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

Скупневский С.В., Савельев Р.В.

ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет имени К.Л. Хетагурова», г. Владикавказ, Республика Северная Осетия – Алания, Россия

Резюме. Исследование клеточного метаболизма при формировании иммунологической памяти остается 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. Самцов крыс линии Wistar массой тела 360-380 г иммунизировали в течение 4 дней путем 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 6G 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. 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. 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

Адрес для переписки:

Скупневский Сергей Валерьевич
ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет имени К.Л. Хетагурова»
362025, Россия, Республика Северная Осетия – Алания, г. Владикавказ, ул. Ватутина, 44-46.
Тел.: 8 (988) 871-55-28.
E-mail: dreammas@yandex.ru

Address for correspondence:

Sergey V. Skupnevskii
North Ossetian State University
44-46 Vatutin St
Vladikavkaz, Republic of North Ossetia–Alania
362025 Russian Federation
Phone: +7 (988) 871-55-28.
E-mail: dreammas@yandex.ru

Образец цитирования:

С.В. Скупневский, Р.В. Савельев «Воздействие иммунизации чужеродными белками на активность митохондрий тимоцитов и спленоцитов у крыс» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 6. С. 1393-1398. doi: 10.15789/1563-0625-TEO-3121

© Скупневский С.В., Савельев Р.В., 2025
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.V. Skupnevskii, R.V. Saveljev "The effect of immunization with foreign proteins on the activity of mitochondria in rat thymocytes and splenocytes", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 6, pp. 1393-1398.
doi: 10.15789/1563-0625-TEO-3121

© Skupnevskii S.V., Saveljev R.V., 2025
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-TEO-3121

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

Skupnevskii S.V., Saveljev R.V.

North Ossetian State University, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia–Alania, Russian Federation

Abstract. Studies of cellular metabolism in development of immunological memory is still relevant since it can help to deepen our knowledge on pathogenesis of immune-inflammatory diseases and provide a basis for improving their prevention and treatment. The aim of the present study was to evaluate the activity of mitochondria in thymocytes and splenocytes after immunization of rats with human albumin. Male Wistar rats were immunized with human albumin for 4 days. The total amount of protein injected was 135 mg. 24 hours after the last injection, we evaluated hematological parameters (general blood test), and mitochondrial activity of thymocytes and splenocytes by measuring rhodamine 6 G fluorescence by means of the Evos M7000 imaging system in RFP mode. We also calculated the mass ratios of the thymus and spleen relative to the body mass of the animals. Statistical analysis included assesment 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. Hypertrophy of the thymus was revealed in animals of the immunized group by 56.9%, $p = 0.032$, and no changes in the mass of the spleen were observed. A decreased mitochondrial fluorescence was detected in thymocytes by 23.5% ($p = 0.037$) and splenocytes by 13.7% ($p = 0.548$) which may be associated with immunosuppressive effect of TGF-β during repeated administration of a foreign protein. Moreover, we have found monocytosis exceeding the control by 59.4%, ($p = 0.030$), along with thrombocytopenia (by 20.8%, $p = 0.045$). These changes, were observed in experimental rats thus reflecting reactive changes occurring during immunization. At the early stages after immunization of animals, we have revealed inhibition of energy exchange in thymic and spleen cells. This finding may reflect the effects of inflammatory mediators on mitochondria of lymphocytes and to suggest promising targets for treatment of immuno-inflammatory disorders.

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

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 экзоантигентов, а также в костимуляции 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 M. 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.

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 (ООО «Диамед-Фарма», 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 некропсии и рассчитывали массовые коэффициенты органов (МКО) – тимуса и селезенки, по формуле:

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

Образцы селезенки и тимуса измельчали при 20 °С в стеклянном гомогенизаторе в 7 мл 3,0%-ного человеческого альбумина, приготовленного на среде 199 с добавлением солей Эрла и глутамина (НПП «ПанЭко», Россия). Полученную суспензию клеток фильтровали через капрон и центрифугировали 5 минут при 1500 об/мин, супернатант удаляли, к осадку приливали 3,0% альбумина, приготовленного на фосфатном буфере с pH 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 6G (в конечной концентрации 40 нмоль/л) при той же температуре в течение 25 минут. Затем полученную смесь разбавляли 1:1 раствором 3,0%-ного 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 (МФ) по формуле:

$$МФ\ (у.е.) = \frac{I \times S_I}{100}\ ,$$

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 ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$). 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.

Результаты и обсуждение

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

При некропсии 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 6G, 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 ак-

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	**Статистические показатели** Statistical indicators	**Контроль** Control	**Опыт** Experience
Селезенка Spleen			
МКО, г/кг OMC, g/kg	Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	2,13 (2,12-2,94)	2,11 (1,95-2,42)
МФ, у. е MF, c. u	Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	214,27 (212,67-223,49)	185,00 (182,58-228,89)
Тимус Thymus			
МКО, г/кг OMC, g/kg	Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	0,65 (0,63-0,85)	1,02 (0,89-1,04)*
МФ, у. е MF, c. u	Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	491,64 (469,84-517,18)	376,31 (326,69-380,45)*

Примечание. МКО – массовые коэффициенты органа; МФ – митохондриальная флуоресценция; Me – медиана; ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$) – верхний и нижний квартили; * – p < 0,05.

Note. OMC, organ mass coefficients; MF, mitochondrial fluorescence; Me, median; ($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$), upper and lower quartiles; *, p < 0.05.

тивности 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 регулирующему 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.

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.

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КРЫС

TABLE 2. RESULTS OF HEMATOLOGICAL STUDY OF RATS

Параметр Parameter	**Статистические показатели** Statistical indicators	**Контроль** Control	**Опыт** Experience
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/L	Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	15,05 (15,00-15,18)	13,80 (13,65-13,95)*
Гематокрит, % Hematocrit, %	Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	45,92 (45,64-46,43)	46,77 (42,34-50,80)
Эритроциты, × 10^{12}/л Red blood cells, × 10^{12}/L	Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	9,00 (8,87-9,00)	8,94 (8,84-9,24)
Средний объем эритроцита, фл Average erythrocyte volume, fl	Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	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 ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	17,10 (17,00-17,58)	15,60 (15,33-16,10)**
Тромбоциты, × 10^{9}/л Platelets, × 10^{9}/L	Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	432,00 (423,00-462,00)	342,00 (332,25-351,00)*
Тромбокрит, % Thrombocrit, %	Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	0,28 (0,26-0,30)	0,22 (0,16-0,24)
Лейкоциты, × 10^{9}/л White blood cells, × 10^{9}/L	Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	11,26 (10,51-12,61)	10,09 (9,16-13,45)
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	70,15 (66,15-73,10)	67,50 (66,90-68,40)
Моноциты, % Monocytes, %	Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	3,20 (1,20-4,00)	5,10 (4,63-5,28)*
Нейтрофилы, % Neutrophils, %	Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	26,65 (23,08-33,90)	27,30 (27,03-29,00)

Примечание. Me – медиана; ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$) – верхний и нижний квартили; * – p < 0,05, ** – p < 0,01.

Note. Me, median; ($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$), upper and lower quartiles; *, p < 0.05; **, p < 0.01.

Список литературы / References

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. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 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. 305-318.*

3. Li C., Ture S.K., Nieves-Lopez B., Blick-Nitko S.K., Maurya P., Livada A.C., Stahl T.J., Kim M., Pietropaoli 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 S., Oh S.A., Li M.O. Regulation of the immune response by TGF-β: from conception to autoimmunity and infection. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol., 2017, Vol. 9, no. 6, a022236.* doi: 9.10.1101/cshperspect.a022236.

5. Tiku V., Tan M.W., Dikic I. Mitochondrial functions in infection and immunity. *Trends Cell Biol., 2020, Vol. 30, no. 4, pp. 263-275.*

6. Wang Y., McLean A.S. The role of mitochondria in the immune response in critical illness. *Crit. Care, 2022,Vol. 26, no. 1, 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 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.*

Авторы:

Скупневский С.В. *– д.б.н., заведующий лабораторией системного экологического анализа ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет имени К.Л. Хетагурова», г. Владикавказ, Республика Северная Осетия – Алания, Россия*

Савельев Р.В. *– лаборант лаборатории системного экологического анализа ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет имени К.Л. Хетагурова», г. Владикавказ, Республика Северная Осетия – Алания, Россия*

Authors:

Skupnevskii S.V., *PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Systemic Environmental Analysis, North Ossetian State University, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia–Alania, Russian Federation*

Saveljev R.V., *Laboratory Assistant, Laboratory of Systemic Environmental Analysis, North Ossetian State University, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia–Alania, Russian Federation*

Поступила 02.10.2024
Принята к печати 22.03.2025

Received 02.10.2024
Accepted 22.03.2025