K. and Stopka, P. (2011)** 'The Level of Major Urinary Proteins is Socially Regulated in Wild *Mus musculus musculus*', *Journal of Chemical Ecology*, 37(6), pp. 647–656. doi: [10.1007/s10886-011-9966-8](https://doi.org/10.1007/s10886-011-9966-8).
  44. **Jemiolo, B., Harvey, S. and Novotny, M. (1986)** 'Promotion of the Whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(12), pp. 4576–4579. doi: [10.1073/pnas.83.12.4576](https://doi.org/10.1073/pnas.83.12.4576).
  45. **Jemiolo, B. and Novotny, M. (1994)** 'Inhibition of sexual maturation in juvenile female and male mice by a chemosignal of female origin', *Physiology & Behavior*, 55(3), pp. 519–522. doi: [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90110-4](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90110-4).
  46. **Johnston, R. E. (2003)** 'Chemical Communication in Rodents: From Pheromones To Individual Recognition', *Journal of Mammalogy*, 84(4), pp. 1141–1162. doi: [10.1644/BLe-010](https://doi.org/10.1644/BLe-010).
  47. **Jordan, W. C. and Bruford, M. W. (1998)** 'New perspectives on mate choice and the MHC', *Heredity*. The Genetical Society of Great Britain, 81, p. 127. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.1998.00428.x>.
  48. **Karlson, P. and Lüscher, M. (1959)** "'Pheromones": a New Term for a Class of Biologically Active Substances', *Nature*, 183(4653), pp. 55–56. doi: [10.1038/183055a0](https://doi.org/10.1038/183055a0).
  49. **Kavaliers, M. and Colwell, D. (1995)** 'Discrimination by female mice between the odours of parasitized and non-parasitized males', *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. Royal Society, 261(1360), pp. 31–35. doi: [10.1098/rspb.1995.0113](https://doi.org/10.1098/rspb.1995.0113).
  50. **Kempnaers, B., Peters, A. and Foerster, K. (2008)** 'Sources of individual variation in plasma

testosterone levels', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society, 363(1497), pp. 1711–1723. doi: 10.1098/rstb.2007.0001.

51. **Kortlandt, A. (1940)** 'Wechselwirkung zwischen instinkten'.
52. **Kruhoffer, M. et al. (1996)** 'Gene expression of aphrodisin in female hamster genital tract segments', *Cell and Tissue Research*, 287(1), pp. 153–160. doi: 10.1007/s004410050741.
53. **Kuntová, B., Stopková, R. and Stopka, P. (2018)** 'Transcriptomic and Proteomic Profiling Revealed High Proportions of Odorant Binding and Antimicrobial Defense Proteins in Olfactory Tissues of the House Mouse', 9(February), pp. 1–13. doi: 10.3389/fgene.2018.00026.
54. **Kwak, J. et al. (2016)** 'Are MUPs a Toxic Waste Disposal System?', *Plos One*, 11(3), p. e0151474. doi: 10.1371/journal.pone.0151474.
55. **Laing, D. G. (1991)** 'Characteristics of the Human Sense of Smell when Processing Odor Mixtures BT - The Human Sense of Smell', in Laing, D. G., Doty, R. L., and Breipohl, W. (eds). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 241–259. doi: 10.1007/978-3-642-76223-9\_12.
56. **Latham, N. and Mason, G. (2004)** 'From house mouse to mouse house: The behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implications in the laboratory', *Applied Animal Behaviour Science*, 86(3–4), pp. 261–289. doi: 10.1016/j.applanim.2004.02.006.
57. **Laurie, E. M. . O. (1946)** 'The reproduction of the house-mouse (*Mus musculus*) living in different environments', *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*. Royal Society, 133(872), pp. 248–281. doi: 10.1098/rspb.1946.0012.
58. **Van der Lee, S. and Boot, L. M. (1955)** 'Spontaneous pseudopregnancy in mice', *Acta physiologica et pharmacologica Neerlandica*, 4(3), p. 442.
59. **Lee, W., Khan, A. and Curley, J. P. (2017)** 'Major urinary protein levels are associated with social status and context in mouse social hierarchies', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1863). doi: 10.1098/rspb.2017.1570.
60. **Leinders-Zufall, T. et al. (2000)** 'Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons', *Nature*, 405(6788), pp. 792–796. doi: 10.1038/35015572.
61. **Lenington, S., Coopersmith, C. and Williams, J. (1992)** 'Genetic Basis of Mating Preferences in Wild House Mice', *American Zoologist*. Oxford University Press, 32(1), pp. 40–47. Available at: <http://www.jstor.org/stable/3883734>.
62. **Liebenauer, L. L. and Slotnick, B. M. (1996)** 'Social organization and aggression in a group of olfactory bulbectomized male mice', *Physiology & Behavior*, 60(2), pp. 403–409. doi: [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(96\)80011-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)80011-4).
63. **Luo, M., Fee, M. S. and Katz, L. C. (2003)** 'Encoding Pheromonal Signals in the Accessory Olfactory Bulb of Behaving Mice', *Science*, 299(5610), p. 1196 LP-1201. doi: 10.1126/science.1082133.
64. **Marsden, H. M. and Bronson, F. H. (1964)** 'Estrous Synchrony in Mice: Alteration by Exposure to Male Urine', *Science*, 144(3625), p. 1469 LP-1469. doi: 10.1126/science.144.3625.1469.
65. **McClintock, M. K. (2002)** 'Pheromones, Odors, and Vasanias: The Neuroendocrinology of Social Chemosignals in Humans and Animals', in Pfaff, D. W. et al. (eds). San Diego: Academic Press, pp.

797–870. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-012532104-4/50017-2>.

66. **Meehan, A. P. (1984)** ‘Rats and mice. Their biology and control.’, in, p. 383.
67. **Mossman, C. A. and Drickamer, L. C. (1996)** ‘Odor preferences of female house mice (*Mus domesticus*) in seminatural enclosures’, *Journal of comparative psychology* (Washington, D.C. : 1983). Department of Zoology, Southern Illinois University 62901, USA., 110(2), pp. 131–138. doi: 10.1037/0735-7036.110.2.131.
68. **Newsome, A. E. (1971)** ‘The Ecology of House-Mice in Cereal Haystacks’, *Journal of Animal Ecology*. [Wiley, British Ecological Society], 40(1), pp. 1–16. doi: 10.2307/3326.
69. **Novotny, M. et al. (1985)** ‘Synthetic pheromones that promote inter-male aggression in mice.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(7), pp. 2059–2061. doi: 10.1073/pnas.82.7.2059.
70. **Novotny, M. (2003)** ‘Pheromones, binding proteins and receptor responses in rodents’, *Biochemical Society Transactions*, 31(1), pp. 117–122. doi: 10.1016/j.neulet.2009.11.058.
71. **Novotny, M., Harvey, S. and Jemiolo, B. (1990)** ‘Chemistry of male dominance in the house mouse, *Mus domesticus*’, *Experientia*, pp. 109–113. doi: 10.1007/BF01955433.
72. **Novotny, M. V., Ma, W., Wiesler, D., et al. (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 B: Biological Sciences*, 266(1432), pp. 2017–2022. doi: 10.1098/rspb.1999.0880.
73. **Novotny, M. V., Ma, W., Židek, L., et al. (1999)** ‘Recent biochemical insights into puberty acceleration, estrus induction and puberty-delay in the house mouse’, *Advances in Chemical Signals in Vertebrates*, pp. 99–116. doi: 10.1007/978-1-4615-4733-4\_7.
74. **Patris, B. and Baudoin, C. (1998)** ‘Female sexual preferences differ in *Mus spicilegus* and *Mus musculus domesticus*: the role of familiarization and sexual experience’, *Animal Behaviour*, 56(6), pp. 1465–1470. doi: <https://doi.org/10.1006/anbe.1998.0919>.
75. **Payne, A. P. (1976)** ‘Pheromonal Effects of Harderian Gland Homogenates on Aggressive Behaviour in the Hamster’, *Journal of Endocrinology*, 73(1), pp. 191–192.
76. **Payne, A. P. (1979)** ‘The attractiveness of Harderian gland smears to sexually naive and experienced male golden hamsters’, *Animal Behaviour*, 27(PART 3), pp. 897–904. doi: 10.1016/0003-3472(79)90027-7.
77. **Penn, D. J., Damjanovich, K. and Potts, W. K. (2002)** ‘MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17), p. 11260 LP-11264. doi: 10.1073/pnas.162006499.
78. **Pes, D. et al. (1992)** ‘Isolation of two odorant-binding proteins from mouse nasal tissue’, *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry. Istituto di Industrie Agrarie, Università degli Studi, Pisa, Italy.*, 103(4), pp. 1011–1017. doi: 10.1016/0305-0491(92)90231-f.
79. **Räber, H. (1948)** ‘Analyse Des Balzverhaltens Eines Domestizierten Truthahns, Raber’.
80. **Rasmussen, L. E. L. et al. (1996)** ‘Insect pheromone in elephants’, *Nature*, 379(6567), p. 684.
81. **Roberts, S. A. et al. (2010)** ‘Darcin: A male pheromone that stimulates female memory and sexual



- attraction to an individual male's odour', *BMC Biology*, 8. doi: 10.1186/1741-7007-8-75.
82. **Sachs, B. D. (2007)** 'A contextual definition of male sexual arousal', *Hormones and Behavior*, 51(5), pp. 569–578. doi: 10.1016/j.yhbeh.2007.03.011.
  83. **Sherman, P. W. (1988)** 'The levels of analysis', *Animal Behaviour*, 36(2), pp. 616–619. doi: 10.1016/S0003-3472(88)80039-3.
  84. **Simberloff, D. (2009)** 'Rats are not the only introduced rodents producing ecosystem impacts on islands', *Biological Invasions*, 11(7), pp. 1735–1742. doi: 10.1007/s10530-008-9400-5.
  85. **Singer, A. G. et al. (1986)** 'Purification and analysis of a proteinaceous aphrodisiac pheromone from hamster vaginal discharge', *The Journal of biological chemistry*, 261(28), pp. 13323–13326. Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/3759967>.
  86. **Singer, A. G. et al. (1987)** 'The Chemistry of Vomeronasally Detected Pheromones: Characterization of an Aphrodisiac Proteina', *Annals of the New York Academy of Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 519(1), pp. 287–298. doi: 10.1111/j.1749-6632.1987.tb36304.x.
  87. **Singer, A. G. and Macrides, F. (1990)** 'Aphrodisin: Pheromone or transducer?', *Chemical Senses*, pp. 199–203. doi: 10.1093/chemse/15.2.199.
  88. **Singleton, G. R., Tann, C. and Krebs, C. J. (2007)** 'Landscape ecology of house mouse outbreaks in south-eastern Australia', *Journal of Applied Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 44(3), pp. 644–652. doi: 10.1111/j.1365-2664.2007.01296.x.
  89. **Smith, T. E. et al. (2001)** 'Female marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) can be identified from the chemical composition of their scent marks.', *Chemical senses*, 26(5), pp. 449–458. doi: 10.1093/chemse/26.5.449.
  90. **Southern, H. N. and Laurie, E. M. O. (1946)** 'The House-Mouse (*Mus musculus*) in Corn Ricks', *Journal of Animal Ecology*. [Wiley, British Ecological Society], 15(2), pp. 134–149. doi: 10.2307/1554.
  91. **Stopka, P. et al. (2016)** 'On the saliva proteome of the Eastern European house mouse (*Mus musculus musculus*) focusing on sexual signalling and immunity', *Scientific Reports*, 6(August), pp. 20–23. doi: 10.1038/srep32481.
  92. **Stopka, P., Janotova, K. and Heyrovsky, D. (2007)** 'The advertisement role of major urinary proteins in mice', *Physiology & Behavior*, 91(5), pp. 667–670. doi: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.03.030>.
  93. **Stopka, P., Stopková, R. and Janotova, K. (2012)** Evolution of the House Mouse.
  94. **Stopkova, R. et al. (2010)** 'Novel OBP genes similar to hamster Aphrodisin in the bank vole, *Myodes glareolus*', *BMC Genomics*, 11, p. 45.
  95. **Stopkova, R. et al. (2017)** 'On the tear proteome of the house mouse (*Mus musculus musculus*) in relation to chemical signalling', *PeerJ*, 5, p. e3541. doi: 10.7717/peerj.3541.
  96. **Stopková, R. et al. (2007)** 'Species-specific Expression of Major Urinary Proteins in the House Mice (*Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*)', *Journal of Chemical Ecology*, 33(4), pp. 861–869. doi: 10.1007/s10886-007-9262-9.
  97. **Stopková, R. et al. (2009)** 'Multiple roles of secretory lipocalins (MUP, OBP) in mice', *Folia Zoologica*, 58, pp. 29–40.

- 98. Thiessen, D. and Rice, M. (1976)** ‘Mammalian scent gland marking and social behavior.’, *Psychological Bulletin*. US: American Psychological Association, pp. 505–539. doi: 10.1037/0033-2909.83.4.505.
- 99. Thoß, M. et al. (2019)** ‘Regulation of volatile and non-volatile pheromone attractants depends upon male social status’, *Scientific Reports*, 9(1), p. 489. doi: 10.1038/s41598-018-36887-y.
- 100. Tinbergen, N. (1939)** ‘Tinbergen 1939’.
- 101. Tinbergen, N. (1940)** ‘Die Übersprungbewegung, 1940’.
- 102. Tinbergen, N. (1942)** ‘An objectivistic study of the innate behaviour of animals’, *Bibliotheca Biotheoretica* (Leiden), 1, 2, pp. 37–98. doi: 10.1016/j.media.2004.11.008.
- 103. Tinbergen, N. (1950)** ‘The hierarchical organization of nervous mechanisms underlying instinctive behaviour’, *Symposium of the Society for Experimental Biology*.
- 104. Tinbergen, N. (1951)** ‘The study of instinct’, *Trends in Ecology and Evolution*. doi: 10.1016/0169-5347(90)90013-4.
- 105. Tinbergen, N. (1963)** ‘On aims and methods of ethology Tinbergen’s Legacy’, 20(1963), pp. 410–433.
- 106. Vandenberg, J. (1983)** ‘Pheromonal regulation of puberty’, *Pheromones and reproduction in mammals*, pp. 95–112.
- 107. Vandenberg, J. G. (1969)** ‘Male Odor Accelerates Female Sexual Maturation in Mice’, *Endocrinology*, 84(3), pp. 658–660. doi: 10.1210/endo-84-3-658.
- 108. Whitten, W. K., Bronson, F. H. and Greenstein, J. A. (1968)** ‘Estrus-Inducing Pheromone of Male Mice: Transport by Movement of Air’, *Science*, 161(3841), p. 584 LP-585. doi: 10.1126/science.161.3841.584.
- 109. Wright, S. L. and Brown, R. E. (2000)** ‘Maternal behavior, paternal behavior, and pup survival in CD-1 albino mice (*Mus musculus*) in three different housing conditions.’, *Journal of Comparative Psychology*. US: American Psychological Association, pp. 183–192. doi: 10.1037/0735-7036.114.2.183.
- 110. Ziesmann, J. et al. (2002)** ‘Combinatorial pheromone coding visualized in the mouse main olfactory epithelium’, *Chemical Senses*, 27, p. 664.