

УДК 57.023

ИММУНОКОМПЕТЕНТНОСТЬ И РЕПРОДУКТИВНЫЕ КАЧЕСТВА САМЦОВ ХОМЯЧКА КЭМПБЕЛЛА, СЕЛЕКЦИОНИРОВАННЫХ НА НИЗКИЙ И ВЫСОКИЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ЭРИТРОЦИТЫ БАРАНА (SRBC). К ПРОВЕРКЕ ГИПОТЕЗЫ “ИММУННОГО ГАНДИКАПА”

© 2014 г. К. А. Роговин¹, А. М. Хрущова¹, О. Н. Шекарова¹, А. В. Бушуев²,
О. В. Соколова³, Н. Ю. Васильева¹

¹ Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН
119071 Москва, Ленинский просп., 33
e-mail: krogovin@yandex.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра зоологии позвоночных
119991 Москва, Ленинские горы
e-mail: bushuev@mail.bio.msu.ru

³ ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко РАСХН
109428 Москва, Рязанский просп., 24, 1
ФГБУ Гематологический научный центр Минздрав РФ
125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4
e-mail: ovsokolova@mail.ru

Поступила в редакцию 10.10.2013 г.

В двух выборках самцов хомячка Кэмпбелла (*Phodopus campbelli* Thomas, 1905), сформированных по результатам отбора в трех поколениях на высокий и низкий гуморальный иммунный ответ на введение эритроцитов барана (SRBC), исследовали характеристики врожденного (неспецифического) и приобретенного Т-клеточного иммунитета, энергообмен, гормональный и репродуктивный статус, морфологические признаки, характеризующие скорость созревания и агрессивное поведение. Группы самцов с низким (НИО) и высоким (ВИО) иммунным ответом на SRBC не различались статистически по интенсивности кожной реакции гиперчувствительности замедленного типа на фитогемагглютинин (тест на Т-клеточный иммунитет), по активности системы “Пероксидаза – эндогенная перекись водорода нейтрофилов” (характеристика состояния врожденного иммунитета), по обилию и соотношению форменных элементов белой крови, по уровню энергообмена в состоянии покоя, по массе тела, аногенитальному расстоянию в возрасте двух месяцев, по уровню тестостерона в крови до иммунизации и на пике вторичного иммунного ответа на SRBC, а также по уровню кортизола в крови в ответ на социальный конфликт (ссаживание). Самцы НИО имели значимо более высокий фоновый уровень кортизола в крови и были менее агрессивными (реакция на чужака). Срединная брюшная железа в возрасте двух месяцев у них была менее развита. После объединения НИО и ВИО самцов в пары с интактными самками мы не наблюдали различий в сроках рождения первого выводка, однако самки в парах с самцами НИО имели меньшее число детенышей в выводке. Результаты сравнения говорят не в пользу гипотезы “Иммунного гандикапа”, которая предполагает существование трейдоффа между иммунокомпетентностью и репродуктивным усилием.

Неизменно популярным направлением исследований в области эволюционной экологии остается изучение трейдоффа (trade-off) между репродукцией и выживанием. Несмотря на многочисленные работы, физиологические и пове-

денческие механизмы этого фундаментального трейдоффа, обеспечивающего индивидуальную приспособленность, остаются не вполне понятными (Mills et al., 2009a). Даже сам факт существования конкурентной зависимости между затра-

тами на репродукцию и иммунокомпетентностью особи, т.е. ее способностью противостоять паразитарным и микробным инвазиям, зачастую не подтверждается, а результаты исследований противоречат друг другу (Лохмиллер, Мошкин, 1999; Norris, Evans, 2000; Roberts et al., 2004; Viney et al., 2005). Причина противоречивых результатов объясняется сложностью и недостаточной изученностью механизмов взаимодействия разных систем иммунитета – врожденного (неспецифического), приобретенного (специфического, адаптационного); последний в свою очередь подразделяется на клеточный (Т-клеточный) и гуморальный (антитела, вырабатываемые В-клетками). Этим же может быть объяснена нечеткость формулировок гипотез, объясняющих связи между репродуктивным усилием и иммунокомпетентностью, и соответственно возникающие трудности их тестирования (Лохмиллер, Мошкин, 1999).

Наибольшее число споров вызывает гипотеза “Иммунного гандикапа” (ГИГ) Фольстада и Картера (Folstad, Karter, 1992). Гипотеза была сформулирована в рамках идеологии “принципа гандикапа” Захави (Zahavi, 1975), объясняющего эволюцию брачных репертуаров и вторичных половых признаков через активный выбор самками самцов по признакам (“честным” сигналам), свидетельствующим об их лучшей приспособленности. ГИГ развивает ранее высказанную Гамильтоном и Зук (Hamilton, Zuk, 1982) гипотезу, согласно которой только обладающие “хорошими генами” самцы способны демонстрировать высокий уровень экспрессии вторичных половых признаков, не снижая приспособленности под воздействием паразитов и патогенных микроорганизмов. Основные положения ГИГ сводятся к следующему. 1. Тестостерон ответственен за экспрессию вторичных половых признаков. 2. Платой за экспрессию служит подавление иммунитета (снижение иммунокомпетентности). 3. Иммуносупрессия имеет результатом большую уязвимость организма для патогенных микроорганизмов и паразитов. 4. Только высококачественные самцы с врожденной способностью противостоять микробным и паразитарным инвазиям имеют возможность частично жертвовать своей иммунокомпетентностью, демонстрируя половую привлекательность самкам. 5. Предполагается, что каждый самец имеет оптимальный уровень тестостерона, при котором достигается максимальная экспрессия вторичных половых признаков (демонстраций) при минимальном подавлении иммунокомпетентности. При этом не говорится, о какой системе иммунитета идет речь, хотя можно полагать, что это должен быть специфический (адаптационный) иммунитет, требующий на поддержание больших затрат энер-

гии. Работы, в которых исследуется или обсуждается ГИГ, остаются в ряду наиболее цитируемых, а обилие публикаций позволяет проводить их системный анализ.

Так, количественный анализ опубликованных исследований (мета-анализ) эффекта паразитов на половые сигналы показал, что заражение паразитами в эксперименте подавляет экспрессию связанных с полом признаков (Møller et al., 1999). Поскольку экспрессия половых признаков, как правило, регулируется тестостероном, заражение паразитами может через активацию адаптационного иммунитета косвенно негативно влиять на уровень этого гормона (Hillgarth, Wingfield, 1997; Verhulst et al., 1999).

С другой стороны, специально проведенный мета-анализ проверок ГИГ, в которых в эксперименте манипулировали уровнем тестостерона, продемонстрировал результат, в целом не подтверждающий предположение об отрицательном влиянии тестостерона на систему приобретенного иммунитета (Roberts et al., 2004). Напротив, проведенный мета-анализ опубликованных результатов исследований по экспериментальной индукции специфического иммунного ответа свидетельствует о хорошо выраженном негативном влиянии активированной антигенами иммунной функции на уровень тестостерона ($r = -0.52$), причем вне зависимости от того, были использованы живые патогены или непатогенные антигены (Voopkamp et al., 2008). Последнее свидетельствует о том, что трейдофф между специфической иммунокомпетентностью и зависящей от тестостерона экспрессией вторичных половых признаков (демонстраций) может быть следствием активации собственно иммунных функций.

Проверки ГИГ в основном касались системы приобретенного (специфического, адаптационного) иммунитета. Исследования влияния репродуктивных затрат на состояние врожденного (неспецифического) иммунитета до недавнего времени уделялось мало внимания (Coster et al., 2010). Показано, например, что у серого юнко (*Junco hyemalis*) уровень тестостерона, измеренный несколько раз в течение сезона в свободноживущей популяции птиц, отрицательно коррелировал с общим иммуноглобулином G (IgG) и концентрацией белков комплемента плазмы крови (Greives et al., 2006). Вместе с тем показано, что тестостерон способен усилить воспаление и активировать макрофаги (Brown et al., 2007). В последнее время тема связи затрат на репродукцию и врожденный иммунитет обсуждается в контексте проблемы влияния на иммунокомпетентность

оксидативного стресса и роли естественных антиоксидантов в его регуляции (Schantz et al., 1999; Kurtz et al., 2007; Garratt, Brooks, 2012).

В основу ГИГ были положены чисто эмпирические факты существования отрицательной связи между уровнем тестостерона (андрогенов) и специфической иммунокомпетентностью особи. Однако, поскольку эта связь может маскироваться множеством других факторов, наиболее эффективным подходом для тестирования ГИГ считается эксперимент (Roberts et al., 2004).

Помимо экспериментов с прижизненным изменением уровня андрогенов или экспериментов по активации иммунных функций, способом тестирования ГИГ может служить искусственная селекция. Ее задача – создание групп особей с наследственно обусловленными контрастными иммунными или гормональными показателями (Sheldon, Verhulst, 1996; Verhulst et al., 1999; Conner, 2003; Fuller et al., 2005; Mills, 2009a,b). Исследований в этом направлении немного. Классическим примером остается исследование линий высоко- и низкоиммунных домашних кур (*Gallus gallus*), петухи которых, как оказалось, отличались высотой гребней и уровнем тестостерона; размер гребня и концентрация тестостерона в крови были большими у низкоиммунных (В-клеточный иммунитет) петухов (Verhulst et al., 1999). В другом исследовании у домашних кур, отбиравшихся на высокую иммунореактивность к эритроцитам барана, во взрослом возрасте размеры тела были меньшими по сравнению с линией с низкой иммунореактивностью (Parmentier et al., 1996). В то же время у индеек (*Meleagris gallopavo*), селекционированных по признаку максимальной массы тела во взрослом возрасте, наблюдалась пониженная Т-клеточная иммунореактивность, пониженная плотность лимфоцитов в периферической крови, меньшие размеры селезенки по сравнению с индейками, отбиравшимися на меньшие размеры во взрослом возрасте (Ваууаги et al., 1997). Исследование с отбором на низкую- и высокую приобретенную иммунокомпетентность было недавно выполнено на рыжих полевках (Mills et al., 2009a). Авторы продемонстрировали наследуемость иммунного ответа на антигены уже в первом поколении потомков. На отобранных по признаку “низкая/высокая иммунореактивность” полевках была продемонстрирована отрицательная связь способности к антителообразованию с уязвимостью зверьков для эктопаразитов и с уровнем тестостерона в крови.

В предлагаемом вниманию читателей исследовании проведена селекция хомячков Кэмпбелла

на низкий и высокий иммунный ответ на введение мультифакториального антигена – эритроцитов барана (индукция приобретенного гуморального иммунного ответа) с последующим сравнением низко- и высокореактивных самцов по признакам, характеризующим врожденный (неспецифический) и приобретенный Т-клеточный иммунитет, энергообмен, гормональный и репродуктивный статус и поведение. Были поставлены следующие вопросы. 1. Влияет ли различие в иммунореактивности самцов хомячков на энергообмен, уровень тестостерона, экспрессию связанных с полом признаков, репродуктивный успех? 2. В каких отношениях находятся с результатом селекции на низкий и высокий иммунный ответ на SRBC показатели состояния систем приобретенного клеточного иммунитета и врожденного неспецифического иммунитета?

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Условия содержания. Животные принадлежали к популяции лабораторного разведения в ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН, ведущей происхождения от основателей, вывезенных в 1980-е годы из Монголии. Всех хомячков содержали в помещении с неизменным режимом освещения при длинном дне (14 ч). Корм (комбикорм для крыс и мышей, овес, овощи, в качестве добавок семена подсолнечника, творог) и вода *ad libitum*. Подстилкой служила мелкая стружка, в качестве гнездового материала использовали техническую вату. Молодых зверьков в возрасте одного месяца отделяли от родителей и подращивали выводками, самцов отдельно от самок до момента первичной иммунизации SRBC. Отобранных для тестирования самцов с низким и высоким гуморальным иммунным ответом содержали порознь в пластмассовых ведрах (20 × 20 × 35 см) при тех же условиях.

Селекция хомячков по признаку “низкая–высокая иммунореактивность на эритроциты барана. Иммунизацию хомячков 2%-ной суспензией SRBC в физиологическом растворе внутрибрюшинно проводили в возрасте от полутора до двух месяцев. Для определения титра специфических антител использовали сыворотку крови хомячков из подъязычной вены, полученную через 7 сут после иммунизации зверьков на пике иммунного ответа (между 5-ми и 10-ми сутками). Уровень антител в сыворотке крови иммунизированных эритроцитами хомячков определяли по реакции гемагглютинации (Wegmann, Smithies, 1966; Ройт и др., 2000), в лунках 96-луночного иммунологического планшета путем титрования

образцов сыворотки крови в лунках и добавления к пробам сыворотки в кратных разведениях 0.5% суспензии бараньих эритроцитов в физиологическом растворе (Керимов и др., 2012). Титр антител (ТАТ) в сыворотке крови оценивали визуально по номеру последней лунки планшета, в которой при последовательных кратных разведениях содержалось еще достаточное для гемагглютинации количество антител; номер лунки характеризовал интенсивность иммунного ответа (Ots et al., 2001).

Первоначально в возрасте от полутора до двух месяцев иммунизации подверглись 96 самцов и 113 самок, из которых было сформировано 20 пар низкорективных (ТАТ: 0–4) и 20 пар высокорективных (ТАТ: 7–11) хомячков. В поколении F1 иммунизацию прошли 105 самцов и 75 самок в том же возрасте. Из их числа были сформированы 20 низкорективных пар и 24 высокорективных пары. Из 52 выводков поколения F2 иммунизацию прошли 118 самцов и 120 самок по достижении 2-месячного возраста. Из их числа отобрано 24 молодых самца с низким (ТАТ: 0–4) и 24 – с высоким (ТАТ: 7–11) иммунным ответом на SRBC. Эти самцы составили первоначальные выборки для сравнения физиологических характеристик (адаптационного клеточного иммунитета, врожденного неспецифического иммунитета, энергообмена в состоянии покоя, уровня тестостерона и кортизола в крови), морфофизиологических характеристик (масса тела, внешние размеры связанных с полом органов в возрасте двух месяцев), агрессивного поведения и репродуктивных качеств, оцененных по успешности покрытия самок. Дальнейшая селекционная работа была прекращена, поскольку в поколении F2 в низкорективных парах стали наблюдаться признаки репродуктивной депрессии. Мониторинг размножения в 15 парах высокорективных и 16 парах низкорективных хомячков F2 показал статистически значимые отличия как по сумме рожденных детенышей в течение 100 дней после объединения в пару (Mann-Whitney U : $Z = 2.77$, $p = 0.005$, $n_1 = 15$, $n_2 = 16$), так и по числу выводков за этот период (Mann-Whitney U : $Z = 2.73$, $p = 0.006$, $n_1 = 15$, $n_2 = 16$).

Репродуктивные пары хомячков подвергали повторной иммунизации эритроцитами спустя полгода после первой иммунизации (после рождения нескольких выводков). Изменение иммунного статуса могло быть связано со средовым влиянием или вызвано ошибкой первичного определения. У хомячков, демонстрировавших при первой иммунизации низкие ТАТ, относительно больший вклад, по сравнению с демонстрировавшими высокие ТАТ, вносила, по-видимому, ненаследствен-

ная компонента изменчивости; при повторной иммунизации у них чаще наблюдалось изменение интенсивности гуморального иммунного ответа на антиген с низкой на высокую. В связи с этим в эксперименте оставляли только тех потомков, родители которых сохраняли свой статус после повторной иммунизации. Технически это означало исключение из рассмотрения родительских пар (и соответственно их потомков) с изменившимся после повторной иммунизации SRBC статусом.

Порядок тестирования самцов F2 с низким и высоким иммунным ответом на SRBC. В возрасте двух месяцев самцов фотографировали цифровой зеркальной фотокамерой Konica-Minolta DINAX 5D в фиксированном положении вверх брюшной стороной на фоне линейки. Аногени- тальное расстояние (между мочеполовым и анальным отверстиями) и размер срединной брюшной железы измеряли по цифровым снимкам на экране компьютера (Шекарова и др., 2010). Зверьков взвешивали в возрасте двух и трех месяцев, после измерения уровня метаболизма в покое и всякий раз сразу после взятия пробы крови.

Тестирование самцов начинали с измерения метаболизма покоя в возрасте 2.5–3 мес. Через неделю после этого у спокойных зверьков брали пробу крови и измеряли уровень тестостерона и кортизола в отделенной от гематокрита сыворотке, еще через неделю зверьков ссаживали на нейтральной арене в течение 10 мин попарно и брали пробу крови сразу после эксперимента для оценки уровня кортизола в ответ на действие социального стрессора. После недельного перерыва хомячков иммунизировали эритроцитами барана и брали пробу крови на пике индуцированного иммунного ответа через 7 сут после иммунизации. Оценивали титр антител в крови как показатель состояния системы приобретенного гуморального иммунитета. Через две недели после повторной иммунизации эритроцитами и через неделю после взятия крови для оценки интенсивности гуморального иммунного ответа оценивали силу реакции гиперчувствительности замедленного типа в ответ на внутрикожное введение митогена растительного происхождения – фитогемагглютинина (РНА-Р) – тест на состояние системы приобретенного клеточного иммунитета. У самцов в возрасте 4.5–5 мес оценивали агрессивность, подсаживая в их индивидуальные клетки самцов-чужаков. В возрасте 5–5.5 мес самцов соединяли с 2-месячными, не имевшими сексуального опыта самками, для оценки успешности покрытия.

Окончательное разделение на классы (низкая и высокая иммунореактивность) проведено по

средним значениям титра антител в сыворотке крови по первичному и вторичному ответам на SRBC.

Т-клеточная иммунореактивность. Клеточный иммунный ответ у низко- и высокоиммунореактивных к SRBC самцов оценивали через 24 ч после введения внутривожно (пяточная мозоль задней лапы у хомячков) порции фитогемагглютинаина (Phytohemagglutinin РНА-Р, L8754-25mg, Sigma-Aldrich Co.) по величине припухлости лапки. РНА-Р при внутривожном введении вызывает привлечение и быструю пролиферацию в очаге воспаления Т-лимфоцитов. Этот тест широко применяется в эколого-иммунологических исследованиях, и его правомочность для характеристики адаптационного иммунитета подтверждена в специальном исследовании (Tella et al., 2008). 50 мкл РНА-Р, растворенного в фосфатно-солевом буфере (PBS, E404-200TABS, 100 ml, Sigma-Aldrich Co.) в концентрации 2.5 мг на 1 мл PBS (Sinclair, Lochmiller, 2000), вводили внутривожно в пяточную мозоль правой задней лапы хомячка инсулиновым шприцем. В пяточную мозоль левой задней лапы внутривожно вводили эквивалентное количество PBS. Измеряли толщину лапки до и после инъекции мягким цифровым штангенциркулем. Разницу в реакциях левой и правой лапок оценивали по разности толщины лапки до и через 24 ч после укола. Поскольку отличие в реакции контрольной (левая) и экспериментальной (правая) лапок было высоко значимым статистически (*t*-тест для сопряженных пар, $p < 0.001$), при анализе результатов мы остановились на использовании только разницы значений толщины лапки (до и после инъекции), в которую вводили РНА-Р.

Неспецифический, врожденный иммунитет. Для характеристики состояния неспецифического, врожденного иммунитета у самцов хомячка Кэмпбелла с низкой и высокой иммунореактивностью на SRBC в возрасте 3–3.5 мес использована цитохимическая методика, выявляющая активность системы “пероксидаза-эндогенный пероксид водорода в нейтрофилах на мазках периферической крови” (Роговин, Бут, 1989). Степень активации системы определяется плотностью окрашенных 3,3'-диаминобензидинтетрагидрохлоридом (ДАБ) гранул. Эта реакция непосредственно характеризует биохимический потенциал фагоцитарной активности нейтрофилов (Бут и др., 2002, 2003; Муравьев и др., 2002). Мазки крови высушивали в течение двух часов, фиксировали в этанол-формалине (9:1) в течение часа. После тщательной отмывки дистиллированной и бидистиллированной водой и высушивания инкубировали при 37°C

в течение 1 ч 15 мин в среде, содержащей ДАБ (0.8 мг/мл), растворенный в 0.2 М трисбуфере (рН 7.6). После инкубации и промывания бидистиллированной водой мазки высушивали в течение суток при 24°C и окрашивали 1%-ным раствором метиленового зеленого (в течение 30 с, не промывая). Цитохимический индекс оценивали на выборке из 100 нейтрофилов, разделив их на три группы: 1) единичные гранулы, 2) много не слившихся гранул; 3) плотные скопления гранул. $ЦХИ = N_1 \times 1 + N_2 \times 2 + N_3 \times 3$, где N_1 , N_2 и N_3 – число нейтрофилов каждой из групп в мазке.

Параллельно у тестируемых самцов хомячков исследовали профили форменных элементов крови по мазкам, окрашенным по Май–Грюнвальду с докрасиванием азур-эозиновой смесью. Свежие мазки крови высушивали на открытом воздухе без фиксации в спирте, после чего окрашивали. По мазкам впоследствии подсчитывали число нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, моноцитов и лимфоцитов в выборке из 100 клеток белой крови в каждом из мазков. Оценивали соотношение гранулоциты/лимфоциты (nG/nL), основанное на подсчете клеток каждого типа в выборке из 100 лейкоцитов, и соотношение лейкоциты/эритроциты, основанное на подсчете числа лейкоцитов, приходящихся на 10^4 эритроцитов ($nWBC \cdot 10^{-4} nEr$). Микроскопию проводили с использованием иммерсии при увеличении 10×100 .

Метаболизм в состоянии покоя (RMR). У самцов хомячков из двух групп измеряли близкий к основному обмену (BMR) показатель – уровень метаболизма в состоянии покоя (resting metabolic rate, RMR) (Downs, Brown, 2012). RMR оценивали по потреблению кислорода, используя закрытые модифицированные системы Калабухова (Górecki, 1975; Бушуев и др., 2010; Bushuev et al., 2012). Хомячка помещали в маленьком садке в эксикатор, находящийся в термостате. Объем потребляемого кислорода фиксировали через каждые 10 мин в течение часа. В период измерений отмечали время, температуру в камерах и лаборатории (с точностью до 0.1°C) и атмосферное давление (до 0.5 мм рт. ст.). Полученные за час значения объемов потребленного кислорода приводили к нормальным условиям (STP: температура $T = 273^\circ\text{K}$, давление $P = 101325$ Па) и переводили в энергетические единицы, используя соотношение 1 л $\text{O}_2 \approx 20.1$ кДж (Schmidt-Nielsen, 1997). Температуру в термостатах устанавливали на 25°C. Температура в эксикаторах составляла 26–27°C, что находится в пределах термонейтральной зоны (TNZ) этого вида (Chen et al., 2006).

Уровень гормонов в крови. Кровь, 150–200 мкл на зверька, брали утром, прокалывая подязычную вену иглой от 2-миллилитрового одно-разового шприца. На всю процедуру взятия крови затрачивали не более двух минут, что в 2.5 раза меньше времени глюкокортикоидного сигнала в крови крысы в ответ на взятие в руки (Brown, Martin, 1974). Сыворотку отделяли центрифугированием в микропробирках Eppendorf (1.5 ml) при 3000 оборотов/мин, замораживали и хранили при -18°C до проведения анализов.

Для оценки концентрации тестостерона и кортизола в сыворотке крови хомячков нами использован твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Использовали готовые тест-системы “ИФА-кортизол” и “ИФА-ТС (тестостерон)” (ЗАО “НПО Иммунотех”, Москва, Россия). Перекрестная реакция кортизола с тестостероном для указанных наборов составляла 0.08%. Оптическую плотность измеряли планшетным спектрофотометром “Униплан” (Россия) на длине волны 450 нм.

Агрессивность. Уровень агрессивности самцов оценивали по результатам эксперимента с однократным подсаживанием молодых 2-месячных самцов в клетки тестируемых самцов в возрасте четырех месяцев. Показателем служила сумма 5-секундных интервалов, во время которых наблюдали акты агрессии со стороны хозяина клетки в течение первых двух минут после подсаживания чужака. Во всех случаях в этом временном интервале доминировал хозяин клетки. Повторное использование подсаживаемых молодых самцов ($n = 16$) допускалось через три дня.

Успешность покрытия самок. Репродуктивные качества самцов с низким и высоким иммунным ответом на SRBC оценивали по успешности размножения пар, образованных молодыми одновозрастными интактными самками (с неизвестным иммунным статусом) и прошедшими тестирование самцами. Регистрировали число дней, прошедших со дня объединения в пару до дня рождения первого выводка, а также размер выводка.

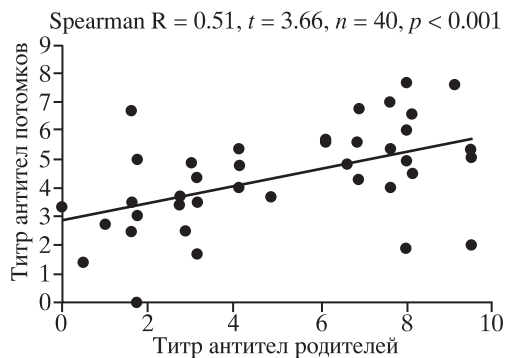
Статистические методы анализа. Соответствие распределений нормальному проверяли с помощью теста Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk *W*-test). Данные по концентрации гормонов были подвергнуты Log_{10} трансформации. Для сравнений независимых выборок, удовлетворявших требованиям параметрической статистики, использовали *t*-критерий Стьюдента (Student’ *t*-test for Independent Samples), в остальных случаях – непараметрический критерий Манна-Уитни (Mann-

Whitney *U*-test). Для сравнения зависимых выборок (внутри групп низко- и высокоиммунных самцов) использовали *t*-критерий Стьюдента для сопряженных пар (Student’ *t*-test for Dependent Samples) или тест Уилкоксона (Wilcoxon Matched Pairs Test).

Для оценки наследуемости (h^2) силы иммунного ответа на SRBC использовали коэффициент линейной регрессии родитель-потомок (Falconer, Mackay, 1997). Коэффициент регрессии (b) и его стандартную ошибку (SE) удваивали в том случае, если использовался признак только одного из родителей. В этом случае при вычислении величины h^2 учитывали эффект ассортативного скрещивания, который был отчетливо выражен: корреляция между ТАТ самок и самцов (среднее значение по первой и второй иммунизации) достигала $R_s = 0.78$, $p = 0.001$). Если же рассматривали регрессию среднего значения признака в выводке на среднее значение признака родителей, то коэффициент регрессии не удваивали и поправку на ассортативное скрещивание не вносили (Falconer, Mackay, 1997). Распределения остатков регрессий во всех случаях соответствовали нормальному. Дисперсии ТАТ были практически одинаковы у обоих полов ($\sigma_{\text{♀}}/\sigma_{\text{♂}} = 1.04$), поэтому поправки на различие в дисперсиях не вносили (Falconer, Mackay, 1997). Все потомки, участвовавшие в оценке наследуемости, принадлежали к выводкам из первого поколения (F1).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Повторяемость и наследуемость индивидуальных вариаций в индуцированной SRBC иммунореактивности у потомков. Уже в поколении F1 как у самцов, так и у самок наблюдали смещение распределений ТАТ в сторону высоких титров у детенышей, рожденных от родителей с высокими титрами, и в сторону низких титров у детенышей, рожденных от родителей с низкими ТАТ. Наследуемость интенсивности иммунного ответа на SRBC, вычисленная при помощи регрессии среднего ТАТ в выводке на среднеродительский ТАТ, составляла $h^2 = 0.30 \pm 0.08$ ($n = 40$, $p < 0.001$) (рисунок). Считается, что для млекопитающих обычно более надежен показатель регрессии признака у потомков на признак у отцов (Falconer, Mackay 1997). Однако в нашем случае материнский эффект был слабо выражен, поскольку регрессия признака у потомков на признак у матерей и регрессия признака у потомков на признак у отцов дали одинаковую оценку наследуемости $h^2 = 0.30 \pm 0.09$ ($n = 40$, $p < 0.003$ в



Связь среднего по выводку титра антител потомков F1 со средним по первой и повторной иммунизации (спустя полгода и уже после рождения нескольких выводков) титром антител у их родителей.

обоих случаях). Таким образом, уже на первом этапе отбора был получен селекционный эффект по признаку, который должен быть сильно подвержен средовым влияниям.

Сравнение самцов с низким и высоким гуморальным иммунным ответом на SRBC в поколении F2.

Самцы с низкой (ТАТ: 0–4) и высокой (ТАТ: 7–11) иммунореактивностью не различались статистически значимо по большинству сравниваемых признаков (табл. 1 и 2). Наблюдали близкое к статистически значимому отличие по фоновому уровню кортизола в крови; у высокорективных самцов уровень стрессированности был более низким. Мы не наблюдали теоретически ожидаемого увеличения уровня тестостерона у низкорективных самцов. Агрессивность же была более высокой в группе высокорективных хомячков ($p < 0.05$). Не наблюдали и тенденции к ускоренному росту и созреванию низкорективных самцов. Срединная брюшная железа (зависящий от тестостерона орган) была большего размера у высокорективных 2-месячных самцов ($p = 0.05$). Различия по массе тела и по ано-генитальному расстоянию в этом возрасте не было.

При сравнении внутри групп уровень тестостерона, измеренный на пике иммунного ответа, был ниже, чем фоновый, но только среди высокорективных самцов (Student' t -test for Dependent Samples: $t = -2.04$, $p = 0.02$, $n_1 = n_2 = 23$). Среди низкорективных самцов $t = -0.94$, $p = 0.35$, $n_1 = n_2 = 18$.

Уровень тестостерона в крови, взятой непосредственно после экспериментального ссаживания самцов за неделю перед повторной иммунизацией SRBC, был выше, чем на пике гуморального иммунного ответа, как в группе низкорективных

самцов ($t = 3.66$, $p = 0.002$, $n_1 = n_2 = 18$), так и высокорективных самцов ($t = 3.33$, $p = 0.003$, $n_1 = n_2 = 23$). Однако причиной повышенного уровня тестостерона до иммунизации в этом случае мог быть социальный конфликт. Социальный конфликт приводил к увеличению уровня кортизола в крови как у низкорективных (Wilcoxon Matched Pairs Test: $Z = 3.68$, $p < 0.001$, $n_1 = n_2 = 18$), так и у высокорективных самцов (Wilcoxon Matched Pairs Test: $Z = 4.20$, $p < 0.001$, $n_1 = n_2 = 23$).

Результат отбора на низкий/высокий индуцированный SRBC иммунный ответ не отразился на показателях активности приобретенного Т-клеточного и врожденного иммунитета.

Самцы с низким и высоким иммунным ответом на SRBC в поколении F2 не отличались в успешности покрытия 2-месячных девственных самок, подсаженных к самцам после окончания тестирования (Mann-Whitney U -test: $Z = 0.52$, $p = 0.60$, $n_1 = 19$, $n_2 = 24$). Число дней от момента формирования пары до рождения первого выводка варьировало у низкорективных самцов от 19 до 100, медиана = 21, $n = 19$; у высокорективных самцов – от 18 до 54 дней, медиана = 21, $n = 24$. Пары, в составе которых были низкорективные самцы, однако, имели меньшие по размеру выводки по сравнению с парами, в которые входили высокорективные самцы (низкорективные самцы: 4.2 ± 0.6 детеныша в выводке, высокорективные самцы: 6.0 ± 0.3 детеныша, Student's $t = -2.68$, $p = 0.01$, $n_1 = 19$, $n_2 = 24$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В последнее десятилетие происходит поиск междисциплинарных подходов к тестированию гипотез, в основе которых лежит идея трейдоффа физиологических функций в условиях дефицита энергетических и пластических ресурсов организма. Предпринимаются попытки объединения исследований генетических и физиологических основ трейдоффов (Sinervo, Svensson, 1998; Conner, 2003; Fuller et al., 2005; Mills et al., 2009a,b). Проведенная нами селекция хомячков Кэмпбелла дала возможность получить группы животных с высоким и низким иммунным ответом на мультифакториальный нереплицируемый антиген (SRBC) и сравнить контрастные по приобретенной гуморальной иммунореактивности группы самцов с их эндокринными, репродуктивными характеристиками, экспрессией связанных с полом признаков, с уровнем активности других систем иммунной защиты организма.

Таблица 1. Иммунные, морфофункциональные, эндокринные характеристики, энергообмен и поведение самцов хомячка Кэмпбелла, отобранных по признаку высокой – низкой иммунореактивности на введение нереплицируемого антигена (SRBC)

Переменные	Иммунореактивность				Статистика			
	низкая (0–4)	<i>N</i>	высокая (7–12)	<i>N</i>	<i>t</i> _{St}	<i>p</i>	<i>Z</i> _{M-W}	<i>p</i>
РНА-тест (характеристика состояния клеточного иммунитета), мм	1.98±0.14*	18	1.85±0.15	23	0.69	0.49		
Цитохимический индекс активности системы “Пероксидаза–эндогенная перекись водорода нейтрофилов”	216±8	18	217±6	23	-0.17	0.87		
Аногенитальное расстояние в возрасте 2 мес, мм	12.4±0.2	18	11.8±0.3	22	1.62	0.11		
Диаметр срединной брюшной железы в возрасте 2 мес, мм	5.76 (3–7)**	18	6.27 (4–7.8)	22			-1.95	0.05
Масса тела в возрасте 2 мес, г	35.5±1.3	18	38.4±1.4	22	-1.47	0.15		
Масса тела в возрасте 3 мес, г	40.8±1.5	18	43.8±1.4	23	-1.44	0.16		
Метаболизм покоя, кДж/день	33.1±1.3	20	35.8±1.4	23	-1.41	0.17		
Удельный метаболизм покоя, кДж/день × г	0.87±0.04	20	0.88±0.03	23	-0.18	0.86		
Уровень кортизола в крови фоновый, нг/мл	13.8 (0–58)	19	7.6 (0–25)	23			2.32	0.02
Уровень кортизола в крови в ответ на социальный конфликт, нг/мл	139 (45–435)	18	100 (55–272)	23			1.39	0.16
Уровень тестостерона в крови фоновый: Lg, нг/мл	0.79±0.13	19	0.61±0.14	24	0.91	0.36		
Уровень тестостерона в крови после социального конфликта, Lg, нг/мл	1.04±0.17	18	0.74±0.14	23	1.40	0.17		
Уровень тестостерона в крови на пике иммунного ответа: Lg, нг/мл,	0.60±0.15	18	0.30±0.14	23	1.5	0.14		
Агрессивность (число 5 с интервалов с агрессией)	4 (0–24)	18	10 (0–23)	23			-2.30	0.02

Примечание. Для табл. 1 и 2: *t*_{St} – значения *t* критерия Стьюдента, *Z*_{M-W} – *Z* статистика в тесте Mann-Whitney, *p* – вероятность, *N* – размер выборки.

* Среднее значение и ошибка для нормально распределенных данных. ** Медиана и размах изменчивости (в скобках) для распределений, отличных от нормальных.

Ранее на хомячке Кэмпбелла было показано, что у самцов, рожденных в конце зимы (весенние) с ускоренным темпом созревания, наблюдается повышенный уровень метаболизма покоя и тестостерона, и на этом фоне проявляет себя слабая тенденция к подавлению специфического гуморального иммунного ответа на SRBC, но Т-клеточный иммунный ответ (РНА-тест), напротив усилен по сравнению с самцами, рожденными в конце лета (осенние) (Роговин и др., 2013). Наши предварительные результаты манипулирования уровнем тестостерона у самцов хомячка Кэмпбелла свидетельствуют о слабо выраженном эффекте подав-

ления тестостероном гуморального иммунного ответа на SRBC. На фоне резкого падения уровня тестостерона в крови в результате кастрации не происходило статистически значимое усиление иммунореактивности на SRBC. Однако терапия в течение месяца кастрированных самцов препаратом тестостерона пролонгированного действия (омнадрен) устойчиво повышала у них уровень тестостерона в крови, и на этом фоне наблюдалась близкая к статистически значимой тенденция к снижению иммунореактивности на SRBC по сравнению с кастрированными самцами, которым делались инъекции масляной основы пре-

Таблица 2. Профили форменных элементов крови самцов хомячка Кэмпбелла, отобранных по признаку высокой–низкой иммунореактивности на введение нереплицируемого антигена (SRBC)

Переменные	Иммунореактивность				Статистика			
	низкая (0–4)	<i>N</i>	высокая (7–12)	<i>N</i>	<i>t</i> _{St}	<i>p</i>	<i>Z</i> _{M-w}	<i>p</i>
Нейтрофилы, <i>n</i> *	32 (13–56)**	17	27.5 (16–52)	16			0.95	0.34
Эозинофилы, <i>n</i>	6.06 ± 0.89***	17	5.81 ± 0.83	16	0.22	0.83		
Базофилы, <i>n</i>	0 (0–11)	17	0 (0–7)	16			0.31	0.76
Моноциты, <i>n</i>	3 (0–12)	17	2 (0–7)	16			1.08	0.28
Лимфоциты, <i>n</i>	53.65 ± 3.64	17	59.69 ± 3.15	16	–1.25	0.22		
Гранулоцитарно-лимфоцитарный индекс (<i>nG/nL</i>)	0.79 (0.21–1.84)	17	0.59 (0.22–1.47)	16			1.29	0.19
Лейкоцитарно-эритроцитарный индекс (<i>nWBC · 10⁻⁴ nEr</i>)	13 (6–36)	17	14.5 (7–39)	16			–0.93	0.35

* Число клеток данного типа на 100 лейкоцитов. ** Медиана и размах изменчивости (в скобках) для распределений отличных от нормального. *** Среднее значение и ошибка для нормально распределенных данных.

парата. Среди публикаций на тему существуют лишь сведения по близкому виду – джунгарскому хомячку (Bilbo, Nelson, 2001), причем в этом случае кастрация вела не к усилению, а, напротив, к подавлению Т-клеточного иммунного ответа и не сказывалась на силе В-клеточного (гуморального) иммунного ответа на антигены. Терапия тестостероном вела к усилению Т-клеточной, но не В-клеточной (гуморальной) иммунореактивности. У рыжих полевок искусственное повышение уровня тестостерона вело к угнетению продукции специфических антител у самцов из группы доминантов с высоким уровнем тестостерона, но не отражалось на уровне общего IgG (Mills et al., 2009b). В этой же работе показано, что уровень тестостерона в крови имеет хорошо выраженную наследственную составляющую.

Селекция хомячков на низкий/высокий иммунный ответ на SRBC позволила нам подойти к проблеме связи тестостерон–иммунокомпетентность с другой стороны, понять, существуют ли различия в характеристиках, имеющих отношение к репродукции у животных с различной иммунокомпетентностью. Нам не удалось найти подтверждения теоретически ожидаемому ускоренному созреванию низкоиммунных самцов и их большому репродуктивному успеху. Высокорепреактивные самцы в возрасте двух месяцев имели даже большие размеры срединной брюшной железы ($p = 0.05$) – органа, находящегося под влиянием тестостерона. Отсутствовало различие между выборками хомячков F2 поколения и по массе тела, энергообмену в состоянии покоя, уровню тестостерона. Не было отличия в активности си-

стемы Т-клеточного иммунитета и в показателях, непосредственно характеризующих неспецифическую, врожденную систему иммунной защиты организма (система ПЭПВ нейтрофилов, обилие гранулоцитов, гранулоцитарно/лимфоцитарный и лейкоцитарно/эритроцитарный индексы).

Гипотеза “Иммунного гандикапа” (Folstad, Karter, 1992), объясняя выбор самкой успешного в сексуальном плане самца высокими врожденными свойствами его здоровья, в современном понимании предполагает в качестве платы за сексуальный успех подавление активности энергоемкой системы приобретенного иммунитета. При этом косвенно подразумевается отсутствие положительной связи между активностью систем приобретенного (специфического) и врожденного (неспецифического) иммунитета. Отсутствие вообще связи (нулевая связь) в нашем исследовании, таким образом, не может служить аргументом против гипотезы. Сказанное, однако, верно, только если предполагать в основе трейдоффа конкуренцию за энергоресурсы. Если предметом конкуренции является не энергия, а субстраты, такие, например, как обладающие антиоксидантными свойствами каротиноиды, играющие важную роль в формировании сигнальной окраски у птиц, то их мобилизация на усиление брачной окраски самца в период гона должна сказываться на ослаблении как системы приобретенного, так и врожденного иммунитета.

До недавнего времени тестирование гипотезы “Иммунного гандикапа” в большинстве случаев (наибольший набор видов) сводилось к иссле-

дованию влияния андрогенов на приобретенный (специфический) иммунитет. При этом результаты проверок свидетельствуют скорее против гипотезы, чем за нее. Предпринятый Робертсом с соавторами (Roberts et al., 2004) мета-анализ результатов публикаций подтверждает иммуносупрессивный эффект тестостерона лишь в том варианте анализа, когда не исключаются повторные исследования одних и тех же видов. При исключении таких повторностей эффект утрачивается. Одним из факторов, влияющих на отношение между иммунокомпетентностью и андрогенами при экспериментальных манипуляциях уровнем половых гормонов, является стресс. При его длительном воздействии может наблюдаться подавление иммунитета гормонами стресса – глюкокортикоидами. Модулирующий эффект кортизола вполне реален и в нашем случае. Именно в группе низкоиммунных самцов мы наблюдали повышенный фоновый уровень кортизола, и именно в этой группе отсутствовало различие между фоновым уровнем тестостерона и уровнем тестостерона на пике иммунного ответа.

Другим важным фактором, способным влиять на результат сравнения, может быть специфика вида. Набор видов грызунов, для которых показан отрицательный эффект активации иммунитета на уровень тестостерона, ограничен домовою мышью, серой крысой (Voonekamp et al., 2008). У рыжей полевки показана наследственно обусловленная отрицательная зависимость уровня тестостерона от иммунокомпетентности самца (Mills et al., 2009a). Особенности распределения во времени репродуктивного усилия у видов с разными системами размножения (mating systems) должны накладывать отпечаток на самую возможность наблюдения (регистрации) трейдоффа между репродукцией и иммунитетом. В нашем случае на результат сравнения низко- и высокоиммунных самцов хомячка Кэмпбелла, возможно, накладывает отпечаток растянутость во времени репродуктивного усилия самца. Известно, что самцы хомячков Кэмпбелла активно участвуют в заботе о потомстве (Соколов и др., 1989; Wynne-Edwards, 1998; Wynne-Edwards, Lisk, 1989; Васильева, Хрущова, 2010). В такой ситуации жесткий трейдофф (на узком временном интервале) между затратами на репродукцию и специфическую иммунореактивность не представляется эволюционно оправданным. Для развития этой интересной темы перспективными представляются сравнительные исследования близких видов грызунов с различными системами размножения. Едва ли не единственным примером такого рода остается исследование двух видов североамериканских

серых полевок: моногамной полевки (*Microtus ochrogaster*) и полигамной (*M. pennsylvanicus*) (Klein, Nelson, 1998). Вопреки ожиданию, самцы полигамного вида (с высоким уровнем андрогенов) обладали более интенсивным иммунным ответом на бактериальные антигены, чем самки, в отличие от вида-моногама.

Помимо огромного разнообразия особенностей репродуктивных адаптаций у грызунов объективная трудность проверок гипотезы “Иммунного гандикапа” связана со сложностью и глубокой эшелонированностью механизмов сопротивления болезням (Лохмиллер, Мошкин, 1999). С учетом существующих на сегодня знаний перспективным в плане проверок этой привлекательной для эволюционных биологов гипотезы представляется лишь комплексный подход с акцентом на экспериментальные исследования (Roberts et al., 2004). Эти эксперименты должны включать как прижизненное манипулирование уровнем андрогенов и активацию иммунитета (phenotypic engineering), так и манипуляции с генетической основой изменчивости иммунитета и эндокринного статуса. Наряду с современными технологиями генетического нокаута (genetic engineering), необходимыми для детального исследования механизмов трейдоффов между репродуктивным усилием и иммунитетом (Zhang et al., 2010), селекционный эксперимент на низкую/высокую иммунокомпетентность и на низкий – высокий уровень андрогенов позволяет оценивать общие направления связей. На этом основании он вполне заслуживает того, чтобы быть включенным в набор необходимых проверок обсуждаемой гипотезы. Необходимо, однако, учитывать, что селекция, как в нашем случае, по величине иммунного ответа не исключает непрямой отбор на разный уровень иммуносупрессирующих факторов, например тестостерона. Изменения в уровне андрогенов и вторичных половых признаков не обязательно могут быть обусловлены первичными изменениями в иммунной системе. Более точный ответ о влиянии иммунной системы на эндокринные функции могут дать генно-инженерные методы. Примером может служить исследование самцов домовых мышей с нокаутом по интерлейкину-1, обуславливающим подавление специфического иммунного ответа на антигены. Такие самцы демонстрировали рост концентрации тестостерона в фекалиях и повышенную агрессивность (Moshkin et al., 2001; Tamagawa et al., 2007).

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ 10-04 00278-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бут П.Г., Муравьев Р.А., Фомина В.А., Роговин В.В., 2002. Антимикробная активность миелопероксидазы пероксидазосом нейтрофила // Изв. АН. Сер. биол. № 3. С. 266–270.
- Бут П.Г., Фомина В.А., Муравьев Р.А., Роговин В.В., 2003. Миелопероксидаза пероксидазосом нейтрофила // Изв. АН. Сер. биол. № 3. С. 261–265.
- Бушуев А.В., Керимов А.Б., Иванкина Е.В., 2010. Оценка наследуемости и повторяемости уровня метаболизма покоя птиц на примере свободноживущих мухоловок-пеструшек *Ficedula hypoleuca* (Aves: Passeriformes) // Журн. общ. биологии. Т. 71. № 5. С. 402–424.
- Васильева Н.Ю., Хруцова А.М., 2010. "Кормящий отец" – миф или реальность? Роль специфических кожных желез самца в выживании потомства у хомячка Кэмпбелла (*Phodopus campbelli* Thomas, 1905; Cricetidae, Rodentia) // Журн. общ. биологии. Т. 71. № 3. С. 195–204.
- Керимов А.Б., Роговин К.А., Иванкина Е.В., Бушуев А.В., Соколова О.В., Ильина Т.А., 2012. Специфический иммунитет и полиморфизм брачного наряда самцов мухоловки-пеструшки, *Ficedula hypoleuca* (Aves: Passeriformes) // Журн. общ. биологии. Т. 73. № 5. С. 349–359.
- Лохмиллер Р.П., Мошкин М.П., 1999. Экологические факторы и адаптивная значимость изменчивости иммунитета мелких млекопитающих // Сиб. экол. журн. Т. 1. С. 37–58.
- Муравьев Р.А., Бут П.Г., Фомина В.А., Роговин В.В., 2002. Механизм бактерицидной активности в фагосомах нейтрофилов // Изв. АН. Сер. биол. № 4. С. 437–441.
- Роговин В.В., Бут П.Г., 1989. Способ определения активности системы пероксидаза-эндогенная перекись водорода в лейкоцитах крови на мазках. Патенты: № 20–21–208 от 14.11.1989; № 20–22–241 от 14.11.1989.
- Роговин К.А., Бушуев А.В., Хруцова А.М., Васильева Н.Ю., 2013. Энергообмен в состоянии покоя, стресс, тестостерон и индуцированный иммунный ответ у "весенних" и "осенних" самцов хомячка Кэмпбелла. Выращивание в условиях длинного дня // Журн. общ. биологии. Т. 74. № 5. С. 366–378.
- Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д., 2000. Иммунология М.: Мир. 581 с.
- Соколов В.Е., Васильева Н.Ю., Зинкевич Э.П., 1989. Секрет среднебрюшной железы самцов джунгарского хомячка (*Phodopus campbelli* Thomas, 1905) содержит фактор, регулирующий половое созревание детенышей // ДАН СССР. Т. 308. № 5. С. 1274–1277.
- Шекарова О.Н., Хруцова А.М., Роговин К.А., 2010. О возможности неинвазивной оценки репродуктивного статуса хомячка Кэмпбелла (*Phodopus campbelli*) по цифровым фотоснимкам // Зоол. журн. Т. 89. № 10. С. 1–4.
- Bayyari G.H., Huff W.E., Rath N.C., Balog J.M., Newberry L.A., Villines J.D., Skeeles J.K., Anthony N.B., Nestor K.E., 1997. Effect of the genetic selection of turkeys for increased body weight and egg production on immune and physiological responses // Poultry Sci. V. 76. P. 289–296.
- Bilbo S.D., Nelson R.J., 2001. Sex steroid hormones enhance immune function in male and female Siberian hamsters // Amer. J. Physiol: Regulatory and Integrative Comp. Physiol. V. 280. P. R207–R213.
- Boonekamp J.J., Ros A.H.F., Verhulst S., 2008 Immune activation suppresses plasma testosterone level: a meta-analysis // Biol. Lett. V. 4. P. 741–744 / doi:10.1098/rsbl.2008.0347.
- Brown G.M., Martin J., 1974. Corticosterone, prolactin, and growth hormone responses to handling and new environment in the rat // Psychosomatic Medicine. V. 36. P. 241–247.
- Brown C.M., Xu Qing, Okhubo Nobutaka, Vitek M.P., Colton C.A., 2007. Androgen-Mediated Immune Function Is Altered by the Apolipoprotein E Gene // Endocrinology V. 148. N. 7. P. 3383–3390 / doi: 10.1210/en.2006–1200 .
- Bushuev A.V., Husby A., Sternberg H., Grinkov V.G., 2012. Quantitative genetics of basal metabolic rate and body mass in free-living pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) // J. Zool. V. 288. P. 245–251.
- Chen J.-F., Wen-Qin Zhong, De-Hua Wang, 2006. Metabolism and thermoregulation in Maximowicz's voles (*Microtus maximowiczii*) and Djungarian hamsters (*Phodopus campbelli*) // J. Thermal Biology. V. 31. P. 583–587.
- Conner J.K., 2003. Artificial selection: A powerful tool for ecologists // Ecology V. 84. P. 1650–1660.
- Costerl G., De, Neve L., De, Martin-Galvez D., Therry L., Lens L., 2010. Variation in innate immunity in relation to ectoparasite load, age and season: a field experiment in great tits (*Parus major*) // J. Exper. Biol. V. 213. P. 3012–3018 / doi:10.1242/jeb.042721 .
- Downs C.T., Brown M., 2012. Is respirometry a standardized technique? A review of measurement of avian resting metabolic rates // J. Thermal Biology. V. 37. P. 531–536.
- Falconer D.S., Mackay T.F.S., 1997. Introduction to quantitative genetics. 4th ed. Longman Group Ltd., Edinburgh Gate. Harlow Essex. UK. 464 p.
- Folstadt I., Karter A.J., 1992. Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap // Amer. Natur. V. 139. P. 603–622 / doi:10.1086/285346
- Fuller R.C., Baer C.F., Travis J., 2005. How and when selective experiments might be actually useful // Integr. Comp. Biol. V.45. P. 391–404.
- Garratt M., Brooks P.C., 2012. Oxidative stress and condition-dependent sexual signals: more than just

- seeing red // Proc. R. Soc. B. V. 279. P. 3121–3130 / doi:10.1098/rspb.2012.0568 .
- Greives T.J., McGlothlin, J.W., Jawor J.M., Demas G.E., Ketterson E.D., 2006. Testosterone and innate immune function inversely covary in a wild population of breeding Dark-Eyed Juncos (*Junco hyemalis*) // Functional Ecology. V. 20. P. 812–818.
- Górecki A., 1975. Kalabukhov–Skvortsov respirometer and resting metabolic rate measurement // IBP Handbook №24: Methods for ecological energetics / Eds Grodziński W., Klekowski R.Z., Duncan A. Oxford, UK: Blackwell Scientific. P. 309–313.
- Hamilton W.D., Zuk M., 1982. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? // Science V. 218. P.384–387.
- Hillgarth N., Wingfield J.C., 1997. Parasite-mediated sexual selection: endocrine aspects // Host–parasite evolution: general principles and avian models / Eds Clayton D.H., Moore J. Oxford, UK: Oxford Univ. Press. P. 78–104.
- Klein S.L., Nelson R.J., 1998 Adaptive Immune Responses Are Linked to the Mating System of Arvicoline Rodents // Amer.Natur. V. 151. № 1. P. 59–67 / doi: 10.1086/286102 .
- Kurtz J., Kalbe M., Langefors Å., Mayer I., Milinski M., Hasselquist D., 2007. An Experimental Test of the Immunocompetence Handicap Hypothesis in a Teleost Fish: 11-Ketotestosterone Suppresses Innate Immunity in Three-Spined Sticklebacks // Amer. Natur. V. 170. № 4. P. 509–519 /doi: 10.1086/521316
- Mills S.C., Grapputo A., Jokinen I., Koskela E., Mappes T., Poikonen T., 2009a. Fitness trade-offs mediated by immunosuppression costs in a small mammal // Evolution. V. 64. P. 166–179.
- Mills S.C., Grapputo A., Jokinen I., Koskela E., Mappes T., Oksanen T.A., Poikonen T., 2009b. Testosterone-mediated effects on fitness-related phenotypic traits and fitness // American Naturalist. V. 173. P. 475–487.
- Moshkin M.P., Tamagawa A., Kolosova I.E., Gerlinskaya L.A., Iwakura Y., Endo Y., 2001. Behavioral and Endocrine Effects of Endotoxin in Wild-Type Mice and Mice Deficient in Interleukin 1: Sickness Behavior or Adaptive Response? // Doklady Biological Sciences. V. 379. № 1–6. P. 322–324.
- Møller A.P., Christe P., Lux E., 1999 Parasitism, host immune function, and sexual selection // Q. Rev. Biol. V. 74. P. 3–20 / doi:10.1086/392949.
- Norris K., Evans M.R., 2000. Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds // Behav. Ecol. V.11. P. 19–26.
- Ots I., Kerimov A.B., Ivankina E.V., Ilyina T.A., Hõrak P., 2001. Immune challenge affects basal metabolic activity in wintering great tits // Proceedings of Royal Society. London B. V. 268 (1472). P. 1175–1181.
- Parmentier H.K., Nieuwland M.G.B., Rijke E., Reilingh G.D., Schrama J.W., 1996. Divergent antibody responses to vaccines and divergent body weights of chicken lines selected for high and low humoral responsiveness to sheep red blood cells // Avian Dis. V. 40. P. 634–644.
- Roberts M.L., Buchanan K.L., Evans M.R., 2004. Testing the immunocompetence hypothesis: A review of the evidence // Anim. Behav. V. 68. P. 227–239 / doi:10.1016/j.anbehav.2004.05.001.
- Schantz T., Bensch S., Grahn M., Hasselquist D., Wittzell H., 1999. Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals // Proc. R. Soc. Lond. B. V. 266. P. 1–12 / doi:10.1098/rspb.1999.0597.
- Schmidt-Nielsen K., 1997. Animal physiology: adaptation and environment. N.Y.: Cambridge: Cambridge Univ. Press. 607 p.
- Sheldon B.C., Verhulst S., 1996. Ecological immunology: Costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology // Trends in Ecol. Evol. V. 11. P. 317–321.
- Sinclair J.A., Lochmiller R.L., 2000. The winter immunoenhancement hypothesis: associations among immunity, density, and survival in prairie vole (*Microtus ochrogaster*) populations // Can. J. Zool. V. 78. P. 254–264.
- Sinervo B., Svensson E., 1998. Mechanistic and selective causes of life history trade-offs and plasticity // Oikos. V. 83. P. 432–442.
- Tamagawa A., Kolosova I., Endo Y., Gerlinskaya L., Iwakura Y., Moshkin M., 2007. Interleukin-1 deficiency and aggressiveness in male mice // Psychoneuroendocrinology Research Trends. N.Y.: Nova Science. P. 343–360.
- Tella J.L., Lemu J.A., Carrete M., Blanco G., 2008. The PHA test reflects acquired T-cell mediated immunocompetence in birds. PLoS ONE 3, e3295 /doi:10.1371/journal.pone.0003295 .
- Verhulst S., Parmentier H.K., Dieleman S.J., 1999. A trade-off between immunocompetence and sexual ornamentation in domestic fowl // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 96. P. 4478–4481 / doi:10.1073/pnas.96.8.4478.
- Viney M.E., Riley E.M., Buchanan K.L., 2005. Optimal immune responses: Immunocompetence revisited // Trends in Ecol. Evol. V.20. P. 665–669.
- Wegmann T.G., Smithies O., 1966. A simple hemagglutination system requiring small amounts of red cells and antibodies // Transfusion. V. 6. № 1. P. 67–73.
- Wynne-Edwards K.E., 1998. Evolution of parental care in *Phodopus*: Conflict between adaptations for survival and adaptations for rapid reproduction // Amer. Zool. V. 38. P. 238–250.
- Wynne-Edwards K.E., Lisk R.D., 1989. Differential effects of paternal presence on pup survival in two species of dwarf hamster (*Phodopus sungorus* and *Phodopus campbelli*) // Physiol. Behav. V. 45. № 3. P. 465–469.
- Zahavi A., 1975. Mate selection: A selection for a handicap // J. Theor. Biol. V. 53. P. 205–214.
- Zhang Jian-Xu, Sun Lixing Zhang Yao-Hua, 2010. Foxn1 gene knockout suppresses sexual attractiveness and pheromonal components of male urine in inbred mice // Chem. Senses. V. 35. P. 47–56 / doi:10.1093/chemse/bjp081.

Immunocompetence and reproductive characteristics of male Campbell dwarf hamsters selected for low and high humoral immune response to SRBC: Testing the Immunocompetence Handicap Hypothesis

**K. A. Rogovin¹, A. M. Khrushcheva¹, O. N. Shekarova¹, A. V. Bushuev²,
O. V. Sokolova³, N. Yu. Vasilieva¹**

¹ *A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS
119071 Moscow, Leninskii Pr., 33
e-mail: krogovin@yandex.ru*

² *M.V. Lomonosov Moscow State University
Faculty of Biology, Department of Vertebrate Zoology,
119991 Moscow, Leninskie Gori
e-mail: bushuev@mail.bio.msu.ru*

³ *Ya.R. Kovalenko Research Institute of the Experimental Veterinaria
Department of Immunology
109428 Moscow, Ryazansky Pr., 24-1
National Hematology Research Centre (NHRC)
125167 Novozykovsky Proezd, 4
e-mail: ovsokolova@mail.ru*

We selected Campbell dwarf hamsters (*Phodopus campbelli* Thomas, 1905) for low and high humoral immune response to the sheep red blood cells (SRBC) challenge in three generations (P, F1, F2). Non-specific innate immunity and acquired T-cell immunity, resting metabolic rate, testosterone, and cortisole hormone levels, reproductive characteristics, including maturation related morphological traits, and aggressive behavior were studied within sets of males with low (LI) and high (HI) immune response to SRBC. We found no difference between LI and HI males in cutaneous response to injection of phytohemagglutinin, (DTH test for T-cell immunity), in activity of Peroxidase – Endogenous Hydrogen Peroxide System of Neutrophils, in the white blood count, in resting metabolic rate, in body mass and ano-genital distance at the age of two months, in the blood level of testosterone before and after recurrent immunization by SRBC and in the blood level of cortisole in response to the social stressor (10 min encounter in the neutral arena). At that, LI males had significantly higher basal level of blood cortisole, were less aggressive in response to stranger male and had smaller testosterone-dependent mid-ventral specific skin gland at the age of two months. Males of two groups did not differ in the initial mating success with intact young females (time since pair formation until first litter born), although females of LI males born fewer number of pups. In fact, our results do not support the Handicap Immunocompetence Hypothesis (Folstad, Karter, 1999) which is based on the assumption of trade-off between immunocompetence and reproductive effort.