ОНТОГЕНЕЗ, 2012, том 43, № 5, с. 357–365

ФИЗИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

УДК 574.3+591.3+57.02

РЕПРОДУКТИВНЫЙ УСПЕХ САМЦОВ АУТБРЕДНОЙ ЛИНИИ ICR ПРИ РАЗМНОЖЕНИИ НА ФОНЕ АНТИГЕННОЙ СТИМУЛЯЦИИ

© 2012 г. Л. А. Герлинская*, С. О. Масленникова, Е. Л. Завьялов, Г. В. Концевая, М. П. Мошкин

Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, д. 10

**Институт систематики и экологии животных СО РАН, 630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, д. 11*

Томский государственный университет, 634050, Томск, пр. Ленина, 36

E-mail: lgerlinskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 11.03.11 г.

Окончательный вариант получен 28.12.11 г.

Многообразие вирусов, бактерий, микроскопических грибов, эндо- и эктопаразитов являются неизбежным фактором среды, чье влияние на воспроизводство хозяев определяется не только негативными эффектами инфекционных болезней, но и активацией защитных механизмов, обеспечивающих противостояние прессу паразитов. В данной работе для изучения репродуктивных последствий антигенной стимуляции особей мужского пола, самцам аутбредной линии ICR вводили гемоцианин. На начальном этапе антителообразования к контрольным и антигенстимулированным самцам подсаживали интактных самок. В течение 6-ти дней совместного содержания у самок, подсаженных к самцам, которым вводили гемоцианин, было зарегистрировано достоверно большее число овулировавших яйцеклеток и живых эмбрионов по сравнению с теоретически ожидаемым для равного репродуктивного выхода. Самки, покрытые антигенстимулированными самцами, вынашивали более крупных эмбрионов по сравнению с таковыми в контроле. Показатели плодовитости самок зависели от преобладания у антигенстимулированных самцов клеточного (Th1) или гуморального (Th2) иммунных ответов. Смещение Th1/Th2 баланса приводило к тому, что у самок, покрытых самцами с преобладанием клеточного иммунного ответа, были более высокие доимплантационные эмбриональные потери, но они вынашивали более крупных эмбрионов. Таким образом, установлено, что активация иммунной системы самцов сама по себе влияет на их репродуктивные способности. Это позволяет, с одной стороны, объяснить вклад защитных реакций организма в повышение фертильности млекопитающих, населяющих территории с высоким видовым обилием паразитов, а, с другой, показывает новые пути управления размножением животных, разводимых под контролем человека.

Ключевые слова: гемоцианин, антигенная стимуляция самцов, беременность, эмбриональные потери, масса эмбрионов, иммунный ответ, Th1, Th2, IgG1, IgG2a.

Многочисленные клинические, ветеринарные и экологические наблюдения свидетельствуют о негативном влиянии инфекций и паразитарных болезней на репродуктивные характеристики особей обоего пола (Benfield et al., 1992; Feore et al., 1997; Deter, et al., 2007; Fichorova, 2009; Nour, 2010). Это положение подкрепляют результаты экспериментального заражения лабораторных животных, согласно которым инфицирование приводит к снижению внешней привлекательности потенциальных брачных партнеров (Kavaliers, Colwell, 1995; Willis, Poulin, 2000), подавляет гаметогенез и половое поведение (Weiss et al., 2009; Arteaga-Silva et al., 2009), а также повышает риск до и постимплантационной гибели эмбрионов (Fitzgerald, Shellam, 1992; Moshkin et al., 2002).

Следовательно, увеличение паразитарного пресса должно приводить к сокращению воспроизводства в популяциях хозяев. Вместе с тем, тщательный анализ рождаемости в 150 этнических группах людей свидетельствует об обратном (Guegan et al., 2001). Используя статистические приемы, которые позволяют нивелировать влияние факторов, связанных с образом жизни (характер питания, религиозная принадлежность, уровень образования и др.), авторы показывают, что фактическая плодовитость женщин находится в прямой зависимости от видового разнообразия возбудителей паразитарных и инфекционных болезней на территории проживания исследуемых групп. Более того, не только общее число детей, но и масса новорожденных имеют нелинейную зависимость от биоразнообразия паразитов (Thomas et al., 2004). Самые крупные дети рождаются в этнических группах, живущих в условиях минимального паразитарного окружения, а самые маленькие при близком к среднему видовому разнообразию паразитов. Далее масса тела новорожденных возрастает пропорционально росту паразитарного обилия.

При обсуждении полученных результатов авторы акцентируют внимание на возможности адаптивной селекции, которая обеспечивает устойчивое существование популяций в условиях

видового обилия паразитов и которая предполагает генетически детерминированные межпопуляционные различия по репродуктивным параметрам (Guegan et al., 2001; Thomas et al., 2004). Однако не исключено, что в формирование данного феномена вносят вклад не только микроэволюционные преобразования. Разнообразие паразитических видов может положительно влиять на плодовитость хозяев, как следствие иммунофизиологического реагирования на интервенцию паразитов, сформировавшихся в ходе паразит-хозяинной коэволюции. Обилие паразитов в сочетании с разнообразной комменсальной микрофлорой неизбежно активирует системы иммунной защиты. При этом далеко не во всех случаях интервенции вирусов, бактерий, экто- и эндопаразитов приводят к болезни. Иными словами, оценивая репродуктивные последствия существования в среде с большим разнообразием паразитов нужно четко разграничить собственные эффекты инфекционных болезней, включая гельминтозы, от эффектов мобилизации различных звеньев иммунной системы.

Одним из подходов, который позволяет исследовать вклад защитных процессов в репродукцию, заключается в использовании чужеродных не реплицируемых антигенов. Их введение позволяет оценить как, в зависимости от фазы иммунного ответа и преобладающего варианта иммунного реагирования, изменяются вторичные половые признаки, определяющие привлекательность партнера, а также эффективность спаривания, вынашивания и выкармливания потомков. Первые результаты, указывающие на возможность позитивного влияния антигенной стимуляции на процессы беременности, были получены при изучении влияния иммуногенетических различий в системе мать-плод на жизнеспособность эмбрионов (Billington, 1964; James, 1967). Последующие результаты оказались не столь оптимистичными, поскольку подтвердить данные Джеймса (James, 1967) не удалось (Clarke, 1971; Hetherington, Humber, 1975; Hetherrington 1978, Ho et al., 1994). В этих работах, выполненных на инбредных линиях мышей, самкам в разные сроки после внутрилинейных скрещиваний вводили либо клетки селезенки, либо эритроциты самцов иной генетической принадлежности. Противоречивость полученных результатов отчасти объясняется тем, что разные авторы вводили чужеродные антигены на постимплантационной стадии беременности. В более поздних работах учет сроков становления иммуногенетического диалога матери и плода, который начинается с экспрессии генов гистосовместимости уже на 2-х клеточной стадии развития (Goldbard et al., 1985; Warner, Gollnick, 1993), позволил воспроизвести показанные Джеймсом (1967) положительные эффекты антигенной стимуляции. Так, в исследовании Герлинской и соавт. (Gerlinskaya et al., 2000) было установлено, что введение инбредным самкам линии BALB/c на 2-е сутки после внутрилинейного скрещивания эритроцитов, взятых от самцов линии C57Bl, приводит к увеличению массы тела эмбрионов и к снижению постнатальной гибели новорожденных. Учитывая общность иммунных процессов, развертывающихся в ответ на самые разнообразные антигенные стимулы, можно предположить, что и паразитарные антигены, с которыми сталкивается материнская иммунная система, могут в зависимости от стадии беременности оказать положительное влияние на вынашивание и выкармливание потомков. Если при этом эффективность иммунной защиты будет достаточной для предотвращения инфекционной болезни.

Следует отметить, что риск столкновения с паразитами, как правило, выше у особей мужского пола, чем женского (Zuk, McKean, 1996). Тем не менее, исследования репродуктивных эффектов, обусловленных стимуляцией защитных механизмов самцов, ограничиваются, главным образом, работами, посвященными сигнальной привлекательности представителей мужского пола (Moshkin et al., 2000, 2002; Faivre et al., 2003; Zala et al., 2004; Garamszegi et al., 2004; Litvinova et al., 2005; Arakawa et al., 2009, 2010). Лишь в единичных исследованиях анализируется влияние антигенной стимуляции самцов на вероятность фертильного покрытия и последующее развитие потомков. В частности, активация неспецифического иммунитета введением бактериального липополисахарида (ЛПС) повышала общий репродуктивный выход у самцов олуши, причем только у старых особей (Velando et al., 2006). В опытах на мышах аутбредной линии ICR было установлено, что введение самцам ЛПС вызывает в первые часы подавление половой активности, но к концу 5-х суток совместного содержания самца с самками общее число фертильных покрытий и число живых эмбрионов не различается в контрольной и экспериментальной группах (Мошкин и др., 2009). При этом у интактных самок, покрытых ЛПС стимулированными самцами, отмечено снижение до- и постимплантационных эмбриональных потерь. Еще более выраженные репродуктивные эффекты были получены при подсадке интактных самок к самцам, чья иммунная система была активирована введением эритроцитов барана (ЭБ). При практически одинаковом числе фертильных покрытий спаривание с антигенстимулированными самцами характеризовалось большей потенциальной (число овулировавших яйцеклеток) и фактической плодовитостью самок (Мошкин и др., 2010). Причем основные репродуктивные эффекты антигенной стимуляции самцов приходились на 3–5-е сут после введения ЭБ, т.е. на период, соответствующий началу специфического антителообразования. Сопоставляя результаты экспериментов с введением ЛПС и ЭБ, можно заключить, что репродуктивные эф-

фекты, обусловленные активацией защитных механизмов, зависят от характера иммунной реакции. При активации неспецифического иммунитета самцов (введение ЛПС) у покрытых ими самок падают эмбриональные потери, а при развитии специфического иммунного ответа (введение ЭБ) увеличивается потенциальная и фактическая плодовитость.

Не вызывает сомнения, что в реализации репродуктивных эффектов при антигенной стимуляции принимают участие цитокины, которые вырабатываются активированными иммунокомпетентными клетками и влияют на многие нейроэндокринные процессы, включая регуляцию гаметогенеза и полового поведения (Larson, Dunn, 2001; Sarkar et al., 2011). Профиль секретируемых цитокинов может существенно различаться в зависимости от преобладания клеточного (Th1) или гуморального (Th2) иммунных ответов (Fietta, Delsante, 2009). В этой связи возникает вопрос, с преобладанием какого типа иммунного реагирования коррелируют репродуктивные эффекты, обусловленные введением чужеродных антигенов. Одним из интегральных критериев доминирования Th1 или Th2 вариантов иммунного ответа является определение изотипов иммуноглобулинов (IgG). Антителообразование при клеточном (Th1) иммунном ответе приводит к повышению титра IgG2a, а при гуморальном (Th2) титра IgG1 (Garraud et al., 2003).

В данной работе, выполненной на мышах аутбредной линии ICR, мы вводили самцам гемоцианин и использовали коммерчески доступные реактивы для определения изотипов антител (IgG2a и IgG1), специфических к данному антигену. Учитывая то обстоятельство, что наиболее выраженные позитивные изменения фертильности наблюдаются при спаривании, происходящим вслед за началом антителообразования, интактных самок подсаживали к самцам через 3-е суток после введения антигена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Исследование выполнено в марте–апреле 2010 г на лабораторных мышах аутбредной линии ICR в возрасте 3-месяцев, полученных из вивария ИЦиГ СО РАН. Самцов и самок содержали в изолированных помещениях с раздельной вентиляцией при температуре 21 ± 2°C и искусственном фотопериоде 14С:10Т (свет включался в 18 ч местного времени). Сухие древесные опилки использовали в качестве подстилочного материала. Стандартный брикетированный корм и воду животные получали *ad libitum*. За 2 недели до начала эксперимента самцы были рассажены по одному, а самки по 5 особей в пластиковые клетки (25 × 35 × 8). Для поддержания устойчивых эстральных циклов в клетки самок ежедневно, перед выключением света (в 17.30 ч местного времени) добавляли подстилку из клеток самцов.

Экспериментальные модели

Эксперимент 1. Изучение начальных стадий специфического антителообразования при инъекции гемоцианина. Исследование выполнено на 2-х группах самцов – экспериментальной и контрольной. Самцам (11 особей) экспериментальной группы вводили внутрибрюшинно в дозе 50 мкг на мышь гемоцианин (KLH – Keyhole Limpet Hemocyanin, Sigma). Контрольной группе – 8 самцов вводили физиологический раствор. На 3-и сут после инъекций гемоцианина и физиологического раствора декапитировали 9 животных (4 контрольных и 5 экспериментальных), а на 6-е сут 10 животных – 4 и 6 соответственно. В момент декапитации собирали кровь, которую для получения плазмы центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин, плазму крови хранили при –20°C до проведения анализов по определению уровня изотипов антител – IgG1 и IgG2a.

Эксперимент 2. Исследование репродуктивной эффективности самцов при антигенной стимуляции гемоцианином. Из самцов приблизительно равного веса было сформировано 2 группы (экспериментальная и контрольная) по 19 особей в каждой группе. Самцам экспериментальной группы внутрибрюшинно вводили гемоцианин в дозе, описанной выше, а контрольной группе в это же время вводили физиологический раствор. Весь эксперимент выполняли в 4 этапа, каждый из которых начинали с одновременного введения препаратов одинаковому числу контрольных и экспериментальных животных. На 3-е сутки после инъекций гемоцианина или физиологического раствора, к каждому самцу из экспериментальной и контрольной групп, сразу после отключения света, подсаживали по 2 самки и далее, в течение 6-ти сут, содержали совместно. Ежедневно с 4-х по 9-е сут после введения гемоцианина самок осматривали на наличие вагинальной пробки и при обнаружении таковой отсаживали в отдельные клетки. День отсадки считали первым днем беременности. Осмотр проводили по окончании каждой ночи. Для исключения возможных ошибок в определении покрытия всех самок, оставшихся непокрытыми, помещали в индивидуальные клетки.

На 9-е сут после инъекции гемоцианина или физиологического раствора у самцов брали при декапитации образцы плазмы крови для определения специфических антител IgG.

Определение уровня специфических к гемоцианину изотипов IgG1 и IgG2a

Уровень специфических антител анти-KLH IgG1 и анти-KLH IgG2a определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). В качестве негативного контроля использовали плазму крови контрольных самцов. В

лунки иммунологических планшет вносили по 50 мкл гемоцианина (KLH, Sigma) в концентрации 10 мг/мл фосфатного буфера, инкубировали 24 часа при +4°С и промывали фосфатным буфером с Твином-20 (0.01%). В каждую лунку планшета вносили по 100 мкл 1% блокирующего раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА) в фосфатном буфере, инкубировали 2 часа при комнатной температуре и промывали фосфатным буфером с Твином-20 (0.01%).

Уровень IgG1 и IgG2a определяли в образцах плазмы иммунизированных животных после предварительного титрования. Для титрования использовали образец пулированный от 10 иммунизированных самцов. По результатам титрования было определено оптимальное разведение 1 : 3200, которое было использовано в дальнейшем при определении уровня IgG1 и IgG2a. Каждый образец плазмы вносили в дублях по 100 мкл для определения IgG1 и также в дублях для определения IgG2a в лунки планшета, покрытые гемоцианином. Планшеты с образцами плазмы инкубировали 3 ч при +37°С и после инкубации промывали фосфатным буфером с Твином-20.

Вторичные биотинилированные антитела (BD Biosciences) IgG1 и IgG2a (разведение 1/26000, 1/7000 соответственно) вносили по 100 мкл и инкубировали 1 ч при +37°С. После инкубации планшеты были вновь промыты и в каждую лунку внесено по 50 мкл коньюгата (стрептавидин-пероксидаза 1 : 15000). После инкубации в течение 1 час при +37°С и последующей промывки в каждую лунку вносили по 100 мкл субстрата (тетраметилбензидин – Sigma), инкубировали в темноте при комнатной температуре 30 мин. Ферментативную реакцию останавливали 100 мкл стоп реагента. Оптическую плотность раствора в лунках измеряли на планшетном фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Оптическая плотность образцов варьировала от 0.025 до 2.700. Условные единицы (у.е.), которым соответствовали значения оптической плотности, а также их отношение для IgG2a и IgG1, были использованы при статистической обработке.

Беременность и развитие зародышей

На 16-е сут беременности самок декапитировали и определяли число желтых тел и общее число эмбрионов с учетом резорбировавших и живых зародышей. На основе разницы между числом овулировавших клеток и общим числом эмбрионов вычисляли процент доимплантационных потерь, а разницу общего числа зародышей и живых эмбрионов использовали для расчета постимплантационных потерь. Соответственно, общие потери вычисляли на основе разницы числа яйцеклеток и числа живых зародышей. Эмбрионов без видимых признаков нарушения развития извлекали, отделяли от плацент и взвешивали. Критерием фертильного покрытия считали наличие желтых тел в яичниках вскрытых самок.

Статистические методы анализа данных

Для нормально распределенных признаков влияние контролируемых факторов на изучаемые показатели оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и ковариационного анализа. Множественное сравнение средних значений признаков проводили на основе критерия наименьшей статистической разницы (least significant difference – LSD тест). Два средних значения нормально распределенных признаков сравнивали по *t*-критерию Стьюдента. Для ненормально распределенных признаков использовали критерий Краскала-Уоллиса. Сравнение частот проводили с помощью критерия χ^2.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика иммунного ответа на введение гемоцианина (KLH)

Специфические анти-KLH IgG2a и анти-KLH IgG1 детектировались в плазме крови самцов уже на 3-и сутки после введения гемоцианина (табл. 1). Содержание IgG1 достигало максимальных значений на 6-е сутки и далее практически не изменялось. Уровень IgG2a также имел тенденцию к увеличению на 6-е сутки, но далее снижался к 9-м суткам после введения препарата. На ранней стадии иммунного ответа (3-и сутки), судя по отношению IgG2a/IgG1, преобладали антитела, вырабатываемые при клеточном (Th1) иммунном ответе, а в более поздние сроки (6 и 9 сутки) возрастал вклад антител, продуцируемых при гуморальном (Th2) ответе.

Репродуктивная эффективность самцов

Как следует из кумулятивных кривых, отражающих долю фертильных спариваний от максимально возможного значения (рис. 1А), к концу совместного содержания антигенстимулированные самцы покрыли в 1.8 раза больше самок, чем контрольные. Эти различия были близки к статистически значимым – $\chi^2 = 3.61$, $p = 0.057$.

Накопление числа овулировавших яйцеклеток и числа живых эмбрионов, зарегистрированных у самок в ходе совместного содержания, показало, что в первые 2-е суток контрольные самцы превосходили антигенстимулированных по репродуктивной эффективности (рис. 1Б, В). Однако затем показатели репродуктивного выхода возрастали быстрее у самок, подсаженных к антигенстимулированным самцам (рис. 1Б, В). Поэтому к концу эксперимента суммарное число овулировавших яйцеклеток, общее число зародышей, включая резорбировавших, и число живых эмбрионов были существенно выше у самок, содержавшихся с антигенстимулированными самцами

Таблица 1. Содержание в плазме крови анти-KLH IgG1 и анти-KLH IgG2a, а также их соотношение в разные сроки после введения самцам мышей гемоцианина

Показатели	Время после введения KLH, сутки			
	3 ($n = 5$)	6 ($n = 6$)	9 ($n = 19$)	Достоверность различий*
IgG1, у.е.	0.14 ± 0.03	0.93 ± 0.31	0.87 ± 0.18	$H = 6.12$; $p = 0.047$
IgG2a, у.е.	0.26 ± 0.05	0.80 ± 0.27	0.41 ± 0.13	$H = 5.01$; $p = 0.082$
IgG2a/IgG1	2.06 ± 0.38	0.96 ± 0.12	0.59 ± 0.12	$H = 13.46$; $p = 0.001$

* – критерий Краскела-Уоллиса.

по сравнению с таковыми в группе самок, содержавшихся с контрольными самцами (рис. 1Б, В и табл. 2). Вместе с тем, у самок, покрытых антигенстимулированными самцами, был отмечен рост эмбриональных потерь, главным образом на доимплантационной стадии развития (табл. 2).

Межгрупповые различия по общему репродуктивному выходу были обусловлены, главным образом, большим, чем в контрольной группе, числом фертильных покрытий при подсадке самок к антигенстимулированными самцам. В свою очередь показатели плодовитости, рассчитанные на одну самку, были практически одинаковыми при покрытиях контрольными ($n = 10$) и антигенстимулированными ($n = 18$) самцами. Число овулировавших яйцеклеток составило 9.7 ± 0.65 в контрольной группе самок и 9.8 ± 0.86 ($t = 0.11$, $p = 0.92$) в группе самок, покрытых антигенстимулированными самцами, и соответственно общее число зародышей – 7.6 ± 1.68 и 6.7 ± 1.08 ($t = 0.49$, $p = 0.62$) и число живых эмбрионов – 7.4 ± 1.65 и 6.2 ± 1.02 ($t = 0.64$, $p = 0.53$).

Масса эмбрионов

Масса живых эмбрионов, вынашиваемых самками, покрытыми контрольными и антигенстимулированными самцами, варьировала от 429 до 763 мг. Масса потомков контрольных самцов существенно не изменялась в зависимости от времени покрытия (рис. 2). А масса эмбрионов, вынашиваемых самками, покрытыми антигенстимулированными самцами, была минимальной при спаривании в 1-е и 2-е сутки после подсадки и возрастала при более поздних сроках покрытия. Учитывая влияние фактора времени, сравнение массы тела потомков контрольных и антигенстимулированных самцов было выполнено с ковариатой по срокам покрытия, которые существенно влияли на массу эмбрионов ($F_{1,152} = 13.72$, $p < 0.001$). Антигенная стимуляция также вносила статистически значимый вклад в изменчивость массы потомков ($F_{1,152} = 4.97$, $p = 0.027$). При этом массы эмбрионов были выше у самок, покрытых антигенстимулированными

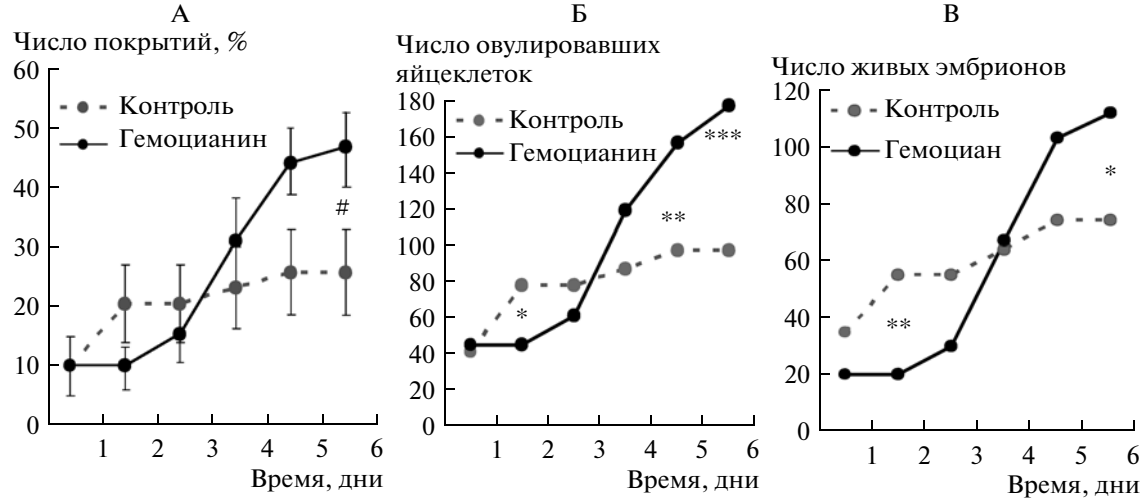

Рис. 1. Кумулятивные кривые доли покрытых самок (А) от максимально возможного ($n = 38$ в каждой группе), числа овулировавших яйцеклеток (Б) и числа живых эмбрионов (В), зарегистрированных в течение 6 суток совместного содержания интактных самок с контрольными и антигенстимулированными (гемоцианин) самцами.

Оценка статистической значимости для:

– доли покрытий (А) – # – $\chi^2 = 3.61$, $p = 0.057$;

– отличие числа овулировавших яйцеклеток от теоретически ожидаемого равного количества у самок, содержавшихся с контрольными и антигенстимулированными самцами (Б) – * – $\chi^2 = 4.24$, $p = 0.039$, ** – $\chi^2 = 6.74$, $p = 0.009$, *** – $\chi^2 = 11.93$, $p < 0.001$;

– отличие числа живых эмбрионов от теоретически ожидаемого равного количества у самок, содержавшихся с контрольными и антигенстимулированными самцами (В) – * – $\chi^2 = 3.92$, $p = 0.047$, ** – $\chi^2 = 8.18$, $p = 0.004$.

Таблица 2. Суммарные показатели плодовитости и эмбриональные потери у самок, подсаженных на 6 суток к контрольным и антигенстимулированным самцам

Группа самцов	Плодовитость*	Эмбриональные потери		
		Доимплантационные	Постимплантационные	Общие
Контроль	97/83/74	14.4 ± 3.6	10.8 ± 3.4	23.7 ± 4.3
Введение гемоцианина	177/128/112	27.7 ± 3.4 $\chi^2 = 6.21$; $p = 0.013$	10.9 ± 2.8 $\chi^2 = 0.13$; $p = 0.72$	36.7 ± 3.6 $\chi^2 = 4.87$; $p = 0.027$

Примечание: здесь и в таблице 3 показаны – число овулировавших яйцеклеток/общее число эмбрионов/число живых эмбрионов.

самцами, по сравнению с контролем (583.0 ± ± 7.4 мг и 620.3 ± 6.2 мг, $t = 3.81$, $p < 0.001$).

Репродукция антигенстимулированных самцов в зависимости от преобладания Th1 или Th2 иммунных ответов

У самцов, участвовавших в размножении, было отмечено бимодальное распределение логарифмированных значений IgG2a/IgG1 (рис. 3). Это послужило основанием для выделения 2-х групп, которых можно условно отнести к особям с преобладанием Th1 иммунного ответа – Log IgG2a/IgG1 > –0.4 – и особям с преобладанием Th2 иммунного ответа – Log IgG2a/IgG1 < –0.4. Общее число овулировавших яйцеклеток и живых эмбрионов, полученных от самцов с Th1 и Th2 типами иммунного реагирования, достоверно не отличалось от теоретически ожидаемого, рассчитанного с учетом разного числа животных в группах – $\chi^2 = 0.01$, $p = 0.91$ и $\chi^2 = 1.79$, $p = 1.18$, соответственно. При одинаковом репродуктивном выходе у самок, покрытых самцами с доминированием Th1 иммунного ответа, имели место большие доимплантационные и общие эмбриональные потери по сравнению с таковыми у самок, чьими партнерами были особи, характеризующиеся преобладанием Th2 ответа (табл. 3).

Масса эмбрионов при покрытии самцами с преобладанием клеточного (Th1) ответа (641.5 ± ± 9.4 мг) была достоверно выше, чем при покрытии самцами с преобладанием гуморального (Th2) иммунного ответа (607.2 ± 8.3 мг, $t = 2.66$, $p = 0.009$). Отчасти эти эффекты были обусловлены сроками покрытия, которые значимо влияли на темпы роста зародышей (рис. 2). При анализе влияния типа иммунного ответа на массу эмбрионов с ковариатой по времени покрытия было установлено статистически значимое влияние срока, в который произошло спаривание ($F_{1,89} = 5.32$, $p = 0.023$), и лишь тенденция к различию между потомками самцов, характеризующихся преобладанием Th1 или Th2 ответов ($F_{1,89} = 3.07$, $p = 0.083$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Итак, активация специфического иммунитета, которая требует существенного энергетического и субстратного обеспечения, в частности, для образования специфических антител (Руднев, Романюха, 2008), не только не подавляет репродуктивную эффективность самцов мышей, а скорее

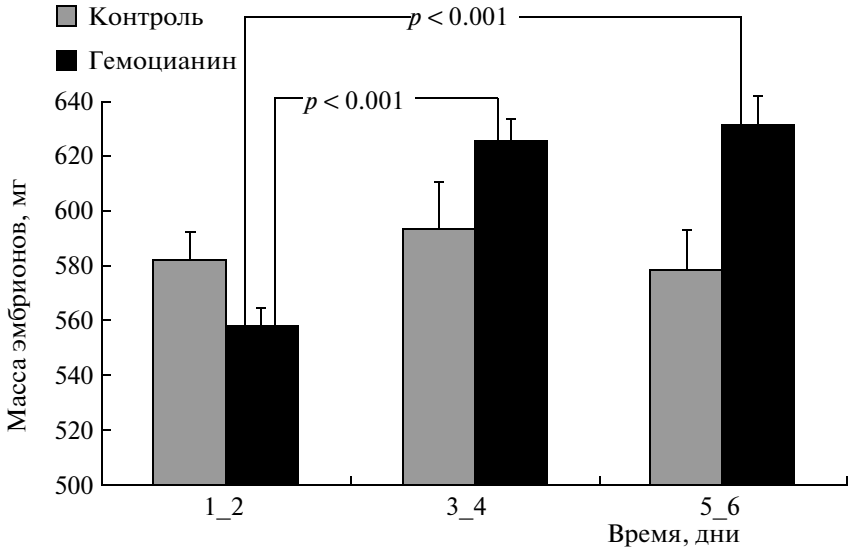

Рис. 2. Масса эмбрионов у самок, покрытых контрольными и антигенстимулированными (KLH) самцами, в разные сроки совместного содержания.

Статистическая значимость различий оценена по критерию LSD.

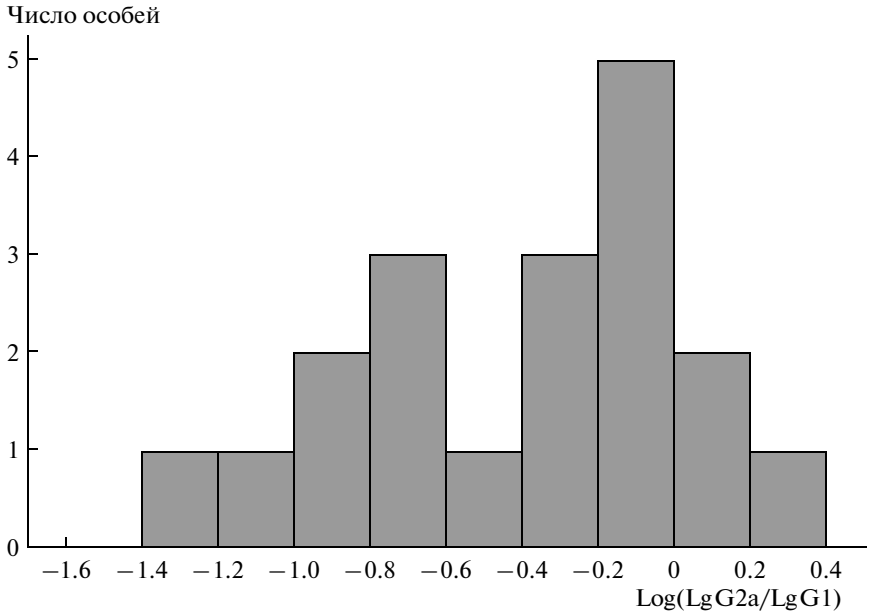

Рис. 3. Распределение логарифмированных значений IgG2/IgG1 у антигенстимулированных самцов, исследованных на 9-е сутки после введения гемоцианина.

наоборот, усиливает ее. Интактные самки, подсаженные к антигенстимулированным самцам в интервале от начала антителогенеза до достижения максимальных титров антител, производят больше жизнеспособных эмбрионов по сравнению с самками, подсаженными на такой же срок к контрольным самцам. В целом эти данные воспроизводят результаты, полученные при использовании в качестве антигенного стимула ЭБ (Мошкин и др., 2010). Отличие между двумя экспериментами заключается в путях повышения репродуктивного выхода. При введении самцам ЭБ было отмечено статистически значимое увеличение среднего (для самок) числа овулировавших яйцеклеток, а при введении гемоцианина увеличение числа фертильных покрытий. Кроме того, самки, покрытые самцами, которым вводили гемоцианин, вынашивали более крупных потомков по сравнению с контролем. В случае с введением ЭБ не было отмечено статистически значимого увеличения массы потомков антигенстимулированных самцов. Но масса эмбрионов достоверно коррелировала с силой гуморального иммунного ответа на ЭБ, оцененной по числу антителообразующих клеток (АОК).

Определение АОК дает лишь общую оценку гуморального иммунного ответа, который имеет альтернативные пути развития (Cunningham, Toellner, 2003). Наблюдаемое нами бимодальное распределение логарифмированных значений IgG2a/IgG1 у самцов, исследованных на 9-е сутки после введения гемоцианина, хорошо согласуется с этими представлениями. Как известно преобладание клеточного (Th1) или гуморального (Th2) ответов формируется благодаря взаимному подавлению пролиферации лимфоцитов, относящихся к Т-хелперам одного типа, цитокинами, секретируемыми Т-хелперами альтернативного типа (Roberts et al., 2003). Наши данные показывают, что основное позитивное влияние на темпы роста потомков антигенстимулированных самцов оказывало превалирование Th1 иммуного ответа.

Оба эксперимента, в которых для активации иммунной защиты использовали ЭБ (Мошкин и др., 2010) или гемоцианин, свидетельствуют о том, что повышение репродуктивного выхода при спаривании на фоне специфического иммунного ответа у особей мужского пола сочетается с увеличением доимплантационных и общих эмбриональных потерь. Судя по представленным здесь результатам, ключевую роль в доимплантацион-

Таблица 3. Суммарные показатели плодовитости и эмбриональные потери у самок, покрытых самцами с преобладанием Th1 или Th2 иммунных ответов

Группа самцов	Плодовитость	Эмбриональные потери		
		Доимплантационные	Постимплантационные	Общие
Преобладание Th1 ($n = 11$)	103/59/55	42.7 ± 4.9	6.8 ± 3.3	46.6 ± 6.5
Преобладание Th2 ($n = 8$)	74/61/57	17.6 ± 4.4	6.6 ± 3.2	23.0 ± 4.9
		$\chi^2 = 12.48$; $p = 0.004$	$\chi^2 = 0.00$; $p = 0.96$	$\chi^2 = 10.35$; $p = 0.009$

ной гибели играют иммунофизиологические процессы, характерные для доминирования Th1 иммунного ответа. Этот эффект может определяться складывающимся при Th1 ответе балансом про- и противовоспалительных цитокинов в семенной жидкости, которые влияют на успешное прохождение зародышами этапов развития, предшествующих имплантации (Johansson et al., 2004). Следует подчеркнуть, что, несмотря на более высокие эмбриональные потери, фактическая плодовитость самок, содержавшихся с антигенстимулированными самцами, существенно превосходит таковую в контроле, благодаря значительно большему числу овулировавших яйцеклеток.

Как следует из результатов, представленной работы, а также из полученных ранее данных (Gerlinskaya et al., 2000; Мошкин и др., 2009, 2010), общий эффект активации иммунной системы у одного из брачных партнеров направлен на увеличение фертильности. Однако конкретные пути достижения этого результата зависят от иммуногенного фактора и фазы иммунного ответа, во время которой происходит покрытие, а в случае с самками и от стадии беременности. Поскольку, активация иммунной системы может вносить вклад в повышение репродукции, то совпадение во времени репродуктивно значимых событий с благоприятным для воспроизводства иммунофизиологическим состоянием брачных партнеров существенно возрастает в среде с выраженным разнообразием паразитических видов, стимулирующих различные звенья иммунной системы.

Таким образом, экспериментально обоснованная возможность увеличения воспроизводства при активации иммунной системы позволяет, с одной стороны, объяснить вклад защитных реакций организма в повышение фертильности млекопитающих, населяющих территории с высоким видовым обилием паразитов, а, с другой, показывает новые пути управления размножением животных, разводимых под контролем человека.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№10-04-01066) и Программы междисциплинарных исследований СО РАН (№ 94).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Литвинова Е.А., Гармс А.И., Зайдман А.М. и др. Перераспределение иммунной защиты у самцов мышей при экспозиции запахом самок // ЖОБ. 2009. № 1. С. 46–55.

Мошкин М.П., Кондратюк Е.Ю., Литвинова Е.А. и др. Активация специфического иммунитета самцов как стимулятор фертильности самок. “Феномен дочерей Лота” // ЖОБ. 2010. № 5. С. 425–435.

Руднев С.Г., Романюха А.А. О принципах адаптации иммунной системы // Успехи современной биологии. 2008. 128. 3. 260–270.

Arakawa H., Arakawa K., Deak T. Acute illness induces the release of aversive odor cues from adult, but not prepubertal, male rats and suppresses social investigation by conspecifics // Acute illness induces the release of aversive odor cues from adult, but not prepubertal, male rats and suppresses social investigation by conspecifics. Behav Neurosci. 2009. V. 123 (5). P. 964–78.

Arakawa H., Arakawa K., Deak T. Sickness-related odor communication signals as determinants of social behavior in rat: a role for inflammatory processes // Horm. Behav. 2010. V. 57 (3). P. 330–341.

Arteaga-Silva M., Vargas-Villavicencio J.A., Vigueras-Villaseñor R.M. et al. Taenia crassiceps infection disrupts estrous cycle and reproductive behavior in BALB/c female mice // Acta Trop. 2009. V. 109 (2). P. 141–145.

Benfield D.A., Nelson E., Collins J.E. et al. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332) // J. Vet. Diagn. Invest. 1992. V. 4 (2). P. 127–133.

Billington W.D. Influence of immunological dissimilarity of mother and foetus on size of placenta in mice // Nature. 1964. V. 202. P. 317–318.

Clarke A.G. The effects of maternal pre-immunization on pregnancy in the mouse // J. Reprod. Fertil. 1971. V. 24 (3). P. 369–375.

Cunningham A.F., Toellner K.M. Rapid development of Th2 activity during T cell priming // Clin. Dev. Immunol. 2003. V. 10 (1). P. 1–6.

Deter J., Chaval Y., Galan M., Berthier K., Salvador A.R., Casanova Garcia J.C., Morand S., Cosson J.F., Charbonnel N. Linking demography and host dispersal to Trichuris arvicolae distribution in a cyclic vole species // Int. J. Parasitol. 2007. V. 37 (7). P. 813–824.

Faivre B., Gregoire A., Preault M. et al. Immune activation rapidly mirrored in a secondary sexual trait // Science. 2003. V. 300. P. 103.

Feore S.M., Bennett M., Chantrey J. et al. The effect of cowpox virus infection on fecundity in bank voles and wood mice // Proc. Biol. Sci. 1997. V. 22 (264). P. 1457–1461.

Fichorova R.N. Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome // J. Reprod. Immunol. 2009. V. 83 (1–2). P. 185–9.

Fietta P., Delsante G. Focus on human natural killer cells // Riv. Biol. 2009. V. 102 (2). P. 219–235.

Fitzgerald N.A., Shellam G.R. Host genetic influences on fetal susceptibility to murine cytomegalovirus after maternal or fetal infection // J. Infect. Dis. 1991. V. 163 (2). P. 276–281.

Garamszegi L.Z., Török J., Michl G. et al. Female survival, lifetime reproductive success and mating status in a passerine bird // Oecologia. 2004. V. 138. № 1. P. 48–56.

Garraud O., Perraut R., Riveau G., Nutman T.B. Class and subclass selection in parasite-specific antibody responses // Trends. Parasitol. 2003. V. 19 (7). P. 300–304.

Gerlinskaya L.A., Moshkin M.P., Evsikov V.I. Allogenic stimulation in early pregnancy improves pre- and postnatal ontogenesis in BALB.cLac mice // J. Reprod. and Develop. 2000. V. 46 (6) P. 387–396.

Goldbard S.B., Verbanac K.M., Warner C.M. Role of the H-2 complex in preimplantation mouse embryo development // Biol. Reprod. 1982. V. 26. №. 4. P. 591–596.

Guégan J.F., Thomas F., Hochberg M.E. et al. Disease diversity and human fertility // Evolution. 2001. V. 55 (7). P. 1308–1314.

Hetherington C.M., Humber D.P. The effects of active immunization of the decidual cell reaction and ectopic blastocyst development in mice // J. Reprod. Fertil. 1975. V. 43 (2). P. 333–336.

Hetherington C.M. Absence of effect of maternal immunization to paternal antigens on placental weight, fetal weight and litter size in the mouse // J. Reprod. Fertil. 1978. V. 53 (1). P. 81–84.

Ho H.N., Yang Y.S., Hsieh R.P., Lin H.R., Chen S.U., Chen H.F., Huang S.C., Lee T.Y., Gill T.J. Sharing of human leukocyte antigens in couples with unexplained infertility affects the success of *in vitro* fertilization and tubal embryo transfer // Am. J. Obstet. Gynecol. 1994. V. 170. P. 63–71.

James D.A. Effects of antigenic dissimilarity between mother and foetus on placental size in mice // Nature. 1965. V. 202. P. 613–614.

Johansson M., Bromfield J.J., Jasper M.J., Robertson S.A. Semen activates the female immune response during early pregnancy in mice // Immunology. 2004. V. 112. (2). P. 290–300.

Kavaliers M., Colwell D.D. Discrimination by female mice between the odours of parasitized and non-parasitized males // Proc. Biol. Sci. 1995. V. 22 (261). P. 31–35.

Larson S.J., Dunn A.J. Behavioral effects of cytokines // Brain. Behav. Immun. 2001. V. 15. (4). P. 371–387.

Litvinova E.A., Kudaeva O.T., Mershieva L.V. et al. High level of circulating testosterone abolishes decline of scent attractiveness in antigen-treated male mice // Anim. Behav. 2005. V. 69. № 3. P. 511–517.

Moshkin M., Gerlinskaya L., Morozova O. et al. Behavior, chemosignals and endocrine functions in male mice infected with tick-borne encephalitis virus // Psychoneuroendocrinology. 2002. V. 27. P. 603–608.

Moshkin M.P., Gerlinskaya L.A., Evsikov V.I. The role of the immune system in behavioral strategies of reproduction // J. Reprod. and Develop. 2000. V. 46 (6). P. 341–365.

Nour N.M. Schistosomiasis: health effects on women // Rev. Obstet. Gynecol. 2010. V. 3 (1). P. 28–32.

Roberts A.I., Devadas S., Zhang X. et al. The role of activation-induced cell death in the differentiation of T-helper-cell subsets // Immunol. Res. 2003. V. 28 (3). P. 285–293.

Sarkar C., Basu B., Chakroborty D., Dasgupta P.S., Basu S. The immunoregulatory role of dopamine: an update // Brain. Behav. Immun. 2010. V. 24(4). P. 525–528. Epub. 2009. Nov. 5.

Thomas F., Teriokhin A.T., Budilova E.V. et al. Human birthweight evolution across contrasting environments // J. Evol. Biol. 2004. V. 17 (3). P. 542–53.

Velando A., Drummond H., Torres R. Senescent birds redouble reproductive effort when ill: confirmation of the terminal investment hypothesis // Proc. Biol. Sci. 2006. V. 273. P. 1443–1448.

Warner C.M., Gollnick S.O. Expression of H-2K major histocompatibility antigens on preimplantation mouse embryos // Biol. Reprod. 1993. V. 48 (5). P. 1082–1087.

Weiss G., Goldsmith L.T., Taylor R.N. et al. Inflammation in reproductive disorders // Reprod. Sci. 2009. V. 16 (2). P. 216–229.

Willis C., Poulin R. Preference of female rats for the odours of non-parasitised males: the smell of good genes // Folia Parasitologia. 2000. V. 47. P. 6–10.

Zala S.M., Potts W.K., Penn D.J. Scent-marking displays provide honest signals of health and infection // Behavioral Ecology. 2004. V. 15. №. 2. P. 338–344.

Zuk M., McKean K.A. Sex differences in parasite infections: Patterns and processes // Int. J. Parasitology. 1996. V. 26 (10). P. 1009–1023.

Reproductive Success of Males of the ICR Outbred Line during Propagation against the Background of Antigenic Stimulation

L. A. Gerlinskaya[a], S. O. Maslennikova, E. L. Zav'yalov, G. V. Kontsevaya, and M. P. Moshkin

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, pr. Akademika Lavrent'eva 10, Novosibirsk, 630090

[a] *Institute of Systematics and Ecology of Animals, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Frunze 11, Novosibirsk, 630091*

Tomsk State University, pr. Lenina 36, Tomsk, 634050

e-mail: lgerlinskaya@gmail.com

Abstract—Diversity of viruses, bacteria, microscopic fungi, and endo- and ectoparasites is an inevitable environmental factor that influences the host reproduction and that is determined not only by negative effects of infectious diseases but also by activation of protective mechanisms, which provide a confrontation to the pressure of parasites. In the present work, hemocyanin was injected into males of the ICR outbred line in order to study reproductive consequences of antigenic stimulation of males. Intact females were added to control and antigen-stimulated males at the initial stage of antibody formation. During 6 days of combined keeping, a significantly greater amount of ovulated egg cells and living embryos were registered in the females added to males that were injected with hemocyanin compared with that theoretically expected for equal reproductive yield. Females covered by antigen-stimulated males bred larger embryos compared with those in the control. Indices of female fertility depended on prevalence of cellular (Th1) or humoral (Th2) immune responses in antigen-stimulated males. Shift of Th1/Th2 balance resulted in higher preimplantation embryonic losses in females covered by males with a prevalence of cellular immune response; however, they bred larger embryos. Thus, it was established that activation of the immune system in males does not influence their reproductive abilities. This allows us, on the one hand, to explain the contribution of protective reactions of the organism in the increase in fertility of the mammals that inhabit territories with high specific abundance of parasites; on the other hand, it demonstrates new ways of the management of the reproduction of animals bred under human control.

Keywords: hemocyanin, male antigenic stimulation, pregnancy, embryonic losses, weight of embryos, immune response, Th1, Th2, IgG1, IgG2a