

Е.А. Зеленский¹, К.В. Рутто¹, А.В. Соколов¹, Е.П. Киселева^{1, 2}

Прием цинка тормозит развитие инволюции тимуса при опухолевом росте у мышей

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

² ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Цель исследования. Изучить влияние приема цинка на развитие инволюции тимуса при росте перевиваемой опухоли у мышей.

Материалы и методы. Мыши линии СЗНА после подкожной инокуляции клеток сингенной гепатомы 22а получали сульфат цинка с питьевой водой. Через 3 нед опухолевого роста животных убивали и оценивали у них содержание цинка в крови, состояние тимуса и показатели опухолевого роста.

Результаты. На 21-е сутки роста опухоли масса и число клеток в тимусе снижались в 3 раза, а содержание эндогенного цинка в сыворотке крови — в 1,9 раз. Прием сульфата цинка с питьевой водой в концентрации 22 мкг/мл в течение трех недель, начиная с первого дня после инокуляции опухолевых клеток, увеличивал массу и клеточность тимуса, а также содержание цинка в сыворотке крови. При этом цинк не оказывал влияния на размер опухолей и выживаемость мышей с гепатомой 22а. В поиске возможного механизма действия цинка исследовали его влияние на активность двух ферментов антиоксидантной защиты: Cu,Zn-супероксиддисмутазы и каталазы в тимусе. Прием цинка не влиял на эти показатели, которые у опухолевых мышей оставались повышенными.

Заключение. У мышей с гепатомой 22а пероральный прием цинка вызывает торможение развития инволюции тимуса, не влияя при этом на рост самой опухоли. Проведенное исследование дает возможность считать пероральный прием цинка перспективным средством для разработки стратегий по восстановлению тимуса у онкологических больных.

Ключевые слова: инволюция тимуса, цинк, гепатома 22а, супероксиддисмутаза, каталаза

Введение

Известно, что опухолевый рост сопровождается инволюцией тимуса [1]. Нарушение тимопоэза приводит к снижению выхода зрелых тимоцитов и сужению разнообразия Т-клеточных

рецепторов, необходимого для полноценного ответа на вновь поступающие антигены [2]. Это особенно важно для пациентов, проходящих курс химио- или рентгенотерапии, поскольку такое воздействие дополнительно усиливает развитие инволюции тимуса. Разработка эффективных стратегий для улучшения функций тимуса и, как следствие, сохранения адекватной противоинфекционной защиты у онкологических больных является актуальной задачей. Для ее решения в эксперименте применяют различные способы: введение ростовых факторов, интерлейкинов, гормонов, стволовых клеток [3].

Между тем, в литературе имеются данные о том, что для восстановления массы и клеточности тимуса достаточно применить диету с повышенным содержанием цинка или с его добавлением в питьевую воду, что было успешно использовано у старых мышей [4, 5, 6], но не было исследовано при росте опухолей.

Известно, что концентрация цинка в крови старых животных снижается [4, 5, 6]. Дефицит цинка рассматривают в качестве одной из важных причин возрастных иммунологических нарушений и, в частности, инволюции тимуса [7].

Несмотря на то, что старение и опухолевый рост представляют собой разные процессы, дефицит цинка выявляется в обоих случаях. Опухолевый рост как у людей [8], так и у экспериментальных животных [9], сопровождается снижением концентрации цинка в крови. На основании этого мы предположили, что дефицит данного микроэлемента может играть существенную роль в развитии инволюции тимуса также и при опухолевом росте, а препараты цинка помогут существенно улучшить цинковый статус и состояние вилочковой железы.

Известно, что цинк является одним из важнейших микроэлементов, необходимых для пролиферации и дифференцировки клеток иммунной системы. При дефиците цинка происходит нарушение клеточного и гуморального иммунитета, а также снижение способности организма сопротивляться инфекциям [8]. У животных,

находящихся на цинк-дефицитной диете, развивается инволюция тимуса [7]. Кроме того, что дефицит цинка может вызывать в организме окислительный стресс [10]. Этот микроэлемент формирует активный центр одного из важнейших ферментов антиоксидантной защиты — Cu,Zn-супероксиддисмутазы (СОД), активность которой в условиях дефицита цинка может снижаться.

Цель данной работы — изучить влияние перорального приема цинка на развитие инволюции тимуса при росте перевиваемой опухоли гепатомы 22а у мышей. В качестве возможного механизма действия цинка изучали его влияние на активность ферментов антиокислительной системы в тимусе — СОД и каталазы при росте перевиваемой гепатомы 22а.

Материалы и методы

В работе использовались мыши-самцы линии СЗНА весом 16–18 г, полученные из питомника «Рапполово». Клеточная линия гепатомы 22а была получена из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки культивировали в среде DMEM, с добавлением 10% фетальной сыворотки. Для получения солидных опухолей мышам подкожно инокулировали в область спины 2×10^5 клеток сингенной гепатомы 22а в объеме 0,2 мл физиологического раствора. Контрольные животные получали инъекцию физиологического раствора. Все экспериментальные животные находились на стандартной диете и получали сухой комбикорм ПК-120 («Лабораткорм», Москва, Россия), содержащий 22,5 мг цинка на кг. Для изучения действия цинка животные с опухолями получали *ad libitum* питьевую воду с добавлением сульфата цинка (Sigma-Aldrich, для клеточных культур) в различных концентрациях с первого дня после инокуляции клеток гепатомы 22а в течение всего периода эксперимента. Все исследования проводились в соответствии с требованиями и условиями, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

На 21-е сутки опухолевого роста животных наркотизировали и после декапитации собирали кровь, а также извлекали тимус. Содержание цинка в образцах сыворотки определяли с помощью метода атомно-абсорбционной спектроскопии. Образцы растворяли в двух объемах азотной кислоты и проводили измерение по отношению к стандартным растворам цинка (Sigma-Aldrich) на спектрометре ZEE nit 650P (Analytik Jena, Германия).

Размеры опухолей измеряли в двух взаимно перпендикулярных направлениях и вычисляли средний диаметр опухоли по формуле: $D = \sqrt{(a - 1) \times (b - 1)}$, где а — наибольший размер опухоли, b — наименьший размер опухоли, а 1 мм — толщина кожной складки. Оценку выживаемости проводили в группах по 10 животных с гепатомой 22а, получавших либо питьевую воду, либо воду с добавлением сульфата цинка в концентрации 22 мкг/мл в течение всего срока наблюдения.

Для оценки активности каталазы в гомогенатах тимуса использовали метод с применением метаванадата аммония [11]. Для оценки активности Cu,Zn-СОД использовали модифицированный метод [12] с использованием 50 мкМ ресазурина, который восстанавливался суперок-

сидными анион-радикалами, генерируемыми 150 мкМ ксантином и 100 нМ ксантиноксидазой [13]. Для учета вклада Mn-СОД к контрольным пробам добавляли 2 мМ цианида натрия, ингибирующего Cu,Zn-СОД. За 1 условную единицу (у. е.) СОД принимали количество фермента, которое вызывало 50%-е понижение интенсивности флуоресценции продукта восстановления ресазурина с учетом ингибирования Cu,Zn-СОД в контрольной пробе. В пробах гомогенатов также определяли концентрацию белка по Бредфорду и выражали активность ферментов в расчете на мг общего белка.

Статистическую обработку результатов проводили в программе Statistica 13.0 с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Данные представлены в виде среднего значения \pm ошибка среднего ($M \pm m$). Непараметрический корреляционный анализ Спирмена проводили с вычислением коэффициента корреляции r . Расчет кривых выживаемости проводили с помощью метода Каплана–Майера в программе GraphPad Prism 6,0 (GraphPad Software, США), а статистически значимую разницу определяли с помощью критерия Гехана–Бреслоу–Вилкоксона.

Результаты

На 21-е сутки роста гепатомы 22а у мышей наблюдали значительное снижение концентрации цинка в образцах сыворотки крови — в 1,9 раз по сравнению с контрольными показателями (рис. 1, а). На этом же сроке опухолевого роста отмечено также и выраженное снижение массы тимуса — в 3 раза по сравнению с этим же показателем у контрольных мышей (см. рис. 1, б).

Для коррекции этих показателей в питьевую воду животным добавляли сульфат цинка в одной из трех концентраций, а именно 11, 22 и 66 мкг/мл. Прием цинка в концентрациях 22 и 66 мкг/мл вызывал повышение уровня содержания эндогенного цинка в крови, хотя этот уровень и не достигал контрольных показателей (см. рис. 1, а). Масса тимуса у мышей, получавших цинк, также была больше. Наилучший эффект в отношении сохранения массы тимуса оказывала концентрация сульфата цинка 22 мкг/мл, которая достоверно повышала массу тимуса, хотя и оставалась ниже значений, характерных для контрольных животных (см. рис. 1, б). Для дальнейших экспериментов была выбрана эта концентрация.

Следует отметить, что прием цинка в этой же концентрации не оказывал влияния ни на массу тимуса, ни на содержание эндогенного цинка в образцах сыворотки крови у мышей контрольной группы, которым опухоли не прививали (группа K2 на рис. 1, а, б). Тем самым было показано, что дополнительный прием сульфата цинка в концентрации 22 мкг/мл действовал только на мышей с дефицитом цинка (в данном случае, имеющих опухоли) и не влиял на контрольных животных с нормальным содержанием данного микроэлемента.

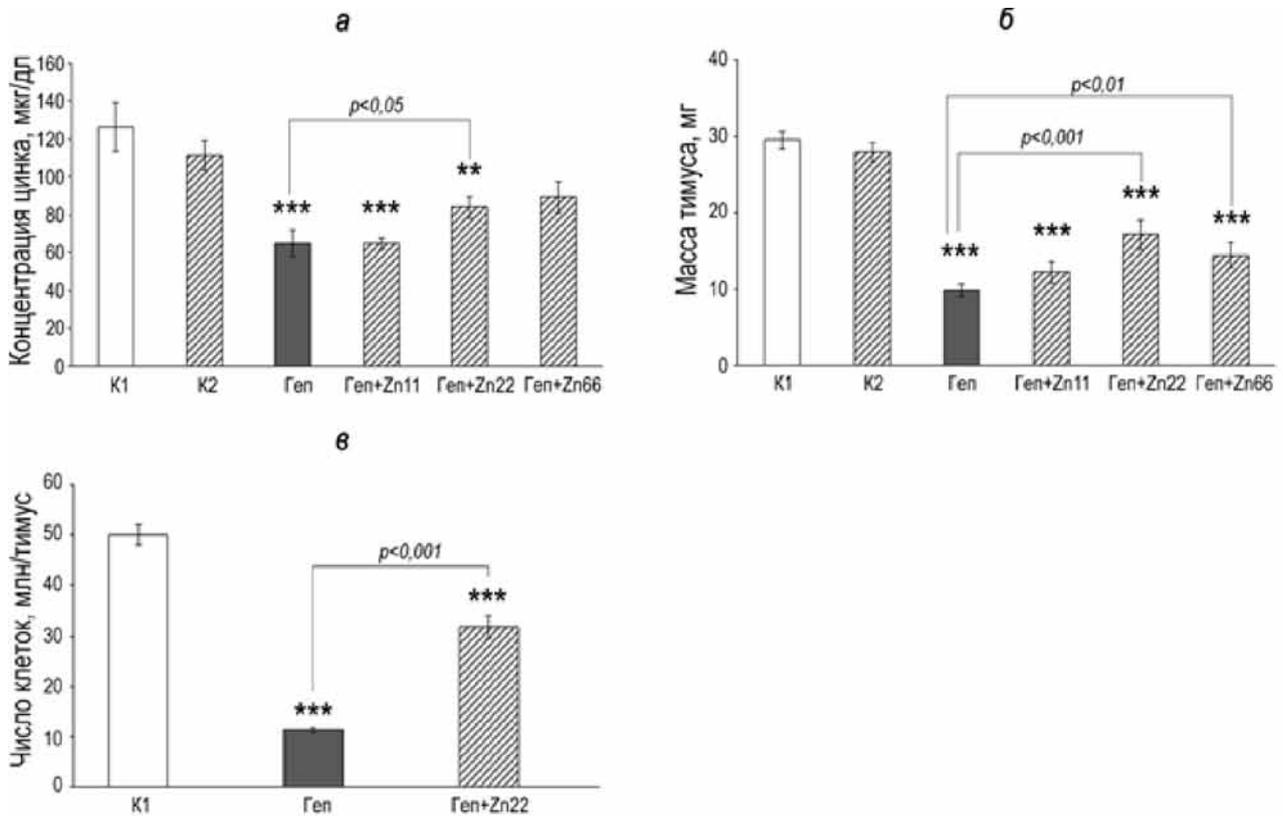


Рис. 1. Влияние приема сульфата цинка на концентрацию эндогенного цинка в сыворотке крови (а) и массу тимуса мышей (б) и число тимоцитов (в) на 21-е сутки роста гепатомы 22а.

По оси ординат: (а) — содержание цинка в сыворотке крови, мкг/децилитр, $M \pm m$, $n=9-19$; (б) — масса тимуса, мг, $M \pm m$, $n=9-19$; (в) — число тимоцитов в расчете на весь орган, миллион/тимус, $M \pm m$, $n=7$. По оси абсцисс группы животных: K1 — контрольные животные; K2 — контрольные животные, получавшие сульфат цинка в концентрации 22 мкг/мл с питьевой водой; Ген — животные с гепатомой 22а; Ген+Zn11, Ген+Zn22 и Ген+Zn66 — животные с гепатомой 22а, получавшие цинк в концентрациях 11, 22 и 66 мкг/мл соответственно. Показана достоверность различий по сравнению с контролем K1 и K2: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Достоверность различий между группами Ген и Ген+Zn22, а также Ген и Ген+Zn66 обозначена скобкой.

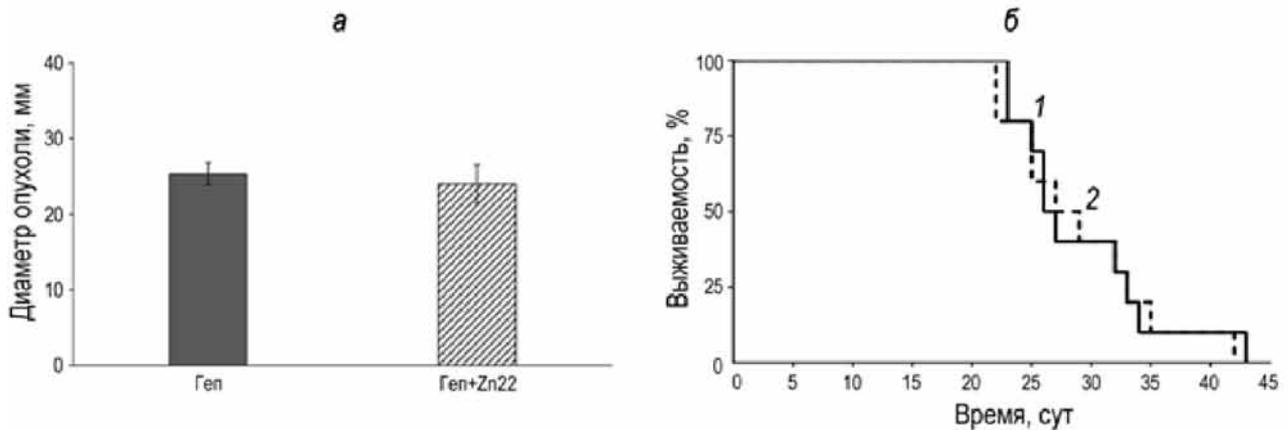


Рис. 2. Влияние приема цинка на размер опухолей (а) и выживаемость мышей с гепатомой 22а (б).

а — по оси ординат: средний диаметр опухолей на 25-е сутки опухолевого роста, мм; по оси абсцисс группы животных ($n=7$): Ген — животные с гепатомой 22а; Ген+Zn22 — животные с гепатомой 22а, получавшие 22 мкг/мл сульфата цинка с питьевой водой; б — по оси ординат — выживаемость животных, %, ($n=10$); по оси абсцисс — время после инокуляции клеток гепатомы 22а, сут. Группа 1 — животные с гепатомой 22а, группа 2 — животные с гепатомой 22а, получавшие 22 мкг/мл сульфата цинка с питьевой водой. Различия между группами по критерию Гехана не достоверны ($P=0,91$). Медиана выживаемости в группе 1 — 26,5 сут, в группе 2 — 28 сут.

Как показано на рис. 1, в, в группе мышей с гепатомой 22а, получавших цинк, более высокие показатели массы тимуса сопровождалась также и большим числом тимоцитов в расчете на весь орган, по сравнению с группой животных, цинка не получавших.

Для того, чтобы ответить на вопрос, не являются ли наблюдаемые эффекты следствием задержки опухолевого роста, оценивали влияние приема цинка на размеры опухолей и выживаемость мышей. Как показано на рис. 2, а, б, прием сульфата цинка не оказывал влияния на

эти показатели. Таким образом, влияние цинка на тимус не опосредовано его действием на опухоль.

При исследовании активности каталазы и Cu,Zn-СОД в тимусе мышей с гепатомой 22а на 21-е сутки ее роста оба показателя были повышены по сравнению с контрольным уровнем (рис. 3, а, б). При этом оказалось, что прием сульфата цинка с питьевой водой не оказывал влияния на активность каталазы и Cu,Zn-СОД в тимусе мышей с гепатомой 22а (см. рис. 3, а, б).

Обсуждение

В настоящей работе впервые установлен факт торможения развития инволюции тимуса при росте перевиваемой опухоли путем перорального приема цинка. Было показано, что добавление 22 мкг/мл сульфата цинка в питьевую воду в течение 21 сут вызывает увеличение массы и клеточности тимуса у животных с перевиваемой гепатомой 22а.

Данные литературы о торможении развития инволюции тимуса при росте перевиваемых опухолей практически отсутствуют, за исключением одной работы, в которой исследовали состояние тимуса у мышей с карциномой Льюиса при введении тимулина, а действие цинка — специально не изучали [14]. Его исследовали только у мышей контрольной группы, поскольку тимулин представляет собой цинксодержащий препарат. Этим животным 3 раза в нед внутрибрюшинно вводили 1 нг хлорида цинка на мыш, начиная за 10 сут до инокуляции опухолевых клеток и затем в течение 17 сут после этого, и наблюдали увеличение массы тимуса по сравнению с животными, которым цинк не вводили.

В наших исследованиях показано, что восстановление тимуса под действием цинка происходило на фоне отсутствия влияния на размеры опу-

холей и выживаемость мышей, что предполагает существование независимого механизма действия цинка на тимус. В цитированной выше работе было также показано, что введение цинка не влияет на рост первоначальных опухолей, но при этом подавляет их дальнейшее метастазирование [14]. В нашей работе данный показатель не исследовали так, как гепатома 22а не метастазирует.

Тот факт, что прием цинка восстанавливал массу тимуса и также вызывал повышение концентрации эндогенного цинка в крови указывал на возможную связь между этими явлениями. Однако корреляционная связь между этими показателями в группе животных-опухоленосителей, получавших цинк, отсутствовала (коэффициент корреляции $\rho=0,07$; $n=18$, где n — число пар). Следовательно, восстановление массы тимуса не связано напрямую с повышением концентрации цинка в крови, и эти показатели изменяются независимо друг от друга.

Таким образом, поскольку мы получили данные о возможности коррекции тимуса с помощью дополнительного приема цинка, наша гипотеза о том, что развитие инволюции тимуса при опухолевом росте может быть связано с дефицитом цинка, получила подтверждение.

Поскольку одним из возможных положительных эффектов цинка является его участие в антиоксидантной защите, в тимусе животных с гепатомой 22а оценивали активность двух ферментов — СОД и каталазы, один из которых, а именно СОД, является цинк-зависимым ферментом. Из литературы известно, что его активность повышается в плазме крови и эритроцитах в результате приема цинка пожилыми людьми с дефицитом этого микроэлемента [15]. Другой фермент — каталаза, не является цинксодержащим ферментом, однако цинк может увеличивать его экспрессию в клетках через активацию транскрипционного фактора Sp1 [16].

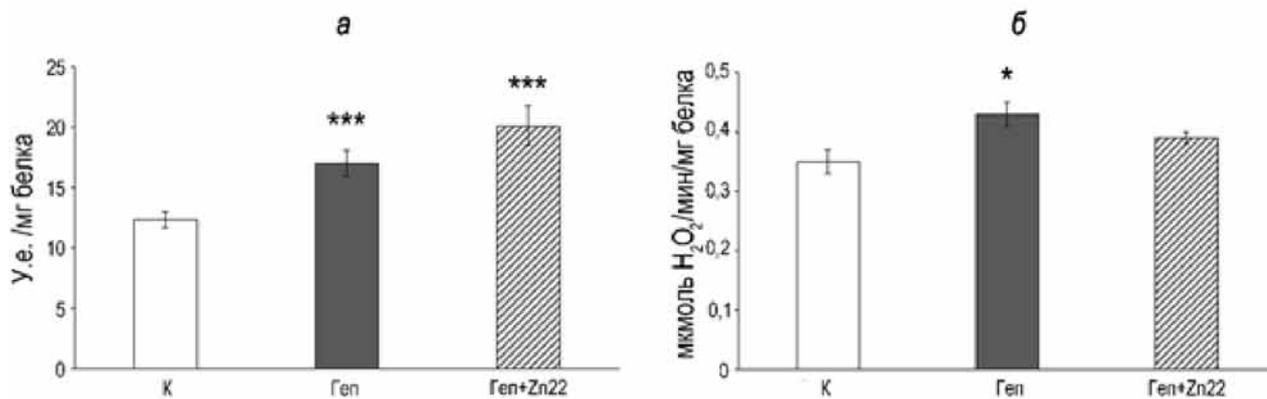


Рис. 3. Влияние приема цинка на активность ферментов СОД (а) и каталазы (б) в гомогенатах тимуса мышей на 21-е сутки роста гепатомы 22а.

По оси ординат: (а) активность СОД, у. е./мг белка, $M \pm m$; (б) активность каталазы, $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{мин}/\text{мг}$ белка, $M \pm m$. По оси абсцисс (а, б) группы животных ($n=10$): К — контроль; Геп — животные с гепатомой 22а; Геп+Zn22 — животные с гепатомой 22а, получавшие 22 мкг/мл сульфата цинка с питьевой водой. Показана достоверность различий по сравнению с контролем: * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$.

Ферменты каталаза и СОД были исследованы в тимусе животных с опухолями впервые, и был установлен факт повышения активности антиоксидантных ферментов (каталазы и СОД) в тимусе мышей с перевиваемой опухолью, что может косвенно указывать на повышение окислительного стресса в данном органе при опухолевом росте. Однако причины этого явления требуют дополнительных исследований. Что же касается влияния цинка на активность этих ферментов в тимусе, то различия показателей в группах животных, принимавших и не принимавших сульфат цинка, не обнаружено. Следовательно, механизм положительного влияния цинка на тимус с этими ферментами не связан.

Заключение

Нами был разработан простой способ коррекции массы и клеточности тимуса с помощью перорального приема сульфата цинка у мышей с перевиваемой опухолью. Препараты солей цинка имеют длительную, почти 90-летнюю, историю применения для профилактики и лечения онкологических заболеваний [17]. Эти препараты и в настоящее время успешно используются для лечения синдрома усталости и повышения качества жизни у лиц, получающих химиотерапию [18]. Полученные данные указывают на то, что спектр применения солей цинка может быть расширен, и в дальнейшей перспективе они будут также применяться и по новому назначению — для восстановления функций тимуса у онкологических больных.

Благодарности

Авторы приносят благодарность д-ру биол. наук проф. Л.В. Пучковой и Ю.А. Орлову за ценные советы и помощь в определении цинка.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии в статье конфликта интересов.

Финансирование

Работа выполнена в рамках плановой темы НИР ФГБНУ «ИЭМ» №0557-2019-0006.

ЛИТЕРАТУРА

- Carrio R, Lopez DM. Insights into thymic involution in tumor-bearing mice // *Immunologic Research*. 2013;57(1-3):106-114. <https://doi.org/10.1007/s12026-013-8446-3>
- Heng TSP, Chidgey AP, Boyd RL. Getting back at nature: understanding thymic development and overcoming its atrophy // *Current Opinion in Pharmacology*. 2010;10(4):425-433. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.04.006>
- Lepletier A, Alsharif A, Chidgey AP. Inflammation and thymus ageing // *Frontiers of Hormone Research*. 2017;48:19-36. <https://doi.org/10.1159/000452903>
- Dardenne M, Boukaiba N, Gagneraout M-C et al. Restoration of the thymus in ageing mice by in vivo zinc supplementation // *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1993;66(2):127-135. <https://doi.org/10.1006/clin.1993.1016>
- Mocchegiani E, Santarelli L, Muzzioli M, Fabris N. Reversibility of the thymus involution and of age-related peripheral immune dysfunction by zinc supplementation in old mice // *International Journal of Immunopharmacology*. 1995;17(9):703-718. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(95\)00059-b](https://doi.org/10.1016/0192-0561(95)00059-b)
- Wong CP, Song Y, Elias VD et al. Zinc supplementation increases zinc status and thymopoiesis in aged mice // *The Journal of nutrition*. 2009;139(7):1393-1397. <https://doi.org/10.3945/jn.109.106021>
- Mocchegiani E, Santarelli L, Costarelli L et al. Plasticity of neuroendocrine-thymus interactions during ontogeny and ageing: role of zinc and arginine // *Ageing research reviews*. 2006;5(3):281-309. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2006.06.001>
- John E, Laskow TC, Buchser WJ et al. Zinc in innate and adaptive tumor immunity // *Journal of Translational Medicine*. 2010;8:118. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-118>
- Romeu A, Arola L, Alemany M. Essential metals in tissues and tumor of inbred C57BL/6 mice during the infective cycle of Lewis lung carcinoma // *Cancer Biochemistry Biophysics*. 1986;9(1):53-66
- Eide DJ. The oxidative stress of zinc deficiency // *Metallomics: integrated biometal science*. 2011;3(11):1124-1129. <https://doi.org/10.1039/c1mt00064k>
- Hadwan MH, Ali SK. New spectrophotometric assay for assessments of catalase activity in biological samples // *Analytical Biochemistry*. 2018;542:29-33. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.11.013>
- Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates // *Analytical Biochemistry*. 1989;179(1):8-18. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90192-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90192-9)
- Samygina VR, Sokolov AV, Bourenkov G et al. Rat ceruloplasmin: new labile copper binding site and zinc/copper mosaic // *Metallomics: integrated biometal science*. 2017;9(12):1828-1838. <https://doi.org/10.1039/c7mt00157f>
- Kaiserlian D, Savino W, Hassid J, Dardenne M. Studies of the thymus in mice bearing the Lewis lung carcinoma. III. Possible mechanisms of tumor-induced thymic atrophy // *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1984;32(3):316-325. [https://doi.org/10.1016/0090-1229\(84\)90275-7](https://doi.org/10.1016/0090-1229(84)90275-7)
- Mariani E, Mangialasche F, Feliziani FT et al. Effects of zinc supplementation on antioxidant enzyme activities in healthy old subjects // *Experimental Gerontology*. 2008;43(5):445-451. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.10.012>
- Tate DJ, Miceli MV, Newsome DA. Zinc induces catalase expression in cultured fetal human retinal pigment epithelial cells // *Current Eye Research*. 1997;16(10):1017-1023. <https://doi.org/10.1076/ceyr.16.10.1017.9011>
- Hoang BX, Han B, Shaw DG, Nimni M. Zinc as a possible preventive and therapeutic agent in pancreatic, prostate,

and breast cancer // *European Journal of Cancer Prevention*. 2016;25(5):457–461. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000194>

18. Ribeiro SM, Braga CB, Peria FM. et al. Effects of zinc supplementation on fatigue and quality of life in patients with colorectal cancer // *Einstein*. 2017;15(1):24–28. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082017AO3830>

Поступила в редакцию 12.02.2021

*E.A. Zelenskiy¹, K.V. Rutto¹, A.V. Sokolov¹,
E.P. Kisseleva^{1, 2}*

Zinc supplementation prevents the development of thymic involution induced by tumor growth in mice

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution “Institute of Experimental Medicine”, Saint-Petersburg, Russia

² North-Western Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

Aim. The aim of this study was to investigate the influence of zinc supplementation on the development of thymic involution during the growth of transplantable tumor in mice.

Materials and methods. Inbred C3HA mice after subcutaneous syngeneic hepatoma 22a inoculation received zinc sulfate with drinking water. After 3 weeks of tumor growth animals were killed, and evaluated for zinc content in serum blood samples, thymus status and parameters of tumor growth.

Results. At the 21 day of tumor 22a growth weight and cellular content of the thymus were decreased by 3 times and endogenous zinc content in samples of blood serum was decreased by 1,9 times. Oral zinc sulfate supplementation at concentration of 22 mkg/ml in drinking water during 3 weeks, started from the first day after tumor inoculation, increased thymus weight and cellularity as well as serum zinc content. At the same time, it did not influence tumor size and survival rate of mice with hepatoma 22a. As a possible mechanism of zinc action, we studied the influence of zinc supplementation on the activity of two anti-oxidative defense enzymes: Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase in the thymus. Zinc supplementation had no influence on these parameters, both remained at a higher level in tumor-bearing mice.

Conclusion. Oral zinc supplementation in hepatoma 22a bearing mice induced retards the development of thymic involution with no influence on the tumor growth per se. The study allows to suggest that oral zinc administration may be considered as a prospective strategy for thymus reconstitution in oncology patients.

Key words: thymus involution, zinc, hepatoma 22a, superoxide dismutase, catalase