

**ВОЗДЕЙСТВИЕ ИММУНИЗАЦИИ ЧУЖЕРОДНЫМИ БЕЛКАМИ НА
АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ТИМОЦИТОВ И СПЛЕНОЦИТОВ У
КРЫС**

Савельев Р. В. ¹,

Скупневский С. В. ¹

¹ ФГОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова», Владикавказ, Россия.

**THE EFFECT OF IMMUNIZATION WITH FOREIGN PROTEINS ON THE
ACTIVITY OF MITOCHONDRIA IN RAT THYMOCYTES AND
SPLENOCYTES**

Saveljev R. B. ^a,
Skupnevskii S. B. ^a

^a North Ossetian State University, Russian Federation.

Резюме

Исследование клеточного метаболизма при формировании иммунологической памяти остаётся актуальным, поскольку может углубить знания о патогенезе иммуновоспалительных заболеваний и стать основой для повышения эффективности их профилактики и лечения.

Цель: изучить активность митохондрий тимоцитов и спленоцитов на фоне иммунизации крыс человеческим альбумином.

Материалы и методы. Самцов крыс линии *Wistar* массой тела 360-380 г иммунизировали в течение 4 дней путём внутрибрюшинного введения раствора человеческого альбумина (суммарное количество введенного белка составило 135 мг). Через 24 часа после последней инъекции оценивали гематологические параметры (общий анализ крови, «Abacus 5 Vet») и метаболическую активность митохондрий тимоцитов и спленоцитов - по флуоресценции накопленного клетками родамина 6 G на системе визуализации «Evos M7000» в режиме RFP. Массовые коэффициенты тимуса и селезенки рассчитывали относительно массы тела животных (г/кг). Статистический анализ включал расчет медианы, верхнего и нижнего квартилей; сравнение гипотез проводилось по *U*-критерию Манна-Уитни, а корреляционный анализ осуществляли по Пирсону.

Результаты. У животных опытной группы выявлена гипертрофия тимуса - на 56,9 %, $p = 0,032$; изменений массы селезенки выявлено не было. Снижение митохондриальной флуоресценции в тимоцитах (на 23,5 %, $p=0,037$) и в спленоцитах (на 13,7 %, $p=0,548$) может быть связано с иммуносупрессивным воздействием трансформирующего фактора роста бета в процессе неоднократного введения чужеродного белка. При этом у экспериментальных крыс был выявлен моноцитоз (превышение контроля на 59,4 %, $p=0,030$) и тромбоцитопения (на 20,8 %, $p=0,045$), что отражает реактивные изменения, протекающие при иммунизации.

Заключение. Иммунизация животных уже на ранних стадиях сопровождается ингибированием энергообмена в клетках тимуса и селезенки, что может раскрывать особенности воздействия медиаторов воспаления на митохондрии лимфоцитов, определяя перспективные мишени для терапии иммуновоспалительных патологий.

Ключевые слова: иммунизация, метаболизм митохондрий, лимфоциты, спленоциты, тимоциты, человеческий альбумин.

Abstract

The study of cellular metabolism in the formation of immunological memory is still relevant, as it can help to deepen our knowledge about the pathogenesis of immune-inflammatory diseases and provide a basis for improving their prevention and treatment.

The aim of this study is to investigate the activity of mitochondria in thymocytes and splenocytes after immunization of rats with human albumin.

Materials and methods. Male Wistar rats were immunized with human albumin for 4 days. The total amount of protein injected was 135 mg. Twenty-four hours after the last injection, we evaluated hematological parameters (general blood test) and mitochondrial activity of thymocytes and splenocytes using rhodamine 6 G fluorescence on the Evos M7000 imaging system in RFP mode. We also calculated the mass coefficients of the thymus and spleen relative to the body weight of the animals. Statistical analysis included calculation of the median, upper and lower quartiles, and comparisons of hypotheses using the Mann-Whitney U-test and correlation analysis according to Pearson's method.

Results. Hypertrophy of the thymus was detected in animals of the experimental group by 56.9%, $p=0.032$, and no changes in the mass of the spleen were observed. A decrease in mitochondrial fluorescence in thymocytes by 23.5% ($p=0.037$) and splenocytes by 13.7% ($p=0.548$), may be associated with the immunosuppressive effect of transforming growth factor beta during repeated administration of a foreign protein. At the same time, monocytosis exceeding the control by 59.4% ($p=0.030$), and thrombocytopenia by 20.8% ($p=0.045$), were observed in experimental rats, reflecting reactive changes occurring during immunization. **Conclusion.** Immunization of animals at the early stages is accompanied by inhibition of energy exchange in cells of the thymus and spleen. This may reveal features of the effect of inflammatory mediators on mitochondria of lymphocytes and identify promising targets for treatment of immuno-inflammatory pathologies.

Keywords: immunization, mitochondrial metabolism, lymphocytes, splenocytes, thymocytes, human albumin.

1 Введение

Процесс искусственной и естественной иммунизации основан на созревании и дифференцировке различных субпопуляций лимфоцитов в центральных и периферических органах иммунной системы. Так, в тимусе происходит формирование Т-лимфоцитов, участвующих в распознавании и элиминации эндо- и экзоантигенов, а также - в ко-стимуляции клеток врожденного иммунитета [1]. Селезенка является одним из основных центров продукции антител, облегчающих иммунный ответ путем опсонизации патогенов и активации системы комплемента. При этом функциональная активность клеток и органов иммунной системы напрямую связана с активностью митохондрий [6]. В работе М. Warren и соавт. [7] было установлено, что в условиях геморрагического шока мембранный потенциал митохондрий спленоцитов снижается примерно на 25 %. Наравне с клеточным стрессом реакции на чужеродные агенты и цитокины также модифицируют биоэнергетический статус иммуноцитов [5]. Таким образом, исследования энергетического метаболизма центральных и периферических органов иммунной системы остаются актуальными, поскольку могут расширить спектр знаний о патогенезе иммуновоспалительных заболеваний для повышения эффективности их профилактики и лечения.

Цель: изучить активность митохондрий тимоцитов и спленоцитов на фоне иммунизации крыс человеческим альбумином.

2 Материалы и методы

В исследовании были использованы крысы линии *Wistar* – самцы с массой тела 360-380 г (питомник: филиал НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ - ПЛЖ «Рапполово»). Статистические группы: «Контроль» и «Опыт» – включали по 8 животных в каждой. Экспериментальным животным внутрибрюшинно вводили по нарастающей концентрации раствор человеческого альбумина (раствор для инфузий 25 %, Уман Альбумин, Италия). Иммунизацию проводили каждые 24 часа в течение 4 суток - суммарное количество введенного белка составило 135,0 мг, контрольными животным вводили растворитель (физиологический раствор) в тех же объемах. На следующий день после последней иммунизации под общей анестезией (внутрибрюшинное введение «Золетила», Франция) животных взвешивали и из сердца отбирали кровь, которую стабилизировали гепарином («Диамедфарма», Россия), конечная концентрация которого составляла 50 МЕ/мл. Гематологический анализ проводили на автоматическом анализаторе Abacus 5 Vet (Австрия). После эвтаназии путем цервикальной дислокации, крыс подвергали некропии и рассчитывали массовые коэффициенты органов (МКО) - тимуса и селезенки, по формуле:

$$МКО = \frac{\text{Масса органа (г)}}{\text{Масса животного (кг)}}.$$

Образцы селезенки и тимуса измельчали при 20 °С в стеклянном гомогенизаторе в 7 мл 3,0 % человеческого альбумина, приготовленного на среде 199 с добавлением солей Эрла и глутамина (ПанЭко, Россия). Полученную суспензию клеток фильтровали через капрон и центрифугировали 5 минут при 1500 об./мин, супернатант удаляли, к осадку в приливали 3,0 % альбумина, приготовленного на фосфатном буфере с рН 7,4 (ФБ), и ресуспендировали. Затем клетки термостатировали 10 минут при 37±0,2 °С. Из клеточной суспензии отбирали аликвоту 250 мкл и окрашивали раствором родамина 6 G (в конечной концентрации 40 нмоль/л) при той же температуре в течение 25 минут. Затем полученную смесь разбавляли 1:1 раствором 3,0 % альбумина на ФБ и центрифугировали 5 минут при 1500 об./мин. Из осадка отбирали 5 мкл клеточной массы и готовили мазки на гематологическом семплере V-Sampler (Австрия), высушивали на воздухе и анализировали при помощи системы визуализации «Evos M7000» (Thermo Fisher Scientific, США) в режиме RFP при 400-кратном увеличении - на образец органа каждой крысы было сделано 312 микрофотографий, содержащих в среднем по 50 клеток на каждом снимке. При анализе подбирали настройки изображения индивидуально к каждому органу, принимая во внимание оптимальные соотношения по экспозиции и интенсивности свечения. Данные параметры оставались неизменными для всех измерений. Определяли среднюю клеточную флуоресценцию (I) и рассчитывали митохондриальную флуоресценцию (М.Ф.) по формуле:

$$\text{М.Ф. (y. e.)} = \frac{I \times S_I}{100},$$

где S_I – средняя площадь свечения; 100 - эмпирический коэффициент, облегчающий анализ и интерпретацию полученных цифр.

Статистический анализ проводили в программном пакете Excel, рассчитывая медиану (Me), верхний и нижний квартили (C₂₅-C₇₅). Сравнение гипотез проводили по U-критерию Манна-Уитни с помощью онлайн калькулятора (https://www.statskingdom.com/170median_mann_whitney.html); статистически значимыми считали результаты при p<0,05. Корреляционный анализ проводили по критерию Пирсона.

3 Результаты

В ходе исследования было установлено изменение активности митохондрий тимоцитов и спленоцитов вследствие иммунизации животных чужеродным белком (табл. 1).

При некропии иммунизированных животных был установлен статистически значимый прирост массовых коэффициентов тимуса (на 56,9 %, p = 0,032); в селезенке изменений массы выявлено не было. Выраженное снижение митохондриальной флуоресценции в тимоцитах (на 23,5 %, p=0,037), опосредованной накоплением родамином 6 G, может отражать

иммуносупрессивное воздействие трансформирующего фактора роста бета (TGF- β) на дифференцировку Т-лимфоцитов при иммунизации альбумином. При этом указанный цитокин пролонгирует пребывание лимфоцитов в тканях, что, вероятно, приводит к увеличению тимуса [4]. Аналогичная тенденция к уменьшению активности митохондрий в селезенке (на 13,7 %, $p=0,548$) может быть связана с преобладающим количеством Т-лимфоцитов в общем числе лимфоидных клеток органа [2], которые также подвержены регулируемому воздействию TGF- β .

По результатам гематологического исследования (табл. 2) были выявлены определенные изменения в системе крови у экспериментальных животных.

Статистически значимое снижение концентрации гемоглобина и его среднего содержания в эритроцитах у экспериментальных крыс может свидетельствовать об анемии воспаления вследствие иммунизации [8]. Выявленные широкий диапазон значений содержания лейкоцитов, моноцитоз (увеличение на 59,4 %, $p=0,030$) и тромбоцитопения (снижение на 20,8 %, $p=0,045$) у экспериментальных животных являются признаками развития иммунопатологического состояния [3]. При этом отмечена сильная корреляционная связь между концентрацией гемоглобина и митохондриальной флуоресценцией тимоцитов ($r_{xy} = 0,82$), выявляющая внутренние механизмы, связывающие воспаление (с секвестрацией железа из крови) и метаболизм клеточного звена иммунной системы.

4 Заключение

В условиях антигенной нагрузки на организм чужеродным белком тимус выступает одним из основных органов-мишеней, остро реагирующим увеличением относительной массы и снижением энергетического профиля тимоцитов. Это определяет целесообразность дальнейшего изучения роли метаболического статуса митохондрий в дифференциальной диагностике и разработке новых подходов таргетной терапии иммуновоспалительных заболеваний.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Показатели массовых коэффициентов и активности митохондрий тимуса и селезенки у крыс.

Table 1. Indicators of mass coefficients and activity of mitochondria of the thymus and spleen in rats.

Параметр Parameter	Стат. Показатели Stat. indicators	Контроль Control	Опыт Experience
Селезенка Spleen			
МКО, г/кг ОМС, g/kg	Me (C ₂₅ -C ₇₅)	2,13 (2,12-2,94)	2,11 (1,95-2,42)
М.Ф. (y.e) M.F. (c.u)	Me (C ₂₅ -C ₇₅)	214,27 (212,67-223,49)	185,00 (182,58-228,89)
Тимус Thymus			
МКО, г/кг ОМС, g/kg	Me (C ₂₅ -C ₇₅)	0,65 (0,63-0,85)	1,02 (0,89-1,04)*
М.Ф. (y.e) M.F. (c.u)	Me (C ₂₅ -C ₇₅)	491,64 (469,84-517,18)	376,31 (326,69-380,45)*

Примечание: МКО - массовые коэффициенты органа; М.Ф. - митохондриальная флуоресценция; Me - медиана; (C₂₅-C₇₅) - верхний и нижний квартили; *-p<0,05

Note: OMC - organ mass coefficients; M.F. - mitochondrial fluorescence; Me - median; (C₂₅-C₇₅) - upper and lower quartiles; *-p<0.05

Таблица 2. Результаты гематологического исследования крыс.

Table 2. Results of hematological study of rats.

Параметр Parameter	Стат. показатели Stat. indicators	Контроль Control	Опыт Experience
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/l	Me (C ₂₅ -C ₇₅)	15,05 (15,00-15,18)	13,80 (13,65-13,95)*
Гематокрит, % Hematocrit, %	Me (C ₂₅ -C ₇₅)	45,92 (45,64-46,43)	46,77 (42,34-50,80)
Эритроциты, ×10 ¹² /л Red blood cells, ×10 ¹² /л	Me (C ₂₅ -C ₇₅)	9,00 (8,87-9,00)	8,94 (8,84-9,24)
Средний объем эритроцита, фл Average erythrocyte volume, fl	Me (C ₂₅ -C ₇₅)	52,50 (51,25-53,00)	51,50 (47,75-54,50)
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг Average hemoglobin content in an erythrocyte, pg	Me (C ₂₅ -C ₇₅)	17,10 (17,00-17,58)	15,60 (15,33-16,10)**
Тромбоциты, ×10 ⁹ /л Platelets, ×10 ⁹ /л	Me (C ₂₅ -C ₇₅)	432,00 (423,00-462,00)	342,00 (332,25-351,00)*
Тромбокрит, % Thrombocrit, %	Me (C ₂₅ -C ₇₅)	0,28 (0,26-0,30)	0,22 (0,16-0,24)
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л	Me	11,26	10,09

White blood cells, $\times 10^9/l$	(C ₂₅ -C ₇₅)	(10,51-12,61)	(9,16-13,45)
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	Me (C ₂₅ -C ₇₅)	70,15 (66,15-73,10)	67,50 (66,90-68,40)
Моноциты, % Monocytes, %	Me (C ₂₅ -C ₇₅)	3,20 (1,20-4,00)	5,10 (4,63-5,28)*
Нейтрофилы, % Neutrophils, %	Me (C ₂₅ -C ₇₅)	26,65 (23,08-33,90)	27,30 (27,03-29,00)

Примечание: Me - медиана; (C₂₅-C₇₅) - верхний и нижний квартили; *-p<0,05, ** -p<0,01

Note: Me - median; (C₂₅-C₇₅) - upper and lower quartiles; *-p<0.05, ** -p<0.01

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Скупневский Сергей Валерьевич (Владикавказ, Россия) – доктор биологических наук, заведующий лабораторией системного экологического анализа ФГОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова», ул. Ватутина, 44-46, г. Владикавказ, 362025;

телефон: 8(988)871-55-28;

ORCID: [0000-0002-6233-5944](https://orcid.org/0000-0002-6233-5944);

e-mail: dreammas@yandex.ru

Skupnevskii Sergej Valer'evich, (Vladikavkaz, Russia) – Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Systemic Environmental Analysis of North Ossetian State University, Russian Federation, Vatutina str., 44-46, Vladikavkaz, 362025, Russia;

telephone: 8(988)871-55-28;

ORCID: [0000-0002-6233-5944](https://orcid.org/0000-0002-6233-5944);

e-mail: dreammas@yandex.ru

Блок 2. Информация об авторах

Савельев Родион Вадимович (Владикавказ, Россия) – лаборант лаборатории системного экологического анализа ФГОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова», ул. Ватутина, 44-46, г. Владикавказ, 362025;

телефон: 8(989)039-54-81;

ORCID: [0000-0002-4717-1734](https://orcid.org/0000-0002-4717-1734);

e-mail: 23rodion18@gmail.com

Rodion V. Saveljev (Vladikavkaz, Russia) – laboratory assistant at the Laboratory of Systemic Environmental Analysis of North Ossetian State University, Russian Federation, Vatutina str., 44-46, Vladikavkaz, 362025;

telephone: 8(989)039-54-81;

ORCID: [0000-0002-4717-1734](https://orcid.org/0000-0002-4717-1734);

e-mail: 23rodion18@gmail.com

Блок 3. Метаданные статьи

ВОЗДЕЙСТВИЕ ИММУНИЗАЦИИ ЧУЖЕРОДНЫМИ БЕЛКАМИ НА
АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ТИМОЦИТОВ И СПЛЕНОЦИТОВ У
КРЫС

THE EFFECT OF IMMUNIZATION WITH FOREIGN PROTEINS ON THE
ACTIVITY OF MITOCHONDRIA IN RAT THYMOCYTES AND
SPLENOCYTES

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ВОЗДЕЙСТВИЕ ИММУНИЗАЦИИ ЧУЖЕРОДНЫМИ БЕЛКАМИ

THE EFFECT OF IMMUNIZATION WITH FOREIGN PROTEINS

Ключевые слова: иммунизация, метаболизм митохондрий, лимфоциты, спленоциты, тимоциты, человеческий альбумин.

Keywords: immunization, mitochondrial metabolism, lymphocytes, splenocytes, thymocytes, human albumin.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 3,

Количество таблиц – 2,

Количество рисунков – 0.

02.10.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1.	Козлов В.А. Определяющая роль тимуса в иммунопатогенезе аутоиммунных, онкологических и инфекционных заболеваний // Медицинская иммунология. -2023. – Т. 25, №1. – С. 39-58.	Kozlov V.A. The decisive role of the thymus in the immunopathogenesis of autoimmune, oncological and infectious diseases. <i>Medicinskaya immunologiya</i>, 2023, Vol. 25, no.1, pp.39-58. (In Russ.)	doi: 10.15789/1563-0625-DRO-2591.
2.	Hosszufalusi N, Chan E, Granger G, Charles M.A. Quantitative analysis comparing all major spleen cell phenotypes in BB and normal rats: autoimmune imbalance and double negative T cells associated with resistant, prone and diabetic animals. J Autoimmun, 1992, Vol. 5, no. 3, pp. 305-18.		doi: 10.1016/0896-8411(92)90145-g.
3.	Li C, Ture S.K, Nieves-Lopez B, Blick-Nitko S.K, Maurya P, Livada A.C, Stahl T/J, Kim M, Pietropaoli		doi: 10.1161/CIRCRESAHA.123.323662.

	A.P, Morrell C.N. Thrombocytopenia Independently Leads to Changes in Monocyte Immune Function. Circ Res, 2024, Vol. 134, no. 8, pp. 970-986.		
4.	Sanjabi, Shomyseh & Oh, Soyoung & Li, Ming. Regulation of the Immune Response by TGF- β : From Conception to Autoimmunity and Infection. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2017, 96.		doi: 9.10.1101/cshperspect.a022236.
5.	Tiku, Varnesh & Tan, Man-Wah & Dikic, Ivan. Mitochondrial Functions in Infection and Immunity. Trends in Cell Biology, 2020, Vol. 30, no. 9. P 748.		doi: 30.10.1016/j.tcb.2020.01.006.
6.	Wang, Y., McLean, A.S. The Role of Mitochondria in the Immune Response in Critical Illness. Crit Care, 2022, Vol. 26, no. 80.		doi: 10.1186/s13054-022-03908-2.
7.	Warren M, Subramani K, Schwartz R, Raju R. Mitochondrial dysfunction in rat splenocytes following hemorrhagic shock. Biochim Biophys Acta Mol Basis		doi: 10.1016/j.bbadis.2017.08.024.

	Dis, 2017, Vol.1863, no. 10, pp. 2526-2533.		
8.	Weiss G, Ganz T, Goodnough L.T. Anemia of inflammation. Blood, 2019, Vol. 133, no. 1, pp. 40-50.		doi: 10.1182/blood-2018-06-856500.