

УДК 571.27

**ОСОБЕННОСТИ ОЛЬФАКТОРНОГО ОТБОРА ПО МНС
С ПОЗИЦИИ РЕПРОДУКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА****А. А. Могилина, А. В. Шабалдин, Л. В. Акинчина, Н. А. Литвинова, В. И. Иванов**

*Проверялась гипотеза об ассортативном ольфакторном выборе женщинами мужчин в главном комплексе гистосовместимости. С этой целью провели ольфакторное тестирование женщинами мужчин, а также генотипирование всех испытуемых. Было исследовано 48 юношей и 19 девушек, причем девушки оценивали запах мужчин в две фазы овариального цикла: рецептивную и нерецептивную. Установлено, что распределение аллелей HLADRB1 среди испытуемых не отличается от распределения по Харди-Вайнбергу. Также выявлено стойкое, независимо от фазы овариального цикла, неприятие женщинами с HLADRB1*04 в генотипе запаха мужчин, несущими HLADRB1*15 аллель. Данные аллели связаны с формированием иммуннопатологии.*

*The hypothesis about nonrandom olfactory mate choice in main histocompatibility complex was checked. For this purpose we conducted olfactory testing (women test of men's smell) and we had typed for all test people's HLADRB1. There was explored 48 men and 19 women, moreover girls valued the odour of the men in two phases ovarian cycle: receptive and nonreceptive. It is revealed that HLADRB1 distribution amongst test people does not differ from Hardy-Vaynberg distribution. The woman with HLADRB1*04 avoid the man carrying HLADRB1*15 in all phases ovarian. These alleles are entail immune pathology.*

Ключевые слова: гемокоммуникация, HLA, репродукция.

Модельные эксперименты на инбредных и конгенных линиях мышей доказали связь половых предпочтений с главным комплексом гистосовместимости (Н-2). Было показано, что при скрещивании животных превалировал выбор не родственных (не собственных – по self) Н-2 гаплотипов [1]. С позиции популяционной генетики, такой отбор целесообразен, так как именно гетерозиготный по генам Н-2 организм идентифицирует более широкий диапазон антигенов и поэтому обладает более эффективной иммунной системой [2].

Было предположено и в экспериментах доказана роль запахового предпочтения при половом отборе по Н-2 [3, 4]. Так, была выдвинута гипотеза о возможной роли главного комплекса гистосовместимости в целом (МНС) в формировании индивидуального запаха особей [5], которая впоследствии была подтверждена Ямадзакой с соавт. [3, 4]. Более того, высказано предположение, что ведущая роль МНС в иммунном ответе имеет вторичное эволюционное значение [6]. Первично эти молекулы участвовали в виде рецепторов для ольфакторных распознаваний в процессе коммуникаций живых систем [7].

Несмотря на доминирование у человека зрительных и слуховых форм общения, обонятельные сигналы продолжают оказывать определенное влияние на физиологическое состояние людей [8]. Wedekind et. al., (1995) на шведской популяции показал феномен ольфакторного отбора в главном комплексе гистосовместимости (HLA) у человека. Суть этого отбора сводится к исключению инцеста по HLA и увеличению в этом локусе гетерозиготности [9]. Работы, проведенные Carol Ober в закрытой секте Хаттеритов, показали наличие дисассортативности по HLA в брачном выборе [10].

В то же время наличие ассортативности по HLA при образовании супружеских пар может отклонять популяционное равновесие и тем самым изменять степень иммунной адаптации популяции [11].

Исходя из этого, целью настоящего исследования было изучение особенностей ольфакторного отбора по гену HLADRB1 среди неродственных доноров разного пола в восточно-европейской популяции, а также разработка гипотез о механизмах иммунной адаптации в этой популяции.

Материалы и методы

Исследование проводили среди девушек и юношей, в возрасте 18 – 21 года. Донорами запаха явились юноши, реципиентами – девушки. У каждого испытуемого забирался буккальный эпителий.

Образцы пота собирали на фильтровальные диски, которые были пришиты на специальные хлопчатобумажные майки в местах подмышечных впадин. Юноши находились в майках в течение 60 минут. Затем диски помещали в пенициллиновые флаконы с герметичной крышечкой и хранили в холодильнике при – 20°C.

При тестировании запаха девушки заполняли протоколы, где давали субъективную оценку по 10-ти балльной шкале – от очень неприятного (= -5) до очень приятного (= 5). Девушки проводили тестирование в рецептивную и нерецептивную фазы овариального цикла.

Буккальный эпителий собирали с внутренней поверхности щеки в пробирки Эппендорф. Из клеток буккального эпителия выделяли ДНК методом фенол-хлороформной экстракции. Для типирования гена HLA DRB1* использовали тест-систему HLA-ДНК-ТЕХ. Для амплификации участка, определяющего полиморфизм гена HLA DRB1* (в 3 экзоне), проводилась 2-этапная ПЦР на амплификаторе «Терцик». Детекцию продуктов амплификации проводили при помощи электрофореза в 3 % агарозном геле (рис. 1).

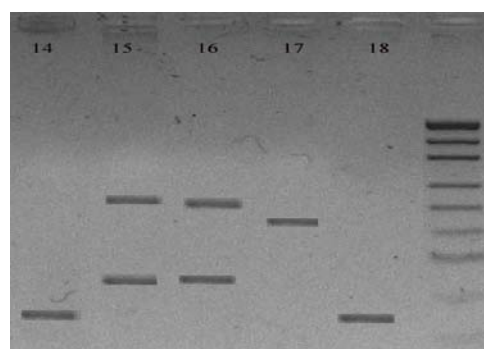
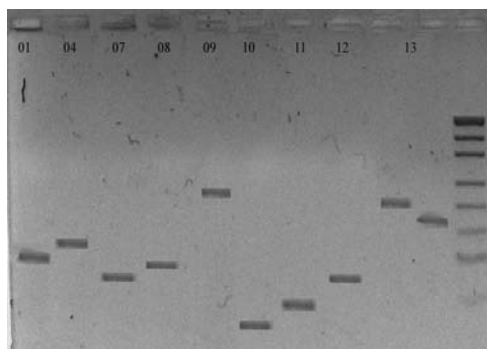


Рис. 1. Детекция продуктов амплификации гена *HLA-DRB1** в 3 % агарозном геле

Таблица 1

Доли частот сочетаний женских и мужских аллелей *HLA-DRB1* при отрицательном ольфакторном выборе женщин, находящихся в рецептивной фазе овариального цикла

Положительные оценки		Отрицательные оценки	
нерецептивные женщины			
сочетание аллелей	<i>p(t)</i>	сочетание аллелей	<i>p(t)</i>
HLADRB1*07 с HLADRB1*14	0.021544231	HLADRB1*04 с HLADRB1*04	0.000196816
HLADRB1*15 с HLADRB1*01	0.003249904	HLADRB1*04 с HLADRB1*15	0.004610958
рецептивные женщины			
HLADRB1*16 с HLADRB1*04	0.010957573	HLADRB1*04 с HLADRB1*15	0.010519651
		HLADRB1*12 с HLADRB1*01	0.019326593

Примечание: в сочетании *HLA-DRB1* аллелей: первый аллель женский, второй – мужской.

Статистическая обработка

Для каждого аллеля определялась его частота в выборе и подсчитывалась вероятность встречи с любым аллелем противоположного пола, допуская, что вероятность комбинирования каждого из аллелей гетерозиготы не влияет на вероятность комбинирования другого.

Полученные результаты отражены в табл. 1, где в каждой ячейке указаны расчетные частоты встречаемости соответствующих аллелей.

Наблюдаемые частоты сочетаний женских и мужских аллелей *HLA-DRB1* были получены путем подсчета оценок запаховой привлекательности. Отбор сочетаний *HLA-DRB1* аллелей проводился по 4 типам оценок:

- первый тип оценок – женщины в нерецептивной фазе овариального цикла оценивают запах как привлекательный;
- второй тип оценок – женщины в нерецептивную фазу овариального цикла оценивают мужской запах как неприятный;
- третий тип оценок – женщины в рецептивную фазу дают оценку мужскому запаху как привлекательному;
- четвертый тип оценок – рецептивные женщины оценивают мужской запах как неприятный.

Для проверки гипотезы при случайном подборе супружеских пар по локусу *HLA-DRB1* оценили отклонение наблюдаемых частот всех встречавшихся комбинаций *HLA-DRB1* мужчины и женщины от расчетных, по формуле Харди-Вайнберга, или ожидаемых, в соответствии с частотами аллелей при помощи χ^2 . Для характеристики выбора по отдельным аллелям *HLA-DRB1* провели попарное сравнение частот сочетаний женских и мужских *HLA-DRB1* аллелей с расчетными для случайного выбора с помощью Т-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Ольфакторный брачный выбор по HLA относится к популяционному фактору динамики. При выраженном влиянии на популяцию внешних факторов может проявляться ассортативность при образовании супружеских пар, особенно если этот фактор имеет векторную направленность. С точки зрения популяционной генетики, известно, что одним из признаков популяции является ее устойчивость во времени. Этот закон отражен в уравнении Харди-Вайнберга. Закон Харди-Вайнберга для особей с диплоидным набором хромосом определяет, что квадрат сумм конкурентных аллелей является постоянным и равен 1 в равновесных популяциях, т. е. изменчивость будет оставаться на одном и том же уровне. Результаты сравнения наблюдаемых частот сочетаний *HLA-DRB1* с расчетными по формуле

Харди-Вайнберга $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ показали следующее. Так, достоверных отличий между расчетным и полученным распределениями частот сочетаний женских и мужских аллелей для всех четырех типов оценок не обнаружено, что указывает на отсутствие общей ассортативности по HLADRB1 в любую фазу овариального цикла.

В последнем случае неслучайность в образовании супружеских пар также приобретает полярность, которая может потенцировать высокий риск гомозиготности в последующих поколениях. В то же время по полученным результатам можно утверждать, что на исследуемую популяцию не действуют факторы внешней среды, или их действия компенсированы и тем самым ассортативность по HLA либо отсутствует, либо компенсирована. Одним из механизмов коменсации может быть разнонаправленность ассортативности по отдельным аллелям, что было исследовано на следующем этапе работы.

Характеристика особенностей ольфакторного выбора по отдельным аллелям HLADRB1 показала следующее. Как видно из представленных данных, при анализе положительного и отрицательного ольфакторного выбора женщинами мужчин было выявлено как преобладание опытных частот сочетаний женского и мужского аллелей над расчетными, так и их дефицит. Чтобы адекватно оценить биологический смысл этих фактов, провели сравнение комбинаций женского и мужского HLADRB1 при достоверном преобладании этих комбинаций в положительном ольфакторном выборе (например женского HLADRB1*07 с мужским HLADRB1*14) с их дефицитом в случае отрицательного ольфакторного выбора. Если достоверно различимые частоты сочетаний комбинаций встречались в обеих вышеуказанных группах, то можно было утверждать, что женщины с DRB1*07 аллелем, с одной стороны, предпочитают запах мужчин – носителей аллеля HLADRB1*14, а с другой – игнорируют отрицательную оценку этого аллеля, то есть фактически притягивают этот аллель. Именно такие комбинации можно было считать как наиболее полно отражающими положительный или отрицательный выбор. Этот методический подход использовали как для оценок нерцептивной, так и для рецептивной фаз овариального цикла женщин. Выявили следующие стойкие комбинации (табл. 1): положительный ольфакторный выбор в нерцептивную фазу достоверен для сочетаний женского HLADRB1 с мужским HLADRB1; HLADRB1*07 с HLADRB1*14 и HLADRB1*15 с HLADRB1*01; а отрицательный – для сочетаний HLADRB1*04 с HLADRB1*04 и HLADRB1*04 с HLADRB1*15. Стойкое ольфакторное притягивание в рецептивную фазу овариального цикла было характерно для женского HLADRB1*16 с мужским HLADRB1*04, а отрицательная ассортативность в рецептивную фазу характерна для женского HLADRB1*04 с мужским HLADRB1*15 и HLADRB1*12 с HLADRB1*01.

Анализ положительной ассортативности показал отсутствие общих комбинаций женских с мужскими

HLADRB1 аллелями для нерцептивных и рецептивных фаз овариального цикла. В то время как анализ отрицательной ассортативности показал наличие общей комбинации для рецептивной и нерцептивной фаз – это сочетание женского HLADRB1*04 аллеля с мужским HLADRB1*15. Кроме того, для нерцептивной фазы выявили избегание сочетания идентичных HLADRB1*04 аллелей.

Чтобы понять биологический смысл отторжения женского HLADRB1*04 аллеля от мужского HLADRB1*15, охарактеризовали ассоциации HLADRB1*04 – HLADRB1*15 специфичностей с патологией иммунной системы и репродукции. Известно, что DRB1*04 аллель является «классическим» маркером аутоиммунных заболеваний, причиной которых могут быть и репродуктивные проблемы [12]. Так, HLADRB1*04-специфичность ассоциирована с развитием целого ряда заболеваний, таких как сахарный диабет 1 типа, ревматоидный артрит, аутоиммунный тиреоидит, ювенильный ревматоидный артрит [11, 12, 14]. Все эти заболевания относятся к аутоиммунной патологии, формирующейся при гиперактивной иммунной системе. Эту гиперактивность иммунной системы и определяет специфичность DRB1*04, которая формирует устойчивость к инфекциям, а также высокий иммунный ответ и к собственным тканям [9]. Именно это детерминирует формирование антифосфолипидного синдрома, который в 50 % случаев является причиной иммунной формы невынашивания беременности [12].

Что же касается DRB1*15, то данная специфичность ассоциирована одновременно с чувствительностью к развитию аутоиммунной патологии ЦНС (рассеянный склероз) и одновременно с выраженной чувствительностью к инфекциям, в том числе хроническим (положительные ассоциации со слабым типом иммунного ответа к инфекционным антигенам: столбняка, туберкулеза, хламидиоза) [16]. В то же время DRB1*15 связан с развитием тяжелых вирусных инфекций и инвазий, таких как гепатит В, гепатит С и гистоплазмоз [17]. Становится очевидным биологический смысл ольфакторного блока в образовании супружеских пар с двумя аллелями, детерминирующими иммунные нарушения и репродуктивные потери. Причем изменение фазы овариального цикла не отменяет этот блок.

Выводы

1. Представленное исследование показало отсутствие или компенсацию ольфакторного отбора по HLADRB1 как популяционного фактора динамики.

2. Парный анализ изменений частот комбинаций в зависимости от фазы овариального цикла женщины показал, что ольфакторное отталкивание по HLADRB1 превалирует над притягиванием по HLADRB1.

3. Выявлено стойкое и значимое отрицательно ассортативное сочетание женского HLADRB1*04 и

мужского HLADRB1*15, которые ассоциированы с различной репродуктивной и иммунной патологией.

Литература

1. Yamazaki, K. HLA-B transgenic mice reduce a unique odor type / K. Yamazaki, G. K. Beauchamp, J. Bard, E. Lacy, E. A. Boyse // *Behav Genet.* – 1990. – V. 20. – 755 p.
2. Doherty, P. C. Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex / P. C. Doherty, R. M. Zinkernagel // *Nature* – 1975. – V. 256 – P. 50-52.
3. Yamazaki, K. Recognition among mice evinced from the use of Y-maze differentially scented by congenic mice of different histocompatibility complex / K. Yamazaki, M. Yamaguchi, L. Baranoski, J. Bard, E. A. Boyse, L. Thomas // *J. Exp. Med.* – 1979. – V. 150. – P. 755.
4. Yamazaki, K. Sensory distinction between H-2b and H-2 bm1 mutant mice / K. Yamazaki, G. K. Beauchamp, I. K. Egorov, J. Bard, E. A. Boyse // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1983. – V. 80. – P. 5685–5688.
5. Thomas, L. Symbiosis as an immunologic problem / L. Thomas // *Basel: S. Karger.* – 1975. – P. 2 – 11.
6. Киндт, Т. Дж. Антигены главного комплекса гистосовместимости / Т. Дж. Киндт, М. Э. Робинсон // *Иммунология* / под ред. У. Пола. – М.: Мир, 1988. – Т. 2. – С. 73 – 116.
7. Wysocki, C. J. Mice (*Mus musculus*) lacking a vomeronasal organ can discriminate MHC-determined odortypes / C. J. Wysocki, K. Yamazaki, M. Curran, L. M. Wysocki, G. K. Beauchamp // *Horm. Behav.* – 2004. – V. 46. – № 3. – P. 241 – 246.
8. Wedekind, C. MHC-dependent mate preference in humans / C. Wedekind, T. Seebeck, F. Bettens, A. Paepke // *Proc. R. Soc. Lond. B.* – 1995. – V. 260. – P. 245 – 249.
9. Болдырева, М. Н. HLA и естественный отбор. Гипотеза «Преимущества функциональной гетерозиготности» / М. Н. Болдырева, Л. П. Алексеев // *Иммунология.* – М., 2006. – № 3. – С. 172 – 175.
10. Ober, C. HLA and mate choice in humans / C. Ober, L. R. Weitkamp, N. Cox, H. Dytch, D. Kostyu, S. Elias // *Am. J. Hum. Genet.* – 1997. – № 61. – P. 497 – 504.
11. Коненков, В. И. Медицинская и экологическая иммуногенетика / В. И. Коненков. – Новосибирск, 1999. – 276 с.
12. Шабалдин, А. В. Иммуногенетические аспекты раннего онтогенеза / А. В. Шабалдин: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Челябинск, 2004. – 44 с.
13. Schipper, R. F. HLA class II associations with Type 1 diabetesmellitus: a multivariate approach / R. F. Schipper, B. P. Koeleman, G. J. Bruining, G. M. Schreuder, W. Verduijn, R. R. Vries, B. O. Roep // *Tissue Antigens.* – 2001. – Vol. 57(2). – P. 144 – 50.
14. Zanelli, E. HLA class II association with rheumatoid arthritis: facts and interpretations / E. Zanelli, F. C. Breedveld, R. R. de Vries // *Hum. Immunol.* – 2000. – Vol. 61(12). – P.1254 – 61.
15. Petrone, A. Association of DRB1*04-DQB1*0301 haplotype and lack of association of two polymorphic sites at CTLA-4 gene with Hashimoto's thyroiditis in an Italian population / A. Petrone, G. Giorgi, C. A. Mesturino, M. Capizzi, I. Cascino, L. Nistico, J. Os, U. Di Mario, R. Buzzetty // *Thyroid.* – 2001. – Vol. 11(2). – P. 171 – 175.
16. Terasaki, P. I. US Normal. In HLA 1997 / P. I. Terasaki, D. W. Gjertson // *UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California.* – 1997. – 475 p.
17. Алексеев, Л. П. Иммуногенетическое обследование семей с близкородственными браками / Л. П. Алексеев, Н. М. Хаитова, Н. Г. Дмитриева, М. Н. Болдырева и др. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 1988. – № 31. – С. 60 – 62.

Рецензент – А. В. Будаев, ГОУ ВПО «Кемеровская медицинская академия Росздрава».