

Влияние половых хемосигналов самок на мукозальный иммунитет легких у самцов мышей линий BALB/c и C57BL/6

Г.В. Концевая, Е.А. Литвинова, М.П. Мошкин

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

Реакция организма на иммуногенные стимулы во многом зависит от факторов, влияющих на тип развития иммунного ответа, таких как путь попадания в организм, цитокиновый фон, иммунный статус. Ранее было показано, что при попадании в верхние дыхательные пути самцов хемосигнальных молекул самок мышей в первую очередь происходит активация мукозального иммунитета, приводящая к повышению сопротивляемости животных респираторным инфекциям, что имеет важное приспособительное значение. Но активация мукозального иммунитета зависит от генетических особенностей иммунного реагирования. Мыши линий BALB/c и C57BL/6 характеризуются преобладанием гуморального (Th2) и клеточного (Th1) типов иммунного ответа соответственно и являются хорошей моделью для определения механизма активации мукозального иммунитета в ответ на хемосигналы самок. В опытах на самцах мышей линий BALB/c и C57BL/6 исследовали реакцию мукозального иммунитета респираторной системы на интраназальную аппликацию липополисахарида (ЛПС), раствора мочевины, физиологического раствора и мочи самок, используемой в качестве полового хемосигнала. Моча самок и ЛПС вызывали повышение количества лейкоцитов и концентрации белка в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) мышей линии BALB/c, но не линии C57BL/6, что свидетельствует о решающей роли иммунного ответа Th2-типа в активации мукозального иммунитета легких. При одинаковом влиянии на мукозальный иммунитет аппликация мочи самок вызывала существенно меньший подъем концентрации кортикостерона в плазме крови по сравнению с ЛПС. Таким образом, сигнальные механизмы защиты от инфекционных рисков, связанных с размножением, обеспечивают генотип-зависимую мобилизацию неспецифического иммунитета без существенной активации физиологических механизмов стресса.

Ключевые слова: половые хемосигналы самок; мукозальный иммунитет легких; преобладание иммунного ответа Th1- или Th2-типов; BALB/c; C57BL/6.

Effects of female sexual chemosignals on mucosal immunity in BALB/c and C57BL/6 male mice

G.V. Kontsevaya, E.A. Litvinova, M.P. Moshkin

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The immune response to immunogenic stimuli depends on various factors like cytokine context, way of entry, and immune status of the organism. In mice, female chemosignal entry into the male organism via the respiratory system causes activation of the mucosal immune response, which leads to the development of enhanced resistance to infections and is of adaptive value. However, the activation of mucosal immunity depends on the genetic predispositions of the immune response. BALB/c and C57BL/6 are prototypically Th2- and Th1-type mouse strains, respectively, therefore, they can serve as perfect model organisms for studying mechanism of lung mucosal immune activation in response to female chemosignals. Respiratory tract mucosal immune response to intranasal application of LPS, urea solution, saline and female urine used as a chemosignal was investigated in BALB/c and C57BL/6 male mice. Application of both female urine and LPS increased total white blood cell count and protein concentration in bronchoalveolar lavage fluid in BALB/c, but not in C57BL/6 male mice, suggesting an important role of Th2 pathway in lung mucosal immune response. At the same time, urine application provoked a significantly lower plasma corticosterone elevation than LPS. Thus, sexual signals associated with infection risks provide genotype-dependent mobilization of innate immunity without significant activation of physiological stress mechanisms.

Key words: female sexual chemosignals; lung mucosal immunity; Th1/Th2 immune balance; BALB/c; C57BL/6.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Концевая Г.В., Литвинова Е.А., Мошкин М.П. Влияние половых хемосигналов самок на мукозальный иммунитет легких у самцов мышей линий BALB/c и C57BL/6. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):704-707. DOI 10.18699/VJ15.123

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kontsevaya G.V., Litvinova E.A., Moshkin M.P. Effects of female sexual chemosignals on mucosal immunity in BALB/c and C57BL/6 male mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):704-707. DOI 10.18699/VJ15.123

ORIGINAL ARTICLE

Received 12.11.2015

Accepted for publication 14.12.2015

Online 20.12.2015

© AUTHORS, 2016

e-mail: mmp@bionet.nsc.ru

Ранее было показано, что экспозиция самцов мышей запахом половозрелых самок приводит к миграции иммунокомпетентных клеток в бронхоальвеолярное пространство (Литвинова и др., 2009; Litvinova et al., 2009; Moshkin et al., 2013), в результате чего повышается устойчивость к заражению вирусом гриппа (Litvinova et al., 2010). Иными словами, хемосигналы к размножению, с которым связан риск респираторных инфекций при ольфакторном поиске партнера, усиливают мукозальный иммунитет дыхательных путей. Но адаптивная значимость такой реакции может быть разной при преобладании клеточного (Th1) или гуморального (Th2) типов иммунного ответа. Как известно, Т-лимфоциты мышей линии C57BL/6 секретируют в основном цитокины, характерные для Th1-иммунного ответа, а мышей линии BALB/c – для Th2-ответа (Mills et al., 2000). Мыши Th1-типа характеризуются более высокой бактерицидной активностью макрофагов по сравнению с мышами, у которых доминирует Th2-ответ (Mills et al., 2000; Watanabe et al., 2004; Depke et al., 2014). При этом мыши линии C57BL/6 более устойчивы к некоторым респираторным инфекциям, чем мыши линии BALB/c (Paula et al., 2011; Shrivastava et al., 2015).

Неодинаковая восприимчивость линий C57BL/6 и BALB/c к респираторным инфекциям предполагает отличие в реакции этих генотипов на стимулы, мобилизующие мукозальный иммунитет. Действительно, интраназальная аппликация наночастиц двуокиси кремния вызывает более выраженную активацию мукозального иммунитета у мышей BALB/c, чем у C57BL/6 (Мошкин и др., 2011). Сравнительные исследования иммунных реакций у данных линий мышей представляют интерес не только для оценки вклада Th1- и Th2-реагирования в формирование защитных реакций, но и для выбора тест-объектов при экотоксикологических испытаниях.

Цель представленной работы – изучение межлинейных различий иммунного реагирования самцов линий C57BL/6 и BALB/c на половые хемосигналы самок, в качестве которых использовали обоснованный L.C. Drickamer (1984) метод интраназальной аппликации мочи.

Материалы и методы

Исследование выполнено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010) на мышах инбредных линий C57BL/6 (20 самцов и 10 самок) и BALB/c (17 самцов и 10 самок). В возрасте 10 нед самцов и самок рассаживали в индивидуально вентилируемые клетки (OptiMice): самцов – по одному, а самок – по пять. Температуру поддерживали на уровне 24 ± 1 °C; влажность – 40–50 %; световой режим – 14 ч день/10 ч ночь; корм и вода – *ad libitum*. После двухнедельного индивидуального содержания самцы мышей каждой из линий были поделены на четыре группы по четыре–шесть особей, за исключением группы из двух самцов линии BALB/c, экспонированных раствором мочевины.

Через 15 мин после наркотизации этиминалом натрия в дозе 40 мг/кг (внутрибрюшинное введение 200 мкл раствора) самцам первой группы интраназально апплицировали 25 мкл разведенной мочи самок, самцам из

второй группы – 25 мкл раствора ЛПС (*E. coli*, серотип 055:B5, Sigma, США, в дозе 50 мкг/кг); самцам третьей группы – 25 мкл раствора мочевины (Sigma, США) в концентрации 0,2 мг/мл, что соответствует концентрации мочевины в моче мышей, разведенной в пять раз. Самцам контрольной группы вводили 25 мкл физиологического раствора. Мочу для интраназального введения собирали от 10 половозрелых самок по 10–20 мкл в общую пробирку, тщательно перемешивали, замораживали и хранили при -20 °C. За день до начала эксперимента образцы мочи размораживали при комнатной температуре и разводили физиологическим раствором в пять раз.

Через 4 ч после введения препаратов животных умерщвляли методом краниоцервикальной дислокации и собирали образцы БАЛ, промывая легкие тремя порциями физиологического раствора объемом по 1 мл, через интравенозный катетер (KD Medical GmbH Hospital Products, Германия), введенный в трахею. Все три порции объединяли в одной центрифужной пробирке с градуированным объемом (TPP, Швейцария). Образцы БАЛ центрифугировали 5 мин при 2000 об/мин при $+4$ °C для осаждения клеток. Супернатант отбирали и определяли в нем концентрацию белка по методу Бредфорда. Подсчет клеток проводили в 300 мкл образца БАЛ. Осадок встряхивали для равномерного распределения клеток. Общее количество лейкоцитов подсчитывали в камере Горяева под микроскопом проходящего света Leica DM-1000 (Leica Microsystems, Германия) после окрашивания раствором Тюрка (Türk's solution, Merck, Германия). Количество клеток пересчитывали на 1 мл. Образцы крови брали из ретроорбитального синуса прижизненно через 4 ч после введения растворов, т. е. непосредственно перед краниоцервикальной дислокацией. Концентрацию кортикостерона определяли в плазме крови радиоиммунным методом, согласно протоколу к используемым антителам (Anti-Corticosterone, Sigma).

Данные количества лейкоцитов и концентрации белка в БАЛ, а также концентрации кортикостерона в плазме крови были предварительно логарифмированы, что позволило привести их вариационные ряды к нормальному распределению. Поэтому для выявления эффектов генотипа и введения препаратов на показатели количества лейкоцитов и концентрации белка в БАЛ и уровня кортикостерона в плазме крови использовали многофакторный дисперсионный анализ. При сравнении средних в двух группах животных по непараметрическому критерию Манна–Уитни использовали нелогарифмированные данные. Для множественного сравнения средних применяли LSD-тест.

Результаты и обсуждение

Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что на общее количество лейкоцитов в БАЛ (рис. 1, а) оказывали влияние генотип ($F_{1,36} = 84,88, p < 0,001$), введение растворов ($F_{1,36} = 4,76, p = 0,008$) и взаимодействие этих факторов ($F_{1,36} = 5,54, p = 0,004$). Число лейкоцитов в БАЛ значимо повышалось в ответ на введение ЛПС и мочи самок по сравнению с группой, получавшей физиологический раствор, только у самцов линии BALB/c. У самцов линии C57BL/6 их число не изменялось. Введение раство-

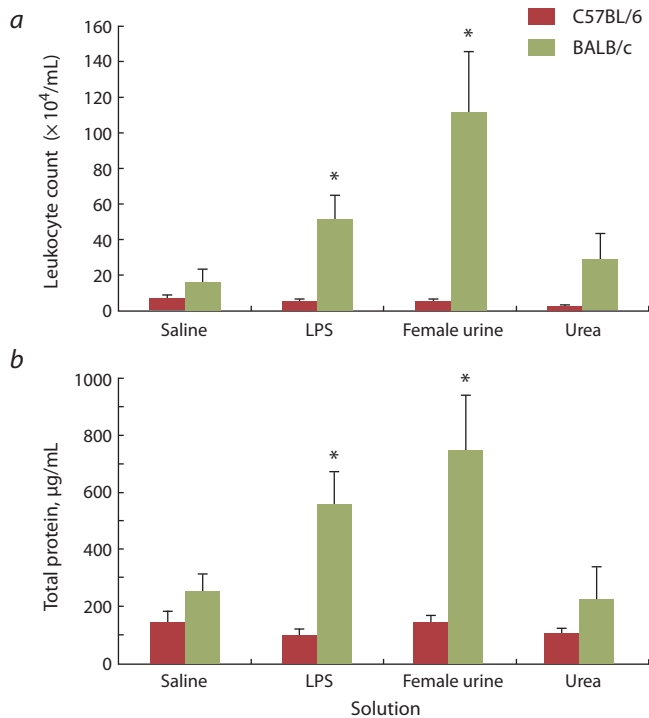


Fig. 1. Leukocyte count (a) and total protein concentration (b) in BAL from C57BL/6 (red columns) and BALB/c (green columns) male mice four hours after intranasal application of saline, LPS, female urine, or urea solution.

* $p < 0.05$ compared to control; Mann–Whitney U-test.

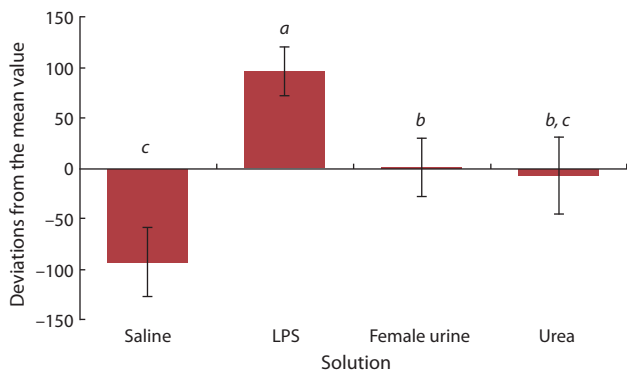


Fig. 2. Plasma corticosterone concentrations (residual dispersions) in male mice four hours after intranasal application of saline, LPS, female urine, or urea solution. Different letters above column show statistically significant differences of the means ($p < 0.05$; LSD test).

ра мочевины не влияло на количество лейкоцитов в БАЛ у мышей обеих линий.

Концентрация белка в БАЛ (рис. 1, б) также зависела от генотипа самцов мышей ($F_{1,36} = 39,34, p < 0,001$) и от введения растворов ($F_{1,36} = 3,23, p = 0,04$). Эффект взаимодействия факторов «генотип» и «введение растворов» был близким к статистически значимому ($F_{1,36} = 2,7, p = 0,06$).

Введение ЛПС и мочи самок вызывало повышение концентрации белка в БАЛ по сравнению с контролем только у самцов мышей линии BALB/c. У самцов линии C57BL/6 концентрация белка в БАЛ в ответ на эти стимулы не изменялась. Введение мочевины не влияло на уровень белка у мышей обеих линий.

Таким образом, интраназальная аппликация ЛПС вызывала увеличение числа лейкоцитов и концентрации белка в БАЛ только у самцов линии BALB/c, для которых характерно преобладание Th2-типа иммунного ответа, но не влияла на эти показатели у животных линии C57BL/6. Это можно объяснить тем, что Th2-цитокины индуцируют экспрессию селективных хемокинов, которые усиливают направленную миграцию лейкоцитов из кровотока в очаг воспаления, тогда как Th1-цитокины подавляют их продукцию (Bonocchi et al., 1998; Tellem et al., 2000). Межлинейные различия в реакции мукозального иммунитета дыхательных путей, установленные по отношению к ЛПС, были полностью воспроизведены при использовании в качестве иммуномодулирующего стимула половых хемосигналов. Причем величина лейкоцитарной и белковой реакции на аппликацию мочи была сопоставима с таковой в ответ на интраназальное введение бактериального эндотоксина.

Как следует из наших экспериментов, реакция мукозального иммунитета мышей линии BALB/c на аппликацию мочи не связана с раздражающим действием мочевины, введение которой не влияло на количество лейкоцитов и концентрацию белка в БАЛ. Это хорошо согласуется с полученными ранее результатами, из которых следует, что запах загрязненной подстилки из клеток с половозрелыми самками стимулирует у самцов мышей миграцию лейкоцитов в бронхоальвеолярное пространство даже при отсутствии прямого контакта с источником запаховых стимулов (Литвинова и др., 2009; Litvinova et al., 2009, 2010).

На концентрацию кортикостерона в плазме крови достоверное влияние оказывали генотип животных ($F_{1,37} = 4,26, p = 0,048$) и введение растворов ($F_{1,37} = 6,48, p = 0,002$). Взаимодействие этих факторов не было статистически значимым ($F_{1,37} = 0,78, p = 0,51$). Так как взаимодействие факторов не вносило существенного вклада в дисперсию анализируемого признака, то для оценки влияния растворов данные по обоим генотипам были объединены после их предварительного центрирования относительно средних значений для каждой линии мышей. Из анализа остаточных дисперсий видно, что введение ЛПС вызывало максимальный подъем концентрации кортикостерона в плазме крови (рис. 2). При интраназальной аппликации мочи и мочевины уровень глюкокортикоидов был ниже, чем при аппликации ЛПС.

Хорошо известно, что бактериальный эндотоксин активирует не только неспецифическую иммунную систему, но и механизмы стресс-реакции (Tonelli et al., 2008). Однако именно в этом компоненте реагирования выявлены существенные отличия ЛПС и запаховых стимулов. При одинаковом влиянии на мукозальный иммунитет аппликация мочи самок вызывала существенно меньший подъем концентрации кортикостерона в плазме крови по сравнению с ЛПС. Такой же подъем уровня глюкокортикоидов

был отмечен и при интраназальном введении раствора мочевины. При сопоставлении полученных данных с результатами экспериментов, в которых было исследовано дистантное действие запаха самок на иммунные и эндокринные характеристики самцов, можно заключить, что половые хемосигналы стимулируют миграцию лейкоцитов в бронхоальвеолярное пространство, а мочевина, попадающая в верхние дыхательные пути при аппликации мочи самок, в большей степени отвечает за наблюдаемую в этом случае умеренную стресс-реакцию.

Итак, хемосигналы самок, содержащиеся в моче, вызывают активацию механизмов мукозального иммунитета респираторной системы у самцов, но в отличие от эффектов ЛПС эта реакция сопровождается меньшим стрессорным эффектом. Выраженность запаховой иммуномодуляции зависит от генотипа животных, определяющего разный уровень восприимчивости к респираторным инфекциям. Активация мукозального иммунитета более выражена у мышей линии BALB/c, которые характеризуются генетически детерминированным преобладанием реакции Т-хелперов второго типа (Mills et al., 2000; Watanabe et al., 2004). У мышей линии C57BL/6, которые конститутивно более устойчивы к респираторным инфекциям, мукозальная реакция на сигнальные иммуномодуляторы практически отсутствует. Полученные данные служат еще одним обоснованием необходимости учета генетических особенностей иммунного реагирования при исследовании реакций организма на иммуностимулирующие аэрозоли, включая наночастицы и разные виды аллергенов.

Acknowledgments

The experimental work was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0004. The statistical evaluation and discussion were supported by the Russian Science Foundation, project 14-14-00221.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Bonecchi R., Sozzani S., Stine J.T., Luini W., D'Amico G., Allavena P., Chantry D., Mantovani A. Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses. *Blood*. 1998;92(8):2668-2671.

- Depke M., Breitbach K., Dinh Hoang Dang K., Brinkmann L., Salazar M.G., Dhople V.M., Bast A., Steil L., Schmidt F., Steinmetz I., Völker U. Bone marrow-derived macrophages from BALB/c and C57BL/6 mice fundamentally differ in their respiratory chain complex proteins, lysosomal enzymes and components of antioxidant stress systems. *J. Proteomics*. 2014;103:72-86.
- Drickamer L.C. Urinary chemosignals from mice (*Mus musculus*): Acceleration and delay of puberty in related and unrelated young females. *J. Compar. Psychol.* 1984;98(4):414-420.
- Iellem A., Colantonio L., Bhakta S., Sozzani S., Mantovani A., Sinigaglia F., D'Ambrosio D. Inhibition by IL-12 and IFN-alpha of I-309 and macrophage-derived chemokine production upon TCR triggering of human Th1 cells. *Eur. J. Immunol.* 2000;30(4):1030-1039.
- Litvinova E.A., Garms A.I., Zaidman A.M., Korel A.V., Gerlinskaya L.A., Moshkin M.P. Re-distribution of immune defense in male mice exposed by female scent. *Zhurnal obshchey biologii = Journal of General Biology*. 2009;70(1):46-55. (in Russian)
- Litvinova E.A., Goncharova E.P., Zaydman A.M., Zenkova M.A., Moshkin M.P. Female scent signals enhance the resistance of male mice to influenza. *PLoS ONE*. 2010;5(3):e9473. DOI 10.1371/journal.pone.0009473.
- Litvinova E.A., Moshkin M.P., Gerlinskaya L.A., Nagatomi R., Zhang X., Matsuo K., Shikano S. Female scent mobilizes leukocytes to airways in BALB/c male mice. *Integr. Zool.* 2009;4:285-293.
- Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* 2000;164(12):6166-6173.
- Moshkin M.P., Kontsevaya G.V., Litvinova E.A., Gerlinskaya L.A. IL-1β-independent activation of lung immunity in male mice by female odor. *Brain Behav. Immun.* 2013;30:150-155.
- Moshkin M.P., Peltek S.E., Gerlinskaya L.A., Goryachkovskaya T.N., Kontsevaya G.V., Maslennikova S.O., Popik V.V., Kolchanov N.A. Acute immune response to the intranasal application of nanoparticles of SiO₂ (Tarkosil 25) in mice of two strains. *Rossiyskie nanotekhnologii = Russian Nanotechnology* 2011;6(9/10):47-54. (in Russian)
- Paula M.O., Fonseca D.M., Wolk P.F., Gembre A.F., Fedatto P.F., Sérgio C.A., Silva C.L., Bonato V.L. Host genetic background affects regulatory T-cell activity that influences the magnitude of cellular immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunol. Cell Biol.* 2011;89(4):526-534.
- Shrivastava P., Watkiss E., van Drunen Littel-van den Hurk S. The response of aged mice to primary infection and re-infection with pneumonia virus of mice depends on their genetic background. *Immunobiology*. 2016;221(3):494-502.
- Tonelli L.H., Holmes A., Postolache T.T. Intranasal immune challenge induces sex-dependent depressive-like behavior and cytokine expression in the brain. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33(5):1038-1048.
- Watanabe H., Numata K., Ito T., Takagi K., Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock*. 2004;22(5):460-466.