

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2004

УДК 612.017.33.084

М. П. Мошкин, Л. В. Акинчина, О. Т. Кудаева, И. Е. Колосова, В. А. Козлов

ВЛИЯНИЕ ЗАПАХА САМОК НА ИММУНИТЕТ, ЭНДОКРИННЫЙ СТАТУС И АГРЕССИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ САМЦОВ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ

Институт систематики и экологии животных СО РАН, Институт клинической иммунологии СО
РАМН, Новосибирск

Исследовали влияние запаха самок (экспозиция в течение 1, 7 или 21 сут) на иммунные функции самцов ICR, содержащихся группами по 4 особи. Наличие хемосигналов самок вело к повышению концентрации тестостерона в плазме крови самцов и временной активации адreno-кортикальной системы — концентрация кортикостерона в плазме крови повышалась на 7-е сутки запаховой экспозиции. Хемосигналы самок подавляли гуморальный иммунный ответ на введение эритроцитов барана, а также снижали пролиферативную реакцию В клеток на LPS, но не влияли на величину клеточного иммунного ответа и даже усиливали спонтанный синтез IgG клетками селезенки. Иммуносупрессивный эффект запаха самок нивелировался при кастрации. Андроген-зависимое подавление механизмов гуморального иммунитета не сказывалось отрицательно на выживаемости самцов при внутригрупповой агрессии. Иммунофизиологические изменения, вызванные репродуктивными хемосигналами самок, наоборот, повышали устойчивость самцов к ранениям, вероятность которых, как известно, возрастает при конкуренции за потенциального полового партнера.

The impact produced by the smell of ICR females (1-, 7- or 21-day expositions) on the immune functions of ICR males, which were kept in 4-species groups, was investigated. Chemosignals of females provoked a higher concentration of testosterone in blood plasma of males and activated temporarily the adrenocortical system — the concentration of corticosterone in blood plasma was increasing by day 7 of the smell exposition. The chemosignals suppressed the humoral response to sheep erythrocytes (SE) and reduced the proliferative response of B cells to LPS, but they did not affect the scope of the cell immune response (CIR) and even intensified the spontaneous synthesis of IgG by splenic cells. The immunosuppressive effect from the smell petered out in castration. The androgen-dependent suppression of the humoral-response mechanisms did not affect negatively the survival of males in group aggression. It was rather the other way: the immunophysiological changes caused by the reproductive chemosignals of females contributed to a better resistance of males to trauma, whose probability increases in competition for a potential sexual partner.

Повышенная восприимчивость самцов к инфекционным агентам, с одной стороны, и их меньшая подверженность аутоиммунным заболеваниям, с другой, рассматриваются как один из основных аргументов в пользу полового диморфизма иммунных функций [16, 20, 25]. Ведущей причиной иммунологических различий самцов и самок является специфика регуляторного влияния мужских и женских половых гормонов на клетки иммунной системы [14, 23, 24]. В частности, андрогены повышают образование цитотоксических CD8⁺-лимфоцитов [23, 26], а также усиливают синтез противовоспалительного интерлейкина-10 и подавляют продукцию провоспалительных цитокинов [8, 19], что в конечном счете приводит к подавлению иммунных реакций на чужеродные антигены [11].

Вместе с тем оценки гуморального и клеточного иммунного ответа не всегда подтверждают представления о меньшей эффективности защитных механизмов у самцов по сравнению с самками. Исследования, выполненные на пенсильванских и прерийных полевках, показали, что проявление иммунного полового диморфизма во многом зависит от социальной среды, в которой находятся животные [15]. Содержание самцов отдельно от самок маскирует иммуносупрессивный эффект полового созревания, характерный для полигамного вида — пенсильванской полевки, что объясняется недостаточной активацией эндокринной функции гонад. Как известно, физические или ольфакторные контакты с самками активируют гипоталамо-гипофизарно-гонадную систему [5, 9], усиливают проявление межсамцовой агрессии [5, 22], стимулируют сперматогенез [18].

Ранее в наших исследованиях, выполненных на аутбредных мышях ICR, было показано, что даже кратковременная, в пределах 5 сут, экспозиция запахом самок приводит почти к 2-кратному снижению гуморального иммунного ответа на введение эритроцитов барана (ЭБ). Однако подавление иммунитета, наблюдаемое при разных сроках воздействия запахом самок или при содержании подопытных самцов в общей комнате (но не в клетке) с особями противоположного пола, не всегда сочеталось с увеличением концентрации тестостерона в плазме крови [21]. Вместе с тем, если у самцов, содержащихся изолированно от самок, уровень андрогенов, измеренный за 1 сут до введения ЭБ, положительно коррелировал с количеством антителообразующих клеток (АОК), то в экспериментальных группах была отмечена отрицательная корреляция между базальной концентрацией тестостерона и силой иммунного ответа. Практически одновременно и независимо от наших исследований иммуносупрессивный эффект запаха самок был продемонстрирован Б. П. Суриновым и соавт. [6].

В их исследовании, выполненном на самцах мышей СВА, было показано, что 3-дневная экспозиция запахом половозрелых самок также вызывает почти 2-кратное уменьшение количества АОК селезенки, индуцированного введением ЭБ.

Представленная работа посвящена дальнейшему изучению феномена ольфакторной иммуномодуляции. Влияние запаха самок на иммунные функции изучено у самцов мышей ICR, которых в отличие от предыдущих исследований содержали группами по 4 особи. Групповое содержание может внести дополнительный вклад в изменения иммунных и эндокринных характеристик благодаря влиянию запаха самок на проявление межсамцовой агрессии. У самцов, имевших разную продолжительность запаховой экспозиции, определяли силу клеточного и гуморального иммунного ответа на Т-зависимый антиген, а также функциональные свойства клеток селезенки в культуре *in vitro*: пролиферативный ответ на Т- и В-клеточные митогены и спонтанную и LPS-индуцированную продукцию IgG клетками селезенки. Кроме того, были исследованы базальные концентрации тестостерона и кортикостерона в плазме крови самцов, содержащихся в течение разного периода времени в изоляции от самок или в присутствии их запаха. Для оценки роли тестостерона в реализации иммуномодулирующего эффекта хемосигналов исследовано влияние запаха на реактивность гуморального иммунитета кастрированных самцов.

Материалы и методы. Аутбредные мыши ICR в возрасте 8—10 нед были получены из вивария ГНЦ вирусологии и биотехнологии "Вектор" (Новосибирск). Первые 2 нед адаптации к новым условиям и в течение всего эксперимента самцов и самок содержали отдельно в изолированных комнатах (в 2 комнатах самцы, в 1 комнате самки) с отдельной вентиляцией при температуре 20—22°C и искусственном световом режиме 14 ч свет—10 ч темнота (свет включали в 6 ч местного времени). Корм и воду давали *ad libitum*. Самцов содержали по 4 особи в стандартных пластиковых клетках, самок — по 5—6 особей. Подстилку (древесные опилки) в клетках самцов и самок меняли 1 раз в неделю. После привыкания к условиям вивария самцам, содержащимся в одной из комнат, предоставляли запаховые сигналы самок. Для этого загрязненную подстилку из клеток с самками помещали в контейнерах из медной сетки (около 5 мл) на крышку клетки с самцами, в углубление для кормушки. Самцам из второй комнаты предъявляли контейнеры с чистыми опилками. Содержимое всех контейнеров меняли ежедневно за 10—20 мин до выключения света. Материал для иммунологических и эндокринных исследований брали в интервале от 9 до 10 ч местного времени, а поведенческие наблюдения проводили в первые 2 ч после выключения света.

Гуморальный и клеточный иммунный ответ, а также функциональные свойства спленоцитов *in vitro* исследовали у самцов, экспонированных запахом самок в течение 1, 7 и 21 сут. После внутрибрюшинного введения 0,5 мл 2% суспензии ЭБ продолжали ежедневное предъявление загрязненной подстилки вплоть до определения числа АОК методом локального гемолиза в жидкой среде [10]. Контролем служили самцы, содержащиеся в изоляции от самок.

Для выяснения роли половых гормонов в запаховой иммуномодуляции часть самцов кастрировали под эфирным нарко-

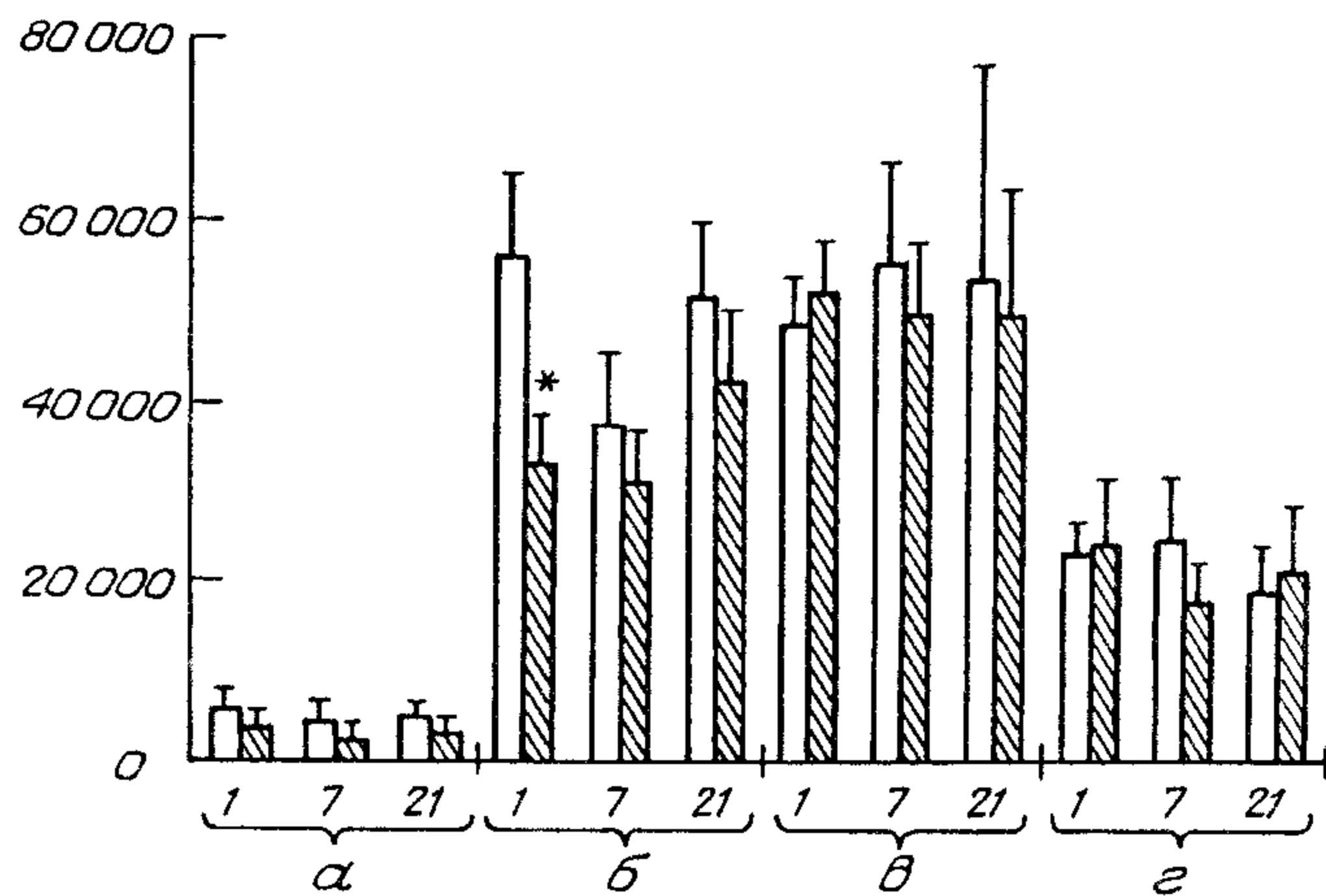


Рис. 1. Спонтанная и митогениндуцированная пролиферация клеток селезенки.

По оси абсцисс — продолжительность запаховой экспозиции (дни), по оси ординат — пролиферация клеток селезенки (срн, количество импульсов в 1 мин на $100 \cdot 10^3$ клеток). а — спонтанная пролиферация; б — пролиферативный ответ на LPS; в — пролиферативный ответ на ConA; г — пролиферативный ответ на PWM ($n = 8-16$). Здесь и на рис. 2–5: темные столбцы — самцы, получавшие хемосигналы самок, светлые столбцы — самцы, содержащиеся в изоляции от особей противоположного пола. Здесь и на рис. 2–4 звездочками обозначены достоверные различия между самцами, получавшими и не получавшими хемосигналы самок: одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$ по критерию t Стьюдента для логарифмированных значений показателей.

зом, а часть самцов были подвергнуты ложной операции. Через 2 нед после операции половину гонадэктомированных и ложнооперированных самцов экспонировали запахом самок в течение 4 дней до введения ЭБ и в последующие дни до определения количества АОК, а другую половину содержали в изоляции от самок.

Клеточный иммунитет оценивали по степени выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) [27]. Пролиферативный ответ спленоцитов на Т- и В-клеточные митогены (ConA, PWM и LPS) и аллоантигены тестировали по включению ^3H -тимидина в культуре *in vitro* [1]. Спонтанный и LPS-индуцированный синтез IgG определяли в супернатантах клеточных культур твердофазным вариантом метода ELISA: субстрат — оксифенилендиамин ("Sigma"); планшеты Е. 1. А ("Linbro"), аппарат "Titertec Multiskan" (492 нм) [3].

Концентрацию кортикостерона в плазме крови определяли методом конкурентного белкового связывания [7]. Для твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) концентрации тестостерона использовали наборы "СтероидИФА-тестостерон-01" (ЗАО "Алкор Био").

Уровень внутригрупповой агрессии оценивали у животных, экспонированных запахом самок в течение более 1 нед, и у соответствующей группы самцов, изолированных от хемосигналов самок. Поведенческие наблюдения проводили во время регулярной (1 раз в неделю) смены подстилки, что, как правило, стимулирует агонистические взаимодействия в группах мышей с установившейся иерархией. В течение 10 мин регистрировали количество атак, преследований, парных драк, виляний хвостом, вокализаций, защитных стоек и выпадов. После декапитации у всех животных оценивали степень повреждения кожных покровов по 6-балльной шкале: 0 баллов — отсутствие повреждений, 1 балл — единичные шрамы от укусов на хвосте, 2 балла — единичные шрамы от укусов на теле, 3 балла — множественные шрамы от укусов на задней части спины, 4 балла — множественные шрамы от укусов на всем туловище, 5 — множественные шрамы, сливающиеся в сплошные области повреждения.

Двухфакторный дисперсионный анализ и критерий t Стьюдента были использованы для оценки влияния запаха самок и продолжительности экспозиции на ГЗТ и логарифмированные значения концентрации гормонов, количества АОК и показатели спонтанной и митогениндуцированной пролиферации клеток селезенки, а также на синтез IgG. Различия по показателям агонистического поведения и индексам повреждения покровов оценивали по критерию Манна—Уитни. Смертность в разных группах самцов сравнивали по критерию χ^2 .

Результаты и обсуждение. Согласно данным двухфакторного дисперсионного анализа, хемосигналы самок независимо от продолжительности воздействия ($F_{2,18} = 0,06$, $p = 0,94$) статистически значимо влияли на величину гуморального иммунного ответа ($F_{2,18} = 14,78$, $p = 0,0012$), вызывая снижение количества АОК в селезенке ($1756,0 \pm 219,0$) по сравнению с таковым у самцов, содержащихся изолированно от самок ($6241,0 \pm 1964,0$). Достоверный супрессивный эффект наблюдался даже после экспозиции запахом в течение одной ночи перед введением ЭБ. Ранее нами [21] и Б. П. Суриновым и соавт. [6] также было показано, что увеличение срока экспозиции не усиливает иммуносупрессивный эффект хемосигналов. Вместе с тем ни различия в запаховой среде ($F_{1,23} = 1,24$, $p = 0,28$), ни длительность экспозиции хемосигналами ($F_{1,23} = 2,22$, $p = 0,15$) не оказывали достоверного влияния на величину клеточного иммунного ответа, оцененного с помощью ГЗТ-теста.

Подавление гуморальной реакции самцов под влиянием хемосигналов самок сочеталось с достоверным снижением пролиферативной способности В-клеток селезенки. Экспозиция запахом самок независимо от ее продолжительности ($F_{2,55} = 0,85$, $p = 0,43$) приводила к достоверному уменьшению пролиферации В-клеток, вызванной добавлением LPS ($F_{1,55} = 3,82$, $p = 0,05$), хотя при анализе по отдельным срокам экспозиции статистически значимые различия были выявлены лишь в самом начале предъявления хемосигналов (рис. 1). Вместе с тем ни один из этих факторов не влиял на спонтанную ($F_{1,56} = 0,10$, $p = 0,76$ и $F_{2,56} = 1,14$, $p = 0,33$ соответственно для запаха и времени экспозиции), ConA-индуцированную ($F_{1,55} = 0,81$, $p = 0,37$ и $F_{2,55} = 2,96$, $p = 0,06$) и PWM-индуцированную ($F_{1,58} = 0,35$, $p = 0,55$ и $F_{2,58} = 2,40$, $p = 0,10$) пролиферацию спленоцитов.

Спонтанный, но не LPS-индуцированный, синтез IgG клетками селезенки, полученными после 3-недельной экспозиции самцов хемосигналами самок, был достоверно выше, чем в соответствующей группе самцов, содержащихся изолированно от особей противоположного пола (рис. 2). Это обстоятельство, свидетельствующее о поликлональной активации В-лимфоцитов, может служить од-

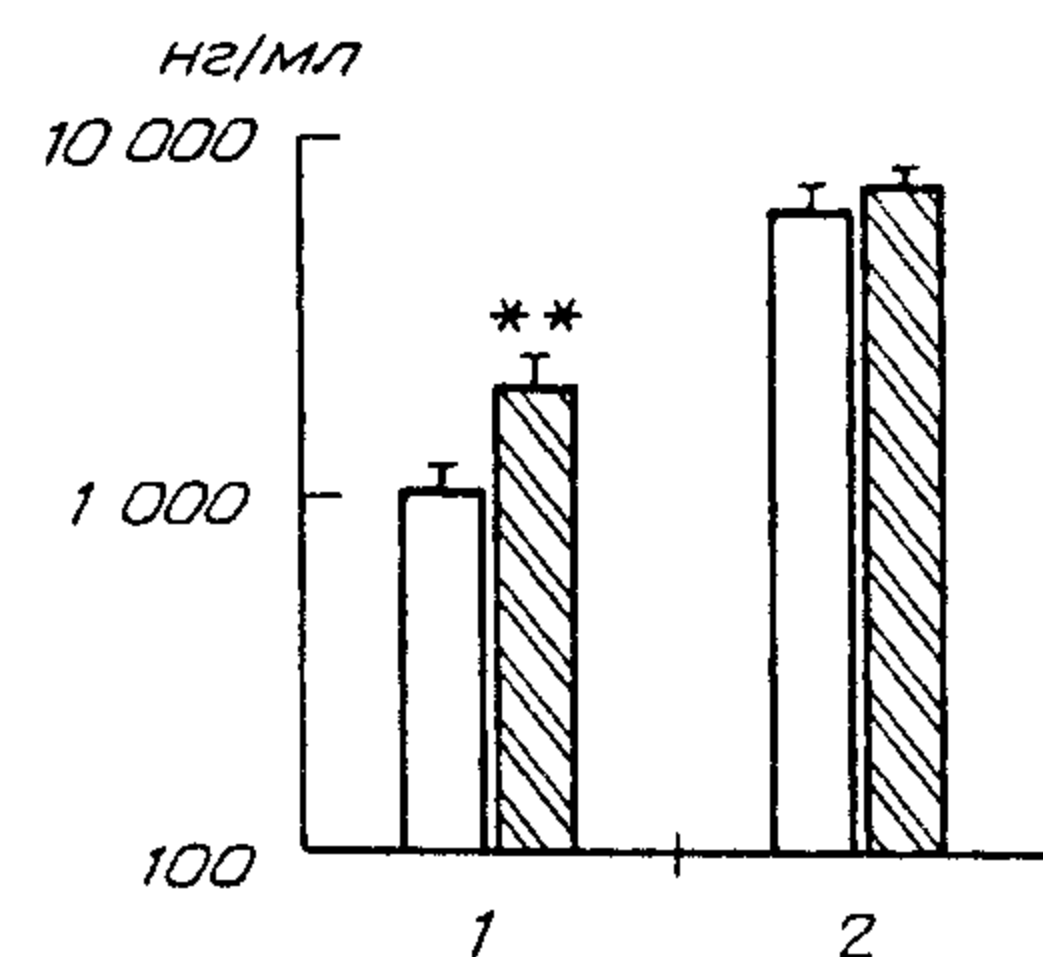


Рис. 2. Спонтанный (а) и LPS-индуцированный (б) синтез IgG у самцов, экспонированных запахом самок в течение 21 сут ($n = 14-16$).

По оси ординат — концентрация IgG (в нг/мл).

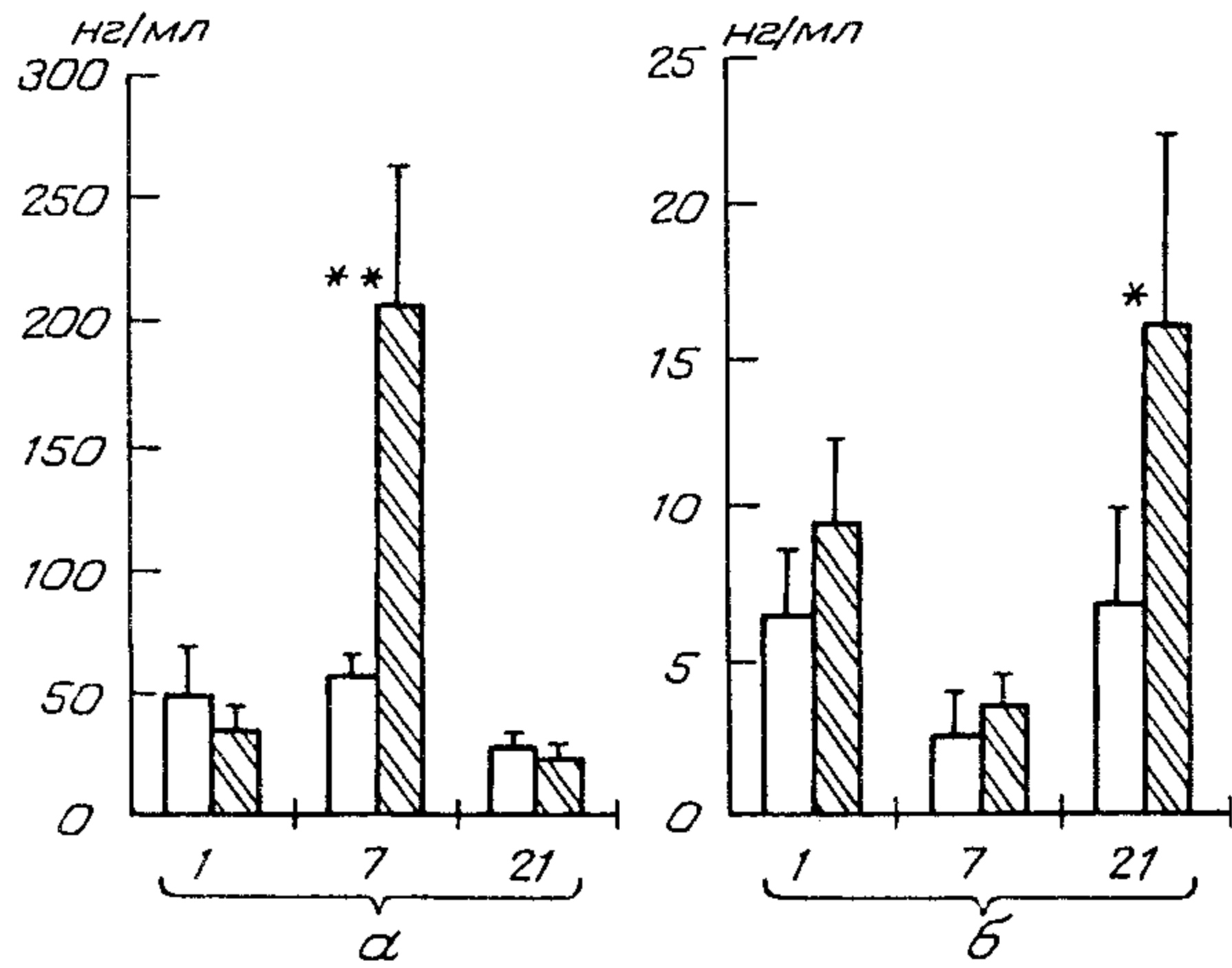


Рис. 3. Концентрация кортикостерона (а) и тестостерона (б) в плазме крови самцов при разных сроках экспозиции запахом самок ($n = 4-8$).

По осям абсцисс — продолжительность запаховой экспозиции (дни), по осям ординат — концентрация гормона (в нг/мл).

ной из причин снижения гуморального иммунного ответа на ЭБ [4, 17].

Центральное место в механизмах реагирования самцов на феромоны особей противоположного пола отводится активации эндокринной функции гонад и коры надпочечников [5, 9]. Гормоны этих желез — глюкокортикоиды и андрогены обладают иммуносупрессивными свойствами [14]. Как показали результаты двухфакторного дисперсионного анализа, на концентрацию кортикостерона в плазме крови самцов достоверно влияли продолжительность экспозиции ($F_{2, 48} = 17,93, p < 0,001$) и взаимодействие факторов — время и запах самок ($F_{2, 48} = 3,74, p = 0,031$). В группе самцов, получавших ольфакторные стимулы, наибольший уровень кортикостерона отмечен на 7-е сутки запаховой экспозиции (рис. 3, а). В это время он достоверно превышал таковой в группе самцов, содержащихся изолированно от особей противоположного пола, а также средние концентрации глюкокортикоидов, отмеченные после 1- и 21-го дня экспозиции запахом самок ($p < 0,05$, LSD-тест). Ранее при исследовании содержащихся в отдельных клетках самцов ICR мы не отмечали существенных различий по концентрации кортикостерона в плазме крови между группами самцов, получавших и не получавших хемосигналы самок [21]. В данном исследовании уровень глюкокортикоидов резко возрастал после недельной экспозиции, а затем снижался до базальных величин. Такая динамика адренокортикальной активности могла быть вызвана всплеском внутригрупповой агрессии, обусловленной хемосигналами самок (см. ниже).

Основной вклад в изменчивость концентрации тестостерона вносили условия содержания самцов, а именно — наличие хемосигналов самок, вызывавшее достоверное повышение уровня андрогенов по сравнению с таковым в группах животных, содержащихся изолированно от особей противоположного пола ($F_{1, 46} = 4,27, p = 0,044$; рис. 3, б). Продолжительность запаховой экспозиции не оказывала существенного влияния на концентрацию

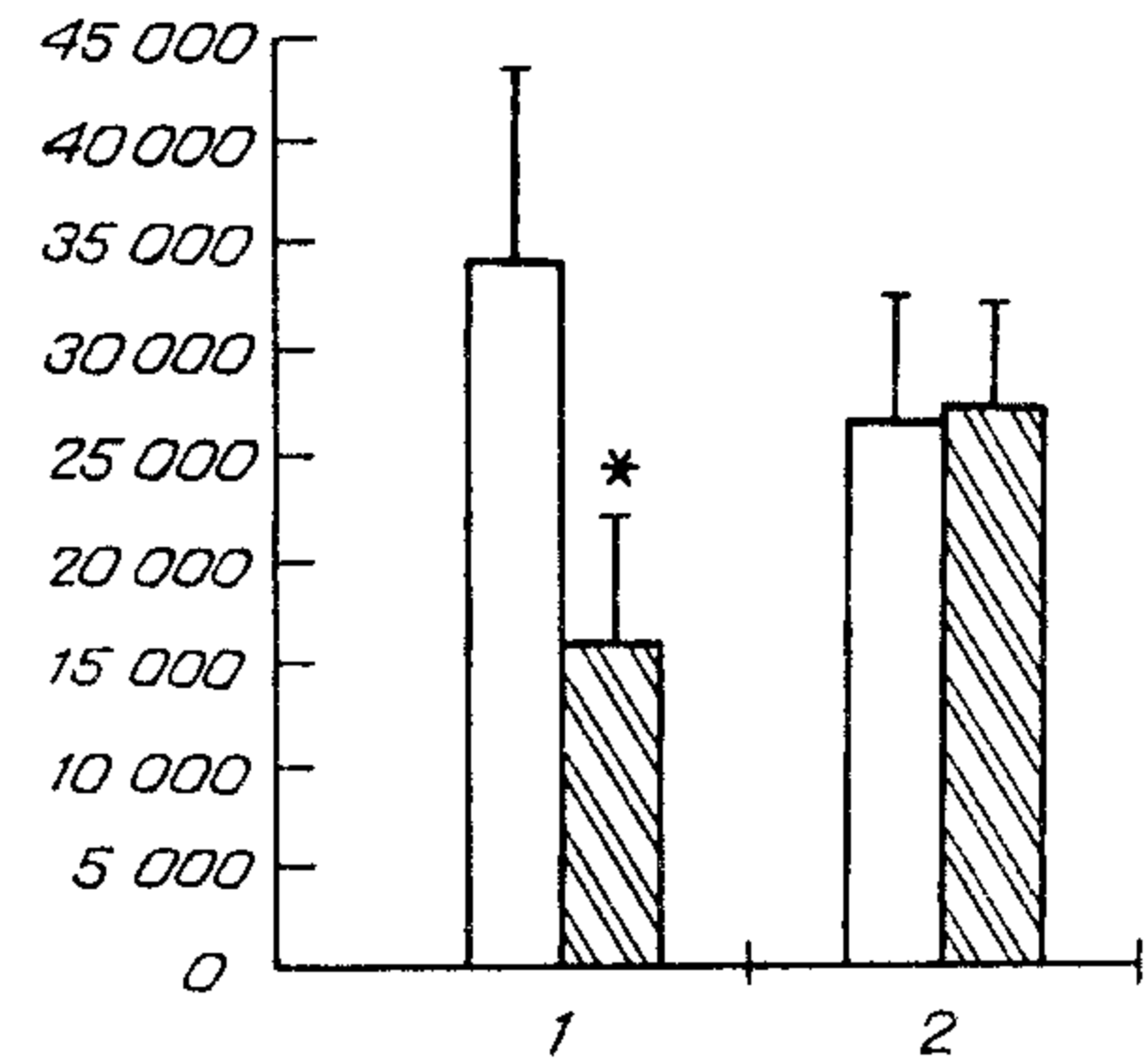


Рис. 4. Влияние запаха самок на величину гуморального иммунного ответа у ложнооперированных (а) и гонадэктомированных (б) самцов ($n = 9-10$).

По оси ординат — количество АОК.

тестостерона ($F_{2, 46} = 1,39, p = 0,26$). Таким образом, в отличие от транзитного подъема концентрации кортикостерона запах самок вызывает устойчивое повышение эндокринной функции гонад. Это указывает на ключевую роль тестостерона в подавлении гуморального иммунного ответа, наблюдаемого независимо от срока экспозиции. Действительно, кастрация полностью нивелировала иммуносупрессивный эффект репродуктивных хемосигналов (рис. 4).

Суммарное количество актов агрессивного и субмиссивного поведения было достоверно выше в группах самцов, экспонированных запахом самок (рис. 5, а). У этих же животных были отмечены более выраженные повреждения шкурки в результате укусов по сравнению с группами самцов, изолированных от запаха самок (рис. 5, б). Вместе с тем смертность от укусов была достоверно выше среди самцов, не получавших хемосигналов самок. В этих группах из 20 самцов со следами укусов на шкурках погибли 7 особей, тогда как среди самцов, экспонированных запахом самок, из 23 животных с укусами погибли только 2 особи ($\chi^2 = 4,47, p = 0,035$). Этот довольно неожиданный результат противоречит существующим представлениям о негативном

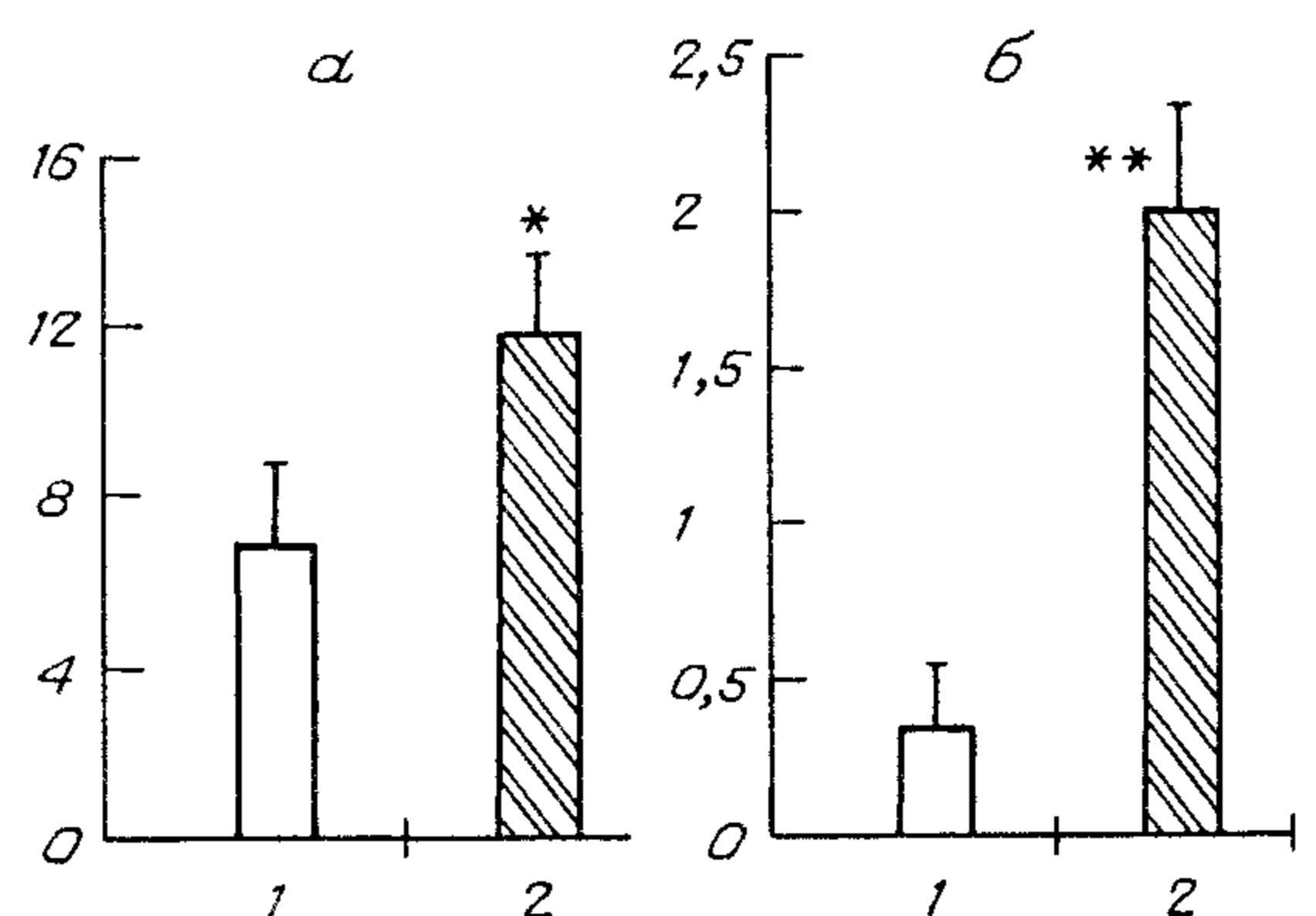


Рис. 5. Интенсивность внутригрупповой агрессии (а) и степень повреждения покровов (б) у самцов ($n = 23-32$).

По осям ординат: а — агрессия, выраженная как сумма актов агонистического поведения; б — степень повреждения кожных покровов, выраженная в условных единицах. Одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$ по критерию Манна—Уитни.

влиянии на заживление ран андрогениндуцированной иммуносупрессии [13]. Однако наряду с локальными эффектами андрогены вовлекаются в системные реакции организма. В частности, тестостерон оказывает анаболическое действие, а также стимулирует гемопоэз, усиливая пролиферативную активность полипотентных стволовых клеток и миграцию стволовых клеток из костного мозга в селезенку [2]. Оба эти эффекта компенсируют негативное влияние кровопотери и катаболизма, наблюдаемых при повреждении кожных покровов [12].

Таким образом, доступ к хемосигналам половозрелых самок, который во многом определяется развитием вторичных половых признаков, вносит дополнительный вклад в формирование отрицательной корреляции между экспрессией этих признаков и защитными функциями самцов. Наблюдаемое при экспозиции запахом самок андрогензависимое подавление механизмов гуморального иммунитета не сказывается отрицательно на выживаемости при межсамцовой агрессии. Скорее наоборот, иммуно-физиологические изменения, вызванные репродуктивными хемосигналами, повышают устойчивость самцов к ранениям, вероятность которых, как известно, возрастает при конкуренции за потенциального полового партнера.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант 02-04-49253) и гранта Президента РФ для поддержки ведущих научных школ (НШ-1038.4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Клаус Дж. Лимфоциты. Методы. — М., 1990.
2. Козлов В. А., Журавкин И. Н., Цырлова И. Г. Стволовая кровяная клетка и иммунный ответ. — Новосибирск, 1982.
3. Кэтти Д. Антитела. Методы. — М., 1991. — Т. 2.
4. Линг Н. Р. Стимуляция лимфоцитов. — М., 1971.
5. Науменко Е. В., Осадчук А. В., Серова Л. И., Шишкина Г. Т. Генетико-физиологические механизмы регуляции функции семенников. — Новосибирск, 1983.
6. Суринов Б. П., Исаева В. Г., Кулиш Ю. С. Иммуносупрессирующее влияние летучих хемосигналов мышьяк-самок на самцов // Иммунология. — 2001. — № 6. — С. 41—42.
7. Тинников А. А., Бажан Н. М. Определение глюкокортикоидов в крови и культуре надпочечников методом конкурентного белкового связывания без предварительной экстракции // Лаб. дело. — 1984. — № 12. — С. 709—713.
8. Bebo V. F. Jr., Schuster J. C., Vandembark A. A., Offner H. Androgens alter the cytokine profile and reduce encephalitogenicity of myelin-reactive T cells // J. Immunol. — 1999. — Vol. 162. — P. 35—41.
9. Bronson F. H. The reproductive ecology of the house mouse // Quart. Rev. Biol. — 1979. — Vol. 54. — P. 265—299.
10. Cunningham A. J. A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells // Nature. — 1965. — Vol. 207. — P. 1106—1107.
11. Cutolo M., Serio B., Villaggio B. et al. Androgens and estrogens modulate the immune and inflammatory responses in rheumatoid arthritis // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 2002. — Vol. 966. — P. 131—142.
12. Demling R. H., Orgill D. P. The anticatabolic and wound healing effects of the testosterone analog oxandrolone after severe burn injury // J. Crit. Care. — 2000. — Vol. 15, N 1. — P. 12—17.
13. Gilliver S. C., Wu F., Ashcroft G. S. Regulatory roles of androgens in cutaneous wound healing // Thromb. Haemost. — 2003. — Vol. 90, N 6. — P. 978—985.
14. Grossman Ch. J. Interactions between the gonadal steroids and the immune system // Science. — 1985. — Vol. 227. — P. 257—261.
15. Kimura M., Gleichmann E. Depressed antibody responses to exogenous antigens in mice with lupus-like graft-versus-host disease // Clin. Immunol. Immunopathol. — 1987. — Vol. 43, N 1. — P. 97—109.
16. Klein S. L., Nelson R. J. Social interactions unmask sex differences in humoral immunity in voles // Anim. Behav. — 1999. — Vol. 57. — P. 603—610.
17. Klein S. L. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior // Neurosci. Biobehav. Rev. — 2000. — Vol. 24. — P. 627—638.
18. Koyama S., Kamimura A. Influence of social dominance and female odor on the sperm activity of male mice // Physiol. and Behav. — 2000. — Vol. 71. — P. 415—422.
19. Liva S. M., Voskuhl R. R. Testosterone acts directly on CD4⁺ T lymphocytes to increase IL-10 production // J. Immunol. — 2001. — Vol. 167. — P. 2060—2067.
20. Moshkin M. P., Gerlinskaya L. A., Evsikov V. I. The role of the immune system in behavioral strategies of reproduction // J. Reprod. Dev. — 2000. — Vol. 46, N 6. — P. 341—365.
21. Moshkin M. P., Kolosova I. E., Novikov E. A. et al. Co-modulation of the immune function and the reproductive chemosignals // Asian-Aust. J. Anim. Sci. — 2001. — Vol. 14, Spec. Issue. — P. 43—51.
22. Mugford R. A. Intermale fighting affected by home-cage odors of male and female mice // J. Comp. Physiol. Psychol. — 1973. — Vol. 84, N 2. — P. 289—295.
23. Olsen N. J., Watson M. B., Henderson G. S., Kovacs W. J. Androgen deprivation induces phenotypic and functional changes in the thymus of adult male mice // Endocrinology. — 1991. — Vol. 129. — P. 2471—2476.
24. Roberts C. W., Walker W., Alexander J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites // Clin. Microbiol. Rev. — 2001. — Vol. 14, N 3. — P. 476—488.
25. Whitacre C. C. Sex differences in autoimmune disease // Nat. Immun. — 2001. — Vol. 2. — P. 777—780.
26. Yao G., Liang J., Han X., Hou Y. In vivo modulation of the circulating lymphocyte subsets and monocytes by androgen // Int. Immunopharmacol. — 2003. — Vol. 3, N 13—14. — P. 1853—1860.
27. Yoshikai Y., Miake S., Matsumoto T. et al. Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed footpad reaction to SRBC in mice // Immunology. — 1979. — Vol. 8, N 3. — P. 577—583.

Поступила 30.03.04