

КОНЦЕВАЯ ГАЛИНА ВЛАДИМИРОВНА

АКТИВАЦИЯ МУКОЗАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ЛЕГКИХ  
НЕИНФЕКЦИОННЫМИ СТИМУЛАМИ

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2014

Работа выполнена в лаборатории экологической генетики, ФГБУН «Институт цитологии и генетики» СО РАН, г. Новосибирск

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор  
**Мошкин Михаил Павлович**  
(ФГБУН «Институт цитологии и генетики» СО РАН,  
г. Новосибирск)

**Официальные оппоненты:**

Доктор медицинских наук  
**Колесникова Ольга Петровна**  
(ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН,  
г. Новосибирск)

Доктор биологических наук  
**Ходанович Марина Юрьевна**  
(ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский  
Томский государственный университет»,  
г. Томск)

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
Высшего профессионального образования «Санкт-  
Петербургский государственный университет»,  
г. Санкт-Петербург

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2014г. в \_\_\_\_\_ часов  
на заседании диссертационного совета Д 001.014.01 при ФГБУН Институт физиологии и  
фундаментальной медицины СО РАМН (630017, Новосибирск, ул. Тимакова, 4)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН Институт физиологии и  
фундаментальной медицины СО РАМН.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета Д 001.014.01  
к.б.н., доцент

И. И. Бузуева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Известно, что мукозальный иммунитет легких, представленный физическими барьерами и рядом гуморальных и клеточных механизмов, играет ключевую роль в распознавании и элиминации потенциально опасных для организма патогенов. К настоящему времени хорошо изучены механизмы защитного реагирования мукозального иммунитета легких на инфекционные стимулы. Однако недавно была показана активация мукозального иммунитета легких в ответ на сигналы, сопряженные с повышением инфекционных рисков, в частности рисков, связанных с размножением. Так, экспериментально доказано, что длительная экспозиция самцов лабораторных мышей запахом загрязненной подстилки половозрелых самок, как естественного источника половых феромонов, вызывает мобилизацию лейкоцитов в легкие (Литвинова и др., 2009; Litvinova et al., 2009). Это, в свою очередь, обеспечивает большую устойчивость к экспериментальной респираторной инфекции (Litvinova et al., 2010). Такая активация неспецифической иммунной защиты в ответ на социальные стимулы, предшествующие взаимодействию особи с потенциальными источниками инфекций, может иметь адаптивное значение как механизм, ограничивающий внутрипопуляционное распространение инфекции. Однако такой механизм будет иметь реальное адаптивное значение только при условии развития реакции за короткий промежуток времени.

Как известно, при ольфакторном исследовании запаховых меток ноздри мышей прямо соприкасаются с субстратом, что приводит к попаданию на поверхность слизистой носа субмикронных и наноразмерных частиц пыли и крупномолекулярных белковых молекул (Hurst, 1990a, 1990b; Aland and Bradley, 2003). Роль последних имеет ключевое значение для формирования социальной ольфакторной памяти (Hurst et al., 2001; Nevison et al., 2003). Если сигнальная роль содержащихся в моче белков семейства липокалинов активно исследуется, то значение твердых аэрозолей неорганической природы остается вне поля зрения. Вместе с тем, интерес к анализу их физиологических эффектов определяется не только решением проблем хемокоммуникации, но и проблемами нанобиобезопасности, значимость которой определяется загрязнением окружающей среды твердыми аэрозолями, в том числе наноразмерными частицами. И, поскольку респираторная система, начиная от носовой полости и далее, рассматривается в качестве основного органа мишени для наночастиц, то огромное число работ посвящено исследованию их провоспалительного эффекта в пределах легких, а также дальнейшего проникновения и распространения наноразмерных объектов в организме (Roursgaard et al., 2010; Chu et al., 2011; Borak et al., 2012; Panas et al., 2013). Несмотря на то, что доказательства провоспалительных эффектов наночастиц не вызывают сомнений, остаются практически неизученными генетически детерминированные особенности иммунного реагирования.

Клинический исход многих респираторных заболеваний зависит от генотипа животных, в частности от преобладания клеточного (Th1) или гуморального (Th2) типов иммунного ответа (Rosas et al., 2005; Paula et al., 2010). Этим могут определяться различные паттерны реагирования мукозального иммунитета легких на инфекционные стимулы (Mills et al., 2000; Watanabe et al., 2004). В связи с чем, можно предположить, что животные с разным генотипом будут по-разному реагировать и на неинфекционные стимулы, такие как половые хемосигналы самок и наночастицы. Поэтому один из вопросов, требующих решения, заключается в изучении реакций на неинфекционные стимулы у животных, характеризующихся преобладанием клеточного или гуморального иммунных ответов. Согласно данным литературы лабораторные мыши линий C57Bl и BALB/c относятся к типичным представителям животных с преобладанием Th1- и Th2-типов иммунного реагирования, что и предопределило выбор их в качестве объектов исследования.

Исходя из сказанного, **целью** диссертационной работы было изучение на самцах лабораторных мышей разных генетических линий особенностей реагирования мукозального иммунитета легких на неинфекционные стимулы - половые хемосигналы самок и наночастицы.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Исследовать нейроэндокринный ответ и реакцию мукозального иммунитета легких самцов лабораторных мышей на однократное предъявление половых хемосигналов самок;
2. Изучить особенности реагирования на контактное и дистантное воздействие половых хемосигналов у самцов двух линий лабораторных мышей, различающихся по типу иммунного ответа (BALB/c и C57Bl);
3. Оценить состояние мукозального иммунитета и эндокринной регуляции у самцов лабораторных мышей линий BALB/c и C57Bl при острой и хронической экспозиции наночастицами.

#### **Положение, выносимое на защиту**

Хемосигналы и наночастицы твердых аэрозолей, содержащиеся в мочевых метках самок мышей, являются значимыми сигнальными факторами для активации мукозального иммунитета и обеспечения, тем самым, защиты от инфекций, риск которых возрастает при ольфакторном поиске полового партнера.

#### **Научная новизна.**

В рамках данного исследования впервые было показано, что хемосигналы самок, как сигнал о повышении инфекционных рисков, связанных с размножением, вызывают мобилизацию лейкоцитов в легкие самцов лабораторных мышей уже через 2 часа после начала воздействия. Это имеет важное адаптационное значение, поскольку такая быстрая мобилизация неспецифической иммунной защиты способна значительно снизить риск инфицирования при поиске полового партнера. Таким образом, этот механизм можно рассматривать в качестве нового примера сигнальной адаптации. При этом впервые установлено, что активация мукозального иммунитета легких в ответ на половые феромоны самок зависит от генотипа самцов и более выражена у животных с преобладанием Th2-типа иммунного ответа. В отличие от воздействия таких стимуляторов неспецифической иммунной защиты как бактериальный липополисахарид, хемосигналы самок вызывают мобилизацию лейкоцитов в легкие без существенной активации провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ ) и ГГНС.

Впервые были получены данные о влиянии генотипа животных на иммунный ответ на наночастицы. Нами было показано, что самцы мышей с преобладанием Th1- или Th2-типов иммунного ответа проявляют различные паттерны реагирования на интраназальную аппликацию наночастиц оксида кремния. Так, у мышей линии BALB/c введение наночастиц вызывало активацию мукозального иммунитета легких, тогда как у мышей линии C57Bl повышалось количество лейкоцитов в крови. Эта реакция сопровождалась активацией ГГНС у обеих линий.

#### **Теоритическая и практическая значимость исследования**

Полученные данные о влиянии запаховых сигналов на иммуно-эндокринную функцию самцов могут найти применение при регламентации норм содержания лабораторных животных, используемых в иммунологических исследованиях, а также при профилактике респираторных инфекций у сельскохозяйственных животных. Данные о том, что животные с разным генотипом могут проявлять различную реакцию на неинфекционные стимулы, могут быть использованы при выборе объекта для исследований в нанотоксикологии. Следует отметить, что в принятых в Российской Федерации нормативных документах по оценке безопасности наноматериалов (Приказ № 280 от 12.10.2007) рекомендовано проводить токсикологические испытания на мышах линии C57Bl, которые по нашим данным практически не реагируют на интраназальное введение наночастиц. Кроме того, эти данные будут полезны при разработке критериев

индивидуальной восприимчивости рабочих к негативному влиянию наноразмерных аэрозолей производственной среды.

#### **Апробация работы**

Результаты работы были представлены на конференциях: XLV Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2007), XLVI Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2008), III (XXXV) Международная научно-практическая конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Образование, наука, инновации – вклад молодых исследователей» (Кемерово, 2008), XVI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2009» (Москва, 2009), IV (XXXVI) Международная научно-практическая конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Образование, наука, инновации – вклад молодых исследователей» (Кемерово, 2009), Second international school-conference “Applied nanotechnology and nanotoxicology” (Listvyanka, 2013), III Ежегодная конференция специалистов по работе с лабораторными животными (Новосибирск, 2013). Материалы диссертации были доложены на отчетной сессии ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, 2010).

#### **Публикации**

Материал диссертации представлен в 11 публикациях, в том числе в 4 статьях в отечественных (3) и зарубежных (1) реферируемых журналах.

#### **Объем и структура диссертации**

Содержание диссертации изложено на 134 страницах печатного текста. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования и условий постановки экспериментов, главы результатов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и указателя цитируемых источников литературы. Работа иллюстрирована 11 таблицами и 27 рисунками. Библиографический список включает 7 отечественных и 193 зарубежных источников.

#### **Личный вклад автора.**

Весь материал, представленный в диссертации, получен, обработан и проанализирован лично. Гистологические исследования препаратов легких выполнены совместно с профессором А.М. Зайдман. Содержание микроэлементов в органах мышей проведено в Аналитическом центре коллективного пользования Института геологии и минералогии им. Соболева СО РАН.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Работа была выполнена в 2008-2012 гг на базе Лаборатории экологической генетики млекопитающих ИЦиГ СО РАН. В ходе исследования по теме диссертационной работы было проведено пять экспериментов:

1. Исследование нейроэндокринного ответа и реакции мукозального иммунитета легких самцов на интраназальную аппликацию мочи самок и бактериального липополисахарида;
2. Иммуно-эндокринная реакция на интраназальное введение мочи самок и иммуногенных стимулов у самцов мышей, различающихся по типу иммунного ответа;
3. Иммуно-эндокринная реакция самцов на запах полового феромона (2,5-диметилпиразин) и мочи самок;
4. Реакция мукозального иммунитета легких и эндокринный ответ на интраназальную аппликацию суспензии нано-и микроразмерных частиц Таркосила 25;
5. Реакция мукозального иммунитета легких и эндокринный ответ на хроническую экспозицию аэрозолям наночастиц Таркосила 25 у самцов мышей, различающихся по типу иммунного ответа.

**Объект исследования.** Исследование проводили на аутбредных лабораторных мышах ICR и на двух инбредных линиях мышей BALB/c и C57Bl, характеризующихся преобладанием гуморального и клеточного типов иммунного ответа, соответственно.

Животных содержали при фотопериоде 12С: 12Т, температуре 22-24°C, свободном доступе к воде и корму. В экспериментах по исследованию эффектов хемосигналов самцы содержались изолированно от самок в комнатах с отдельной вентиляцией. Эксперименты 1 и 2 выполнены на конвенциональных животных. А эксперименты 3-5 на животных свободных от видоспецифических патогенов (specific pathogen free – SPF) в условиях “SPF вивария” ИЦиГ СО РАН. По окончании экспериментами SPF-статус был подтвержден вирусологическими и бактериологическими анализами.

**Препараты.** В качестве неинфекционных стимулов использовали мочу самок, как натуральный источник хемосигналов, и наночастицы диоксида кремния (Таркосил 25) производства ООО НПФ «Кварц». Мочу получали от 20 половозрелых самок в общую пробирку отдельно для каждой линии. Для интраназального введения мочу самок разводили в 5 раз физиологическим раствором. Запаховую экспозицию проводили при помощи перфорированных пластиковых контейнеров, в которые помещали ватные тампоны с нанесенными 100 мкл неразведенной мочи самок или 1% раствора ДМП. Суспензию Таркосила 25 (2 мг/мл) диспергировали ультразвуком, что позволяло получить частицы размером менее 100 нм. Объем препаратов во всех экспериментах по интраназальному введению был 25 мкл на животное. Экспозицию наноаэрозолем проводили в установке, разработанной в нашей лаборатории Д.В. Петровским.

**Методики.** Для подсчета лейкоцитов в тканях легких использовали гистологическое исследование препаратов. Для компьютерного анализа гистологических препаратов использовали систему анализа изображений, состоящую из микроскопа проходящего света «AxioStar+» (Carl Zeiss, Germany), компьютера Pentium IV IBM, цветной цифровой видеокамеры AxioCam (Carl Zeiss, Germany) и программы AxioVision 4.3. Общее число лейкоцитов и тромбоцитов в смывах легких, а также количество лейкоцитов в крови определяли на автоматическом гематологическом счетчике Hemascreeen 18P (Hospitex diagnostics, Italy). Концентрацию цитокинов в гомогенатах тканей легкого и гипоталамуса, а также в супернатантах БАЛ, концентрацию кортикостерона и тестостерона в плазме крови определяли иммуно-ферментным методом с помощью коммерческих наборов реагентов. Пероксидазную активность БАЛ определяли колориметрическим методом в реакции с тетраметилбензидином.

**Статистический анализ.** Результаты исследования представлены как  $M \pm SEM$ . Для нормально распределенных признаков использовали одно и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA). При ненормальном распределении использовали тест Краскела-Уоллеса. Множественное сравнение средних проводили на основе критерия – least significant differences (LSD). Для оценки достоверности различий между двумя средними использовали: при нормальном распределении тест Стьюдента, а при ненормальном распределении – тест Манна-Уитни. Для интеграции данных, отражающих комплексное реагирование отдельных систем организма на введение препаратов, использовали метод главных компонент.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### **Активация мукозального иммунитета легких у самцов лабораторных мышей в ответ на кратковременное воздействие хемосигналами самок**

Для проверки гипотезы о возможности быстрой мобилизации защитных механизмов мукозального эпителия легких в ответ на половые хемосигналы мы исследовали иммунные и эндокринные характеристики у самцов аутбредных мышей ICR через 2 часа после однократной интраназальной аппликации мочи половозрелых самок. В качестве позитивного контроля использовали ЛПС (50 мкг/кг). Оба стимула вызывали мобилизацию лейкоцитов в легкие, но в отличие от ЛПС, моча самок не вызывала повышения концентрации ИЛ-1 $\beta$  в легких и гипоталамусе. В ответ на ЛПС концентрация кортикостерона в плазме крови увеличивалась, а концентрация тестостерона, напротив,

снижалась, тогда как в ответ на мочу самок концентрация этих гормонов не изменялась (табл. 1).

Таким образом, моча самок обеспечивает эффективную мобилизацию лейкоцитов в легкие без развития стресс-реакции, что радикально отличается от эффектов ЛПС, вызывающего повышение ИЛ-1 в гипоталамусе и кортикостерона в крови.

Таблица 1

**Показатели иммуно-эндокринной реакции самцов через 2 часа после интраназального введения растворов, содержащих мочу самок, ЛПС, мочу самок и ЛПС одновременно**

Группа	Контроль	ЛПС	Моча самок	ЛПС+Моча самок
Число лейкоцитов на срез	1617,6±509,4 (7) <sup>B</sup>	4884,1±1321,5 (7) <sup>B</sup>	16830,7±5178,0 (6) <sup>A</sup>	13981,4±2774,6 (7) <sup>A</sup>
Концентрация ИЛ-1 $\beta$ в легких, пг/мг	162,5±27,1 (8) <sup>B</sup>	280,7±56,7 (10) <sup>A,B</sup>	169,6±32,3 (10) <sup>B</sup>	371,5±105,8 (10) <sup>A</sup>
Концентрация ИЛ-1 $\beta$ в гипоталамусе, пг/мг	0,0±0,0 (8)	223,9±171,3* (10)	59,7±35,2 (10)	87,6±58,9 (10)
Концентрация кортикостерона в плазме	75,2±15,8 (8) <sup>B</sup>	140,9±15,3 (10) <sup>A</sup>	75,1±17,7 (10) <sup>B</sup>	118,9±12,1 (10) <sup>A</sup>
Концентрация тестостерона в плазме	10,4±2,7 (8) <sup>A,B</sup>	4,9±2,3 (10) <sup>B</sup>	13,4±3,2 (10) <sup>A</sup>	7,3±2,3 (10) <sup>A,B</sup>

Примечание: Разные буквы показывают статистически значимые различия между группами (критерий наименьшей значимой разницы для логарифмированных значений,  $p < 0,05$ ). \*-  $p < 0,05$  по сравнению с контролем (Манн-Уитни  $U$ -тест).

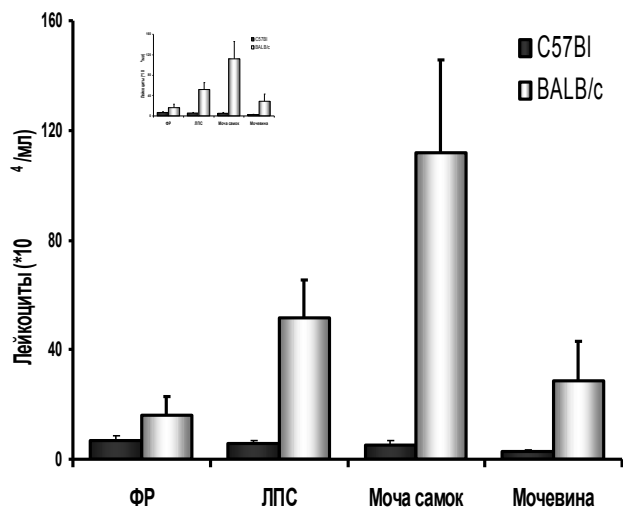
**Генетические особенности реагирования мукозального иммунитета легких на половые хемосигналы.**

Как известно, реакция на иммуногенные стимулы существенно различается у животных, характеризующихся преобладанием клеточного и гуморального иммунных ответов (Mills et al., 2000; Su et al., 2001; Watanabe et al., 2004). Особенности реагирования на контактное и дистантное предъявление хемосигналов самок исследовали в опытах на самцах двух инбредных линий мышей BALB/c и C57Bl. Для первой из них характерно преобладанием гуморального (Th2) типов иммунного ответа, а для второй клеточного ответа (Th1). В первом эксперименте самцам обеих линий интраназально вводили физиологический раствор, ЛПС, и мочу самок, в качестве полового хемосигнала. Величину лейкоцитарной интервенции в верхние дыхательные пути оценивали по числу иммунокомпетентных клеток в бронхоальвеолярных смывах. И моча самок, и ЛПС вызывали повышение количества лейкоцитов в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) у мышей линии BALB/c, но не у линии C57Bl (рис. 1).

Во втором эксперименте исследовали эффекты дистантной экспозиции запахом мочи самок и одним из феромонов самок 2,5-диметилпиразином (ДМП). Оба хемосигнала вызывали менее выраженную реакцию, по сравнению с интраназальным введением. Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что общее число лейкоцитов в БАЛ (табл. 2), подсчитанное через 24 часа после начала экспозиции самцов мышей запахами мочи и ДМП, не зависело ни от генотипа самцов ( $F_{1,39}=2,43$ ,  $p=0,13$ ), ни от запахового воздействия ( $F_{1,39}=0,89$ ,  $p=0,42$ ). Взаимодействие этих факторов также не было статистически значимым ( $F_{1,39}=1,10$ ,  $p=0,34$ ). Таким образом, оба воздействия не приводили к статистически значимой мобилизации лейкоцитов в легкие через сутки после начала экспозиции. Вместе с тем, пероксидазная активность, как показатель активации

гранулоцитов, значимо возростала в ответ на 24-часовую экспозицию запахом мочи самок у самцов линии BALB/c, но не у C57Bl (табл. 2).

Из полученных данных следует, что половые хемосигналы вызывают мобилизацию неспецифического иммунитета легких только у мышей, характеризующихся преобладанием гуморального иммунного ответа.



**Рис. 1.** Количество лейкоцитов в БАЛ самцов линии C57Bl (темные столбцы) и линии BALB/c (светлые столбцы) через 4 часа после интраназального введения препаратов: физиологический раствор (ФР), ЛПС, моча самок. Разными буквами над столбцами обозначены статистически различающиеся средние величины (критерий наименьшей значимой разницы для логарифмированных значений,  $p < 0,05$ ).

Таблица 2

**Общее число лейкоцитов и пероксидазная активность в БАЛ самцов мышей линий BALB/c и C57Bl при экспозиции запахом мочи самок и феромона самок 2,5-диметилпиразина (ДМП)**

Показатель	Линия	Контроль	Моча самок	ДМП
Лейкоциты *10 <sup>3</sup> /мл	BALB/c	49,7±7,7(7)	56,9±7,14(6)	43,8±4,5(7)
	C57Bl	49,2±7,9(6)	37,8±4,6(7)	38,5±6,7(6)
Пероксидазная активность, у.е./мкг	BALB/c	5,3±1,9(7) <sup>Б</sup>	10,9±1,9(7) <sup>А</sup>	3,8±1,2(7) <sup>Б</sup>
	C57Bl	3,1±0,5(6)	2,6±0,4(7)	2,7±0,9(6)

Примечание: разными надстрочными буквами обозначены средние значения, достоверно отличающиеся друг от друга ( $p < 0.05$ , критерий наименьшей значимой разницы).

#### **Реакция мукозального иммунитета легких на наночастицы у самцов лабораторных мышей, различающихся по типу иммунного ответа**

При интраназальной аппликации суспензии частиц Таркосила 25 число иммунокомпетентных клеток в БАЛ значимо возростало относительно контроля (38,1±4,8 (\*10<sup>3</sup>/мл)) только в ответ на частицы наноразмера (66,9±12,2 (\*10<sup>3</sup>/мл),  $p < 0.05$ , Т-тест Стьюдента) и только у самцов линии BALB/c, но не C57Bl. Микроразмерные частицы не вызвали значимых эффектов.

Для комплексной оценки реакции мукозального иммунитета на введение наночастиц данные о количестве лейкоцитов и тромбоцитов, пероксидазной активности и содержании цитокинов в БАЛ были проанализированы методом главных компонент (ГК). По исследованным признакам было выделено две ГК, объясняющих 53,3 % общей дисперсии (табл. 6). Статистически значимый вклад в ГК1 вносили все проанализированные цитокины, а также число лейкоцитов и тромбоцитов в БАЛ. Как известно, вошедшие в ГК1 ФНО $\alpha$ , ГМ-КСФ, ИЛ-12p70 секретируются активированными макрофагами, а ИЛ-4 базофилами и тучными клетками (Kleemann et al., 2008; Schneider, 2010). Поэтому данная компонента может быть принята в качестве интегральной характеристики воспалительной реакции, изменчивость которой определяется миграцией



лейкоцитов в легкие и повышением их цитокин-секретирующей способности. В ГК2, положительный вклад вносили ФНО $\alpha$  и пероксидазная активность, а отрицательный ИЛ-4 и ИЛ-12p70 (табл. 2). Эта компонента также отражает воспалительную реакцию. Но, в первую очередь, ту ее составляющую, которая обусловлена активацией гранулоцитарных лейкоцитов, продуцирующих пероксидазу. Участие ФНО $\alpha$  в повышении пероксидазной активности может быть опосредовано влиянием на нейтрофилы, эозинофилы и тучные клетки легочного эпителия (Belvisi et al., 2004).

Двухфакторный дисперсионный анализ ГК1 показал, что на изменчивость данного признака статистически значимо влияли линейная принадлежность животного ( $F_{1,36}=7.86$ ,  $p=0.008$ ) и взаимодействие факторов - генотип X введение Таркосила 25 ( $F_{2,36}=3.75$ ,  $p=0.03$ ). Собственный эффект интраназальной аппликации наноТ и микроТ был статистически незначим ( $F_{2,36}=1.70$ ,  $p=0.20$ ). У самцов линии BALB/c значения ГК1 были максимальными при аппликации наноТ и статистически значимо отличались от таковых при интраназальном введении физиологического раствора (контроль) или микроТ (рис. 2). При воздействии наноТ значения ГК1 у линии BALB/c превосходили соответствующие значения показателя у линии C57BL/6, у которых отсутствовали изменения ГК1 в ответ на введение Таркосила 25.

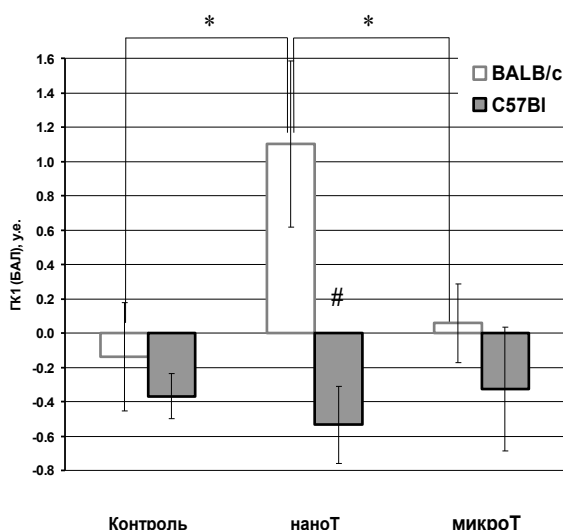
Для ГК2 не было выявлено статистически значимого влияния ни одного из анализируемых факторов: эффект генотипа -  $F_{1,36}=3.30$ ,  $p=0.08$ ; эффект аппликации препаратов -  $F_{2,36}=0.40$ ,  $p=0.67$ ; взаимодействие факторов -  $F_{2,36}=1.83$ ,  $p=0.18$ .

Таблица 2

**Вклад лейкоцитов, тромбоцитов, пероксидазной активности и концентрации цитокинов в главные компоненты (ГК) для показателей БАЛ**

Показатель	ГК1	ГК2
Лейкоциты в БАЛ	<b>0.758</b>	0.183
Тромбоциты в БАЛ	<b>0.453</b>	0.281
Пероксидазная активность	0.168	<b>0.517</b>
ИЛ-4	<b>0.622</b>	<b>-0.633</b>
ИЛ-12(p70)	<b>0.662</b>	<b>-0.639</b>
ГМ-КСФ	0.351	0.354
ФНО $\alpha$	<b>0.548</b>	<b>0.619</b>
Вклад в общую изменчивость, %	28.4	24.9

Примечание: жирным шрифтом выделены переменные, которые достоверно коррелировали со значениями ГК1 и ГК2.

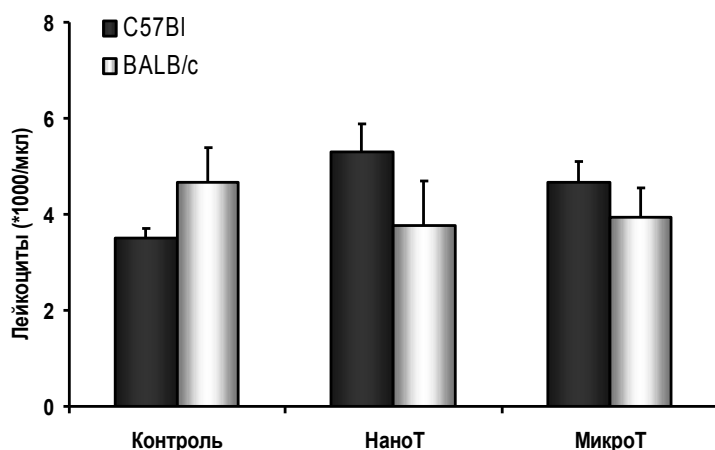


**Рис. 2.** Изменение ГК1, отражающей активацию воспалительных процессов в верхних дыхательных путях, у мышей линий BALB/c и C57BL в ответ на интраназальную аппликацию суспензий, содержащих наночастицы (наноТ < 100 нм и микроТ > 100 нм) Таркосила 25.

\* -  $p < 0.05$  (LSD тест);

# - различия между линиями статистически значимы ( $p=0.012$ ,  $df=13$ ,  $t=2.91$ , тест Стьюдента).

После интраназальной аппликации Таркосила 25 нано- и микро-размера самцам линии BALB/c общее количество лейкоцитов в крови практически не изменялось. Тогда как у самцов C57Bl, интраназальная аппликация наноТ приводила к статистически значимому росту общего числа лейкоцитов по сравнению с контролем, а микроТ лишь к тенденции роста (рис. 3).



**Рис. 3.** Общее количество лейкоцитов в крови самцов мышей линий BALB/c и C57Bl через 4 часа после интраназальной аппликации суспензии частиц Таркосила 25 наноразмера (наноТ) и микро-размера (микроТ). Разными буквами над столбцами обозначены статистически значимо различающиеся средние ( $p<0,05$ , критерий наименьшей значимой разности).

Как показал двухфакторный дисперсионный анализ, концентрация кортикостерона в плазме крови самцов зависела от генотипа ( $F_{1,52}=4,42$ ,  $p=0,04$ ) и введения Таркосила 25 ( $F_{1,52}=4,35$ ,  $p=0,02$ ). Поскольку эффект взаимодействия этих факторов не был статистически значимым ( $F_{1,52}=0,67$ ,  $p=0,51$ ), данные по обоим генотипам были объединены после предварительного центрирования относительно средних значений для каждой линии (рис. 4). Так, концентрация кортикостерона в крови самцов повышалась только в ответ на введение наноразмерных частиц Таркосила 25 (рис. 4).

**Рис. 4.** Остаточные дисперсии концентраций кортикостерона в плазме крови самцов линий BALB/c и C57Bl через 4 часа после введения наноТ и микроТ. Разными буквами над столбцами обозначены статистически значимо различающиеся средние величины ( $p<0,05$ , критерий наименьшей значимой разности).

Для изучения эффектов хронического воздействия наночастиц самцов мышей обеих линий экспонировали аэрозолем Таркосила 25 по 3 часа ежедневно в течение 10 дней. В качестве отрицательного контроля использовали дистиллированную воду. Для изучения проникновения и накопления наночастиц Таркосила 25 в тканях обонятельных луковиц, печени, почек, селезенки, семенников и сердца определяли содержание кремния методом атомно-абсорбционной и атомно-эмиссионной спектроскопии. Анализ данных показал, что содержание кремния повысилось в тканях обонятельных луковиц и почек экспонированных наноаэрозолем животных. При этом, в обонятельных луковицах содержание кремния было в 3,5 раза, а в почках только в 1,5 раза выше, чем у контрольных животных.

Среди исследованных показателей статистически значимые изменения были отмечены только для количества лейкоцитов в БАЛ. Их число не зависело от генотипа животных ( $F_{1,24}=3.23$ ,  $p=0.09$ ) и значимо возрастало в ответ на хроническую экспозицию

Таркосилом 25 ( $F_{1,24}=10.39$ ,  $p=0.004$ ). При этом в объединении результатов по обеим линиям в контроле было отмечено  $29,2 \pm 4,2 \cdot 10^3$  клеток БАЛ на мл, а после 10-кратной ингаляции наноаэрозолей Таркосила 25 –  $49,3 \pm 10,4 \cdot 10^3$  клеток БАЛ на мл ( $p=0.03$ , Т-тест Стьюдента).

### Обсуждение результатов

Внутривидовые взаимодействия между особями являются одним из основных путей межорганизменного обмена возбудителями респираторных заболеваний (Baker, 1998; Altizer et al., 2003; Hinson et al., 2004; Lanyon et al., 2007). Они неизбежны у видов с половым размножением. Поэтому следует ожидать, что реакция иммунной системы на различные социальные сигналы, предшествующие близким контактам особей одного вида, может иметь адаптивное значение, как механизм, ограничивающий внутривидовое распространение возбудителей респираторных заболеваний.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что длительная экспозиция самцов мышей запахом загрязненной подстилки самок приводит к мобилизации лейкоцитов в легкие (Литвинова и др., 2009; Litvinova et al., 2009). Защитная значимость такой мобилизации была подтверждена в экспериментах с заражением самцов мышей вирусом гриппа. Для 50-ти процентной смертности (ЛД 50) самцов мышей, получавших хемосигналы самок, требовалась в 30 раз большая доза вируса гриппа по сравнению с таковой у самцов, изолированных от запаха самок (Litvinova et al., 2010).

Для того чтобы мобилизация лейкоцитов в верхние дыхательные пути под влиянием социальных стимулов выполняла защитную функцию, она должна происходить достаточно быстро. Наши эксперименты с введением мочи самок, используемой в качестве источника хемосигналов, показывают, что уже через 2 часа после воздействия отмечается мобилизация лейкоцитов в легкие, которая по количеству клеток белой крови соответствует или даже превосходит реакцию, вызванную общепринятым индуктором воспаления бактериальным ЛПС. При сопоставимом с ЛПС влиянии на мобилизацию лейкоцитов, запаховые стимулы не приводят к повышению концентрации ИЛ-1 в тканях легкого и гипоталамуса. Поэтому их действие на механизмы неспецифического иммунитета легких не сопровождается активацией ГНС. В свою очередь, ЛПС сам по себе, а также в комбинации с мочой самок вызывает повышение концентрации кортикостерона и снижение концентрации тестостерона в крови. Эти цитокиновые и гормональные изменения типичны для реакции организма на интраназальное или внутрибрюшинное введение бактериального эндотоксина и других патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (Dunn, 1993; Tilders et al., 1994).

Известно, что реакция мукозального иммунитета легких на инфекционные стимулы зависит от генотипа животных, в частности от преобладания клеточного или гуморального иммунного ответа (Mills et al., 2000; Rosas et al., 2005; Paula et al., 2010). Поэтому для понимания роли и места активации неспецифической иммунной защиты в ответ на социальные стимулы важно понять, в какой мере характер этих реакций зависит от генотипа реципиентов социальных сигналов. Наши исследования, выполненные на генетических линиях мышей, характеризующихся преобладанием клеточного (C57Bl) или гуморального (BALB/c) типов иммунного ответа показали, что только у самцов BALB/c интраназальная аппликация мочи половозрелых самок вызывает статистически значимое увеличение числа лейкоцитов в БАЛ. Тогда как у мышей, характеризующихся преобладанием клеточного иммунного ответа, изменения были статистически незначимыми. Различия в реакции на иммуногенные стимулы имеют место и при введении бактериального ЛПС.

Для ответа на вопрос, в какой мере дистантное восприятие запаха может подействовать на иммунологические характеристики самцов, был поставлен эксперимент на двух линиях мышей BALB/c и C57Bl, в котором самцы были экспонированы запахом мочи самок и одним из половых феромонов самок - 2,5-диметилпиразином (ДМП).

Методика этого эксперимента исключала прямой контакт животных с источником запаховых сигналов (моча самок и ДМП), кроме того эксперимент был поставлен на животных, свободных от видоспецифических патогенов. У мышей линии BALB/c выявлена меньшая, чем в эксперименте с интраназальным введением мочи, реакция на запах половозрелых самок. В данном случае не наблюдалось статистически значимого увеличения числа лейкоцитов, но, судя по существенному увеличению пероксидазной активности в образцах БАЛ, хемосигналы самок вызывали активацию иммунокомпетентных клеток, входящих в состав мукозального слоя легких. У мышей линии C57Bl, как и в случае с интраназальной аппликацией, статистически значимой реакции в ответ на образцы запаха не установлено.

Итак, хемосигналы самок, которые оказывают стимулирующее влияние на половую функцию самцов, одновременно выступают в роли внутривидовых сигналов, «предупреждающих» об увеличении инфекционного риска, связанного с репродукцией. Этот риск относится не только к инфекциям, передающимся половым путем, но и к любым формам заражения, обусловленного контактом между особями одного вида (Altizer et al., 2003). Респираторные инфекции не являются исключением, поскольку самцы мышей в ответ на хемосигналы самок усиливают поисковую активность. Из полученных нами данных можно сделать заключение о комплексном влиянии хемосигналов на нейроэндокринные и иммунные процессы, протекающие в организме реципиентов сигналов. Наряду с хорошо изученным влиянием запаховых стимулов на эндокринную функцию гонад, в наших экспериментах наблюдалась активация отдельных звеньев иммунной защиты.

Следует отметить, что мы не можем полностью исключить бактериальный компонент в наблюдаемой реакции на интраназальное введение мочи самок. Но защитные эффекты запаховых стимулов совпадают с таковыми при воздействии иммуногенных компонентов бактерий только в отношении мобилизации лейкоцитов в верхние дыхательные пути. Тогда как, при введении ЛПС наблюдаются такие иммунофизиологические изменения как, повышение концентрации в легких и гипоталамусе провоспалительных цитокинов (Card et al., 2006; Tonelli et al., 2008), активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (Dunn, 1993; Tilders et al., 1994), подавление эндокринной функции гонад (Weil et al., 2006), развитие синдрома болезненного поведения (Zacharowski et al., 2006; Tonelli et al., 2008). В отличие от эффектов ЛПС или бактериальной инфекции, воздействие мочи самок или их хемосигналов вызывает мобилизацию лейкоцитов в легкие, но это происходит без участия одного из ключевых провоспалительных цитокинов ИЛ-1 и без активации физиологических механизмов стресса. Кроме того, эндокринная функция гонад либо не уменьшается, либо возрастает.

Среди неинфекционных стимулов для мукозального иммунитета легких заметное место отводится твердым аэрозолям, которые имеют различную природу и различные размеры. В данной работе были исследованы механизмы реакции мукозального иммунитета респираторной системы на интраназальную аппликацию или ингаляцию частиц Таркосила 25, который, будучи наполнителем различных красителей, производится в больших объемах. В эксперименте с интраназальной аппликацией, выполненном на мышцах линий C57Bl и BALB/c было установлено, что через 4 часа после введения суспензий, содержащих нано- и микроразмерные частицы Таркосила 25 (наноТ и микроТ) у мышей линии BALB/c повышалось содержание лейкоцитов в БАЛ. У линии C57Bl введение наночастиц не оказывало влияния на содержание клеток в БАЛ. Эти результаты хорошо согласуются с межлинейными различиями по реакции мукозального иммунитета легких на половые феромоны. И феромоны, и наночастицы вызывают мобилизацию иммунокомпетентных клеток в мукозальный слой легких только у генетической линии мышей, для которой характерно преобладание Th2-типа иммунного ответа. Для линии с преобладанием Th1-типа иммунного ответа статистически значимого прироста количества

клеток в БАЛ не наблюдали. Различия в лейкоцитарной реакции на интраназальное введение наноТ и микроТ сочетается с неодинаковым содержанием одного из ключевых факторов провоспалительной реакции – ФНО $\alpha$ . Хотя сама по себе концентрация цитокинов в БАЛ не показала статистически значимых изменений в ответ на введение наночастиц, при использовании многомерной статистики цитокины, лейкоциты и пероксидазная активность в БАЛ образуют комплекс, который можно охарактеризовать, как индикатор провоспалительных механизмов в ответ на действие частиц. При этом установлено, что наибольший эффект вызывают наноразмерные частицы и этот эффект имеет место только у мышей линии BALB/c. В отличие от иммунологических показателей БАЛ, лейкоциты в крови показывают статистически значимую реакцию на интраназальное введение наноТ и микроТ у мышей линии C57Bl, у которых отмечается повышение относительного числа средних лейкоцитов и гранулоцитов.

Как показывают наши данные, интраназальное введение наноразмерных частиц Таркосила 25 вызывает стрессовую реакцию, что выражается в повышении концентрации кортикостерона в плазме крови у мышей обеих линий. В целом наши данные согласуются с исследованиями других авторов, показавших, что интраназальное введение наночастиц активирует механизмы неспецифического иммунитета легких (Wang et al., 2008; Chen et al., 2008b; Ling et al., 2010). Но они также дополняют имеющиеся представления о патофизиологическом действии наночастиц данными о существенной роли генотипа в реакции на наночастицы. Наши данные показывают также, что однократное введение в носовую полость наночастиц вызывает активацию ГНС.

### **Заключение**

Таким образом, мукозальный слой легких, благодаря своим морфофункциональным характеристикам, находится в постоянном взаимодействии с параметрами окружающей среды и выполняет функцию барьера между кровяным руслом и присутствующими во вдыхаемом воздухе инфекционными и неинфекционными агентами. Как показали наши исследования, мобилизация иммунной защиты в мукозальном слое происходит под влиянием не только патогенов, но и социальных сигналов, предупреждающих о повышении рисков инфицирования. При этом хемосигналы самок активируют механизмы неспецифической иммунной защиты в мукозальном слое легких, но в отличие от ЛПС и наночастиц не оказывают стимулирующего влияния на секрецию провоспалительных цитокинов и не индуцируют развитие стресс-реакции. Еще одним неинфекционным фактором, влияющим на состояние мукозального барьера, являются твердые аэрозоли, которые присутствуют в атмосферном воздухе не только вследствие антропогенного загрязнения, но и при таких природных процессах, как извержения вулканов, пыльные бури, лесные пожары.

Сопоставляя паттерны реакции на неинфекционные стимулы разной природы можно отметить, что их эффекты совпадают только в отношении мобилизации лейкоцитов в легкие. Остальные звенья иммуно-эндокринного реагирования существенно различаются для ЛПС, хемосигналов и наночастиц, что говорит о специфичных для каждого иммуногенного стимула путях активации неспецифической иммунной защиты.

### **ВЫВОДЫ**

1. Контактное восприятие самцами мышей половых хемосигналов, моделируемое интраназальной аппликацией наиболее естественного запахового стимула – мочи половозрелых самок, вызывает быструю, в пределах двух часов, интервенцию

лейкоцитов в легкие, которая по количественным характеристикам не отличается от таковой при интраназальном введении ЛПС;

2. Сопоставимая по величине лейкоцитарная реакция на аппликацию мочи самок не вызывает наблюдаемого при введении ЛПС увеличения концентрации ИЛ-1 $\beta$  в тканях легкого и гипоталамуса и, соответственно, не сопровождается повышением уровня кортикостерона в плазме крови;

3. Сравнительное изучение реакции мукозального иммунитета легких мышей, характеризующихся преобладанием гуморального (линия BALB/c) или клеточного (линия C57Bl) иммунных ответов, показало, что интраназальная аппликация мочи самок или ЛПС вызывает повышение числа лейкоцитов и концентрации белка в бронхоальвеолярном лаваже только у самцов BALB/c и не влияет на эти показатели у самцов C57Bl. Вместе с тем, у самцов обеих линий имеет место более выраженное увеличение уровня кортикостерона в плазме крови при интраназальном введении ЛПС по сравнению с аппликацией мочи самок;

4. Изучение легочных смывов при 24 ч экспозиции запахом мочи самок показало, что дистантное восприятие половых хемосигналов не влияет на число лейкоцитов, но увеличивает пероксидазную активность в бронхоальвеолярном лаваже. Этот эффект наблюдается только у самцов линии BALB/c и отсутствует у линии C57Bl;

5. Суточная экспозиция одним из феромонов стресса (2,5-диметилпиразином) приводит к увеличению количества тромбоцитов в крови и бронхоальвеолярном лаваже, но только у самцов линии BALB/c, имевших изначально более низкое число тромбоцитов по сравнению с линией C57Bl;

6. Интраназальная аппликация суспензии наноразмерных частиц Таркосила 25 активирует у мышей линии BALB/c, но не C57Bl, воспалительные процессы, оцененные по полученному методом главных компонент интегральному показателю, значимый вклад в который вносили число лейкоцитов, тромбоцитов и концентрации провоспалительных цитокинов в бронхоальвеолярном лаваже. Субмикронные агрегации Таркосила 25 были не эффективны;

7. Многодневная ингаляция наноразмерных частиц двуокси кремния (Таркосил 25) приводит к увеличению числа лейкоцитов в бронхоальвеолярном лаваже мышей линий BALB/c и C57Bl и к разнонаправленным изменениям концентрации ФНО- $\alpha$  – повышению у линии BALB/c и понижению у линии C57Bl;

8. Оба типа неинфекционных стимулов (половые хемосигналы и наноразмерные твердые аэрозоли) вызывают более выраженную активацию неспецифической иммунной защиты верхних дыхательных путей у генетической линии мышей, характеризующейся преобладанием гуморального иммунного ответа (BALB/c), по сравнению с мышами, характеризующимися преобладанием клеточного ответа (C57Bl).

## СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*В изданиях, рекомендованных ВАК:*

1. Мошкин М.П., Пельтек С.Е., Герлинская Л.А., Горячкова Т.Н., **Концевая Г.В.**, Масленникова С.О., Попик В.В., Колчанов Н.А. Острая иммуно-физиологическая реакция мышечных тканей разных генотипов на поступление наночастиц SiO<sub>2</sub> (Таркосил 25) в верхние дыхательные пути // Российские нанотехнологии. 2011.
2. Герлинская Л.А., Масленникова С.О., Завьялов Е.Л., **Концевая Г.В.**, Мошкин М.П. Репродуктивный успех самцов аутбредной линии ICR при размножении на фоне антигенной стимуляции. // Онтогенез. 2012. 43(5). С. 357-
3. Moshkin M.P., **Kontsevaya G.V.**, Litvinova E.A., Gerlinskaya L.A. IL-1b-independent activation of lung immunity in male mice by female odor. // Brain, Behavior, and Immunity. 2013. №30. P. 150-155.
4. Цыбко А.С., Амстиславская Т.Г., **Концевая Г.В.**, Герлинская Л.А. Эффект длительной ингаляции наночастиц диоксида кремния (Таркосил 25) на экспрессию ключевых генов серотониновой системы в мозге мышечных тканей. // Российские нанотехнологии. 2014. 9(3-4). С. 94-99.

*В прочих изданиях*

5. **Концевая Г.В.**, Гармс А.И. Влияние запаха самок на иммуно-эндокринную реакцию самцов лабораторных мышечных тканей, вызванную интраназальным введением липополисахарида // Материалы XLV Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». Новосибирск. 2007. С. 15.
6. **Концевая Г.В.** Влияние запаха самок на иммуно-эндокринную реакцию и лейкоцитарную интервенцию у самцов лабораторных мышечных тканей при интраназальном введении липополисахарида // Материалы III (XXXV) международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Образование, наука, инновации – вклад молодых исследователей». Кемерово. 2008. С. 25.
7. **Концевая Г.В.** Влияние фазы эстрального цикла на эффективность иммунизации самок лабораторных мышечных тканей против вируса гриппа // Материалы XLVI Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». Новосибирск. 2008. С. 80.
8. **Концевая Г.В.** Влияние фазы эстрального цикла на эффективность иммунизации самок лабораторных мышечных тканей // Материалы XVI международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2009». Москва. 2009. С. 263.
9. **Концевая Г.В.** Взаимосвязь эффективности вакцинации с фазами эстрального цикла // Материалы IV (XXXVI) международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Образование, наука, инновации – вклад молодых исследователей». Кемерово. 2009. С. 33.
10. **Kontsevaya G.V.**, Petrovski D.V., Gerlinskaya L.A., Peltek S.E., Moshkin M.P. Immune and endocrine responses to Single intranasal application of nanoparticles and chronic nanoaerosol inhalation in BALB/c and C57Bl mice // Second international school-conference “Applied nanotechnology and nanotoxicology. Listvyanka. 2013. P. 71-72.

11. **Концевая Г.В.**, Ромащенко А.В. Иммунная и эндокринная реакция на наночастицы у видов с различной экологической специализацией // Материалы III ежегодной конференции специалистов по работе с лабораторными животными «RUS-LASA 2013». Новосибирск. 2013. С. 24.