



Е.А. Зеленский<sup>1</sup>, А.С. Трулев<sup>1</sup>, К.В. Рутто<sup>1</sup>, И.В. Кудрявцев<sup>1</sup>,  
А.В. Соколов<sup>1</sup>, Е.П. Киселева<sup>1,2</sup>

## Влияние сульфата цинка на пролиферацию и апоптоз тимоцитов мышей при опухолевом росте

<sup>1</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург  
<sup>2</sup>ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург

**Цель исследования.** Изучить влияние перорального приема цинка на функциональную активность тимоцитов при росте перививаемой опухоли гепатомы 22а у мышей.

**Материалы и методы.** Мыши линии СЗНА, начиная с первого дня после подкожной инокуляции клеток сингенной гепатомы 22а, получали сульфат цинка с питьевой водой в концентрации 22 мкг/мл в течение трех недель. На 21 сут опухолевого роста животных выводили из эксперимента, извлекали тимусы, оценивали пролиферативную активность и апоптоз тимоцитов, а также содержание цинка в тимусе. Пролиферацию (распределение тимоцитов по стадиям клеточного цикла) изучали с помощью проточной цитометрии путем окрашивания DAPI. Для исследования апоптоза клетки окрашивали DAPI и YO-PRO. Содержание цинка в тимусе определяли с помощью атомно-абсорбционной спектрометрии.

**Результаты.** На 21 сут роста опухоли апоптоз тимоцитов увеличивался в 2,5 раза, а доля тимоцитов, находящихся в S фазе (фазе синтеза ДНК), снижалась в 1,8 раза. Апоптоз, главным образом, обнаруживали среди популяции двойных позитивных CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> тимоцитов — было отмечено увеличение в 3,2 раза по сравнению с контролем. Прием цинка нормализовал показатели пролиферативной активности (пролиферативный индекс и долю клеток в S фазе), а также снижал относительное содержание тимоцитов в состоянии апоптоза. Кроме того, прием соли цинка повышал содержание цинка в вилочковой железе.

**Заключение.** Пероральный прием сульфата цинка вызывает торможение инволюции тимуса у мышей с гепатомой 22а и значительно улучшает показатели функциональной активности тимоцитов. У таких животных пролиферативная активность тимоцитов сохраняется на нормальном уровне, а показатели апоптоза существенно ниже, чем у живот-

ных, не получавших соль цинка. Проведенное исследование дает возможность считать пероральный прием соли цинка перспективным средством для разработки новых стратегий по восстановлению тимуса у онкологических больных.

**Ключевые слова:** инволюция тимуса; тимоциты; цинк; гепатома 22а; пролиферация; апоптоз

**Для цитирования:** Зеленский Е.А., Трулев А.С., Рутто К.В., Кудрявцев И.В., Соколов А.В., Киселева Е.П. Влияние сульфата цинка на пролиферацию и апоптоз тимоцитов мышей при опухолевом росте. Вопросы онкологии. 2023;69(3):437–443. doi: 10.37469/0507-3758-2023-69-3-437-443

### Введение

Тимус — центральный орган иммуногенеза, в котором происходит созревание Т-лимфоцитов. Зрелые лимфоциты выходят из тимуса в кровоток и пополняют пул периферических наивных Т-клеток, поддерживая разнообразие Т-клеточных рецепторов (TCR). Несмотря на возрастную инволюцию, выход лимфоцитов из тимуса продолжается до глубокой старости, хотя и в значительно меньшем количестве, чем в раннем возрасте [1]. Периферические Т-лимфоциты у взрослых представлены в основном клетками памяти, которые защищают организм при повторном попадании патогенов [2]. Однако для ответа на вновь поступающие антигены инфекционной или неинфекционной природы необходимы наивные клетки, образующиеся в тимусе *de novo* или самоподдерживающиеся в течение ограниченного времени путем гомеостатической пролиферации.

Как показали недавние исследования, разнообразие Т-клеточных рецепторов среди периферических Т-лимфоцитов у онкологических больных значительно снижается [3, 4]. Считается, что это происходит вследствие инволюции тимуса, сопровождающей опухолевый рост,

механизмы которой до сих пор не установлены [5]. Нарушение тимопоэза, приводящее к уменьшению выхода зрелых тимоцитов и обеднению Т-клеточного репертуара у пациентов с новообразованиями, снижает эффективность защиты от патогенов и ответа на иммунотерапию [6]. Сохранение тимуса особенно важно при развитии лимфопении, связанной с химио- или рентгенотерапией, которые еще больше усиливают развитие инволюции тимуса [7, 8]. Показано, что для восстановления периферических CD4+ Т-лимфоцитов после химиотерапии необходимы продукция клеток в тимусе и их выход на периферию [9]. Следует отметить, что способность к возобновлению тимопоэза не утрачивается полностью ни с возрастом, ни после применения цитостатиков, хотя она и значительно снижается у лиц старше 50 лет [9].

Для поддержания функционирования тимуса у онкологических больных разрабатываются различные стратегии, включающие введение цитокинов, ростовых факторов, гормонов, стволовых клеток и др. [6, 7, 8]. Недавно нами было показано, что для сохранения массы и клеточности тимуса у животных с перевиваемой гепатомой 22а достаточно применить добавление цинка в питьевую воду [10].

Как показано нами ранее, инволюция тимуса у мышей с гепатомой 22а, как и при многих других опухолях, сопровождается снижением пролиферативной активности тимоцитов и усилением их апоптоза [11–13]. Необходимо было установить, в какой мере дополнительный прием цинка способствует не только сохранению массы тимуса, но также и функциональной активности тимоцитов.

Цель настоящего исследования — изучить влияние перорального приема цинка на пролиферативную способность тимоцитов и их чувствительность к развитию спонтанного апоптоза. В качестве оценочного критерия изучали также содержание цинка в тимусе.

## Материал 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  $2 \times 10^5$  клеток сингенной гепатомы 22а в объеме 0,2 мл физиологического раствора. Контрольные животные получали инъекцию только 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) в концентрации 22 мкг/мл с первого дня после инокуля-

ции 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 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики».

На 21 сут опухолевого роста животных вывели из эксперимента методом цервикальной дислокации и извлекали тимус, из которого получали клеточную суспензию для каждой мыши индивидуально. Пролиферативную активность изучали путем анализа клеточного цикла по окрашиванию тимоцитов ДНК-связывающим реагентом 4',6-диамино-2-фенилиндолом DAPI (Biolegend, США) [14]. Клетки фиксировали с помощью охлажденного 70 % раствора этанола и выдерживали при температуре -20 °С 1 ч, после чего однократно отмывали и окрашивали DAPI в конечной концентрации 10 мкг/мл. Результаты получали в виде распределения клеток по фазам ( $G_0G_1$  — фаза покоя и пресинтетическая фаза митоза, одиночный набор ДНК, S — фаза синтеза ДНК, «промежуточный» набор ДНК, а также  $G_2M$  — постсинтетическая фаза и фаза митоза, двойной набор ДНК), выраженном в процентах от общего числа проанализированных клеток. Кроме того, вычисляли пролиферативный индекс по формуле  $(S + G_2M)/G_0G_1$ , где в числителе — сумма пролиферирующих клеток, а в знаменателе — клетки, находящиеся в состоянии покоя. Чтобы отличить одиночные клетки от агрегатов и в последующем удалить их из зоны анализа, оценивали соотношение интенсивности флуоресценции пикового и интегрального сигналов по каналу для DAPI. Для каждого из образцов на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США) анализировали не менее 10 000 одиночных клеток. Данные обрабатывали с помощью программы Kaluza™ версия 2.3 (Beckman Coulter, США) с применением алгоритма Michael H. Fox.

Для исследования апоптоза тимоциты сразу после выделения без предварительных инкубаций окрашивали иодидом YO-PRO-1 (Invitrogen, США) в концентрации 250 нМ и DAPI в концентрации 1 мкг/мл при комнатной температуре в течение 10 мин [15]. С помощью проточного цитофлуориметра в каждом образце анализировали три популяции клеток: неокрашенные — живые клетки; окрашенные YO-PRO-1 — находящиеся в ранней фазе апоптоза; окрашенные DAPI и YO-PRO-1 — в состоянии некроза/поздней фазы апоптоза. Тимоциты фенотипировали с использованием моноклональных антител против CD4 мыши, меченных PE-Cy7 (BD Pharmingen, США), и против CD8, меченных PE-Cy5 (BD Pharmingen), а также соответствующих изотопических контролей.

Содержание цинка в тимусе определяли с помощью метода атомно-абсорбционной спектрометрии. Образцы растворяли в азотной кислоте и проводили измерение по отношению к стандартным растворам цинка (Sigma-Aldrich) на спектрометре ZEE nit 650P (Analytik Jena, Германия). Результат выражали в микрограммах Zn на 1 г сырой массы ткани.

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 ( $M \pm m$ ).

## Результаты

Для оценки пролиферативной активности тимоцитов у животных с гепатомой 22а использовали анализ клеточного цикла. На 21 сут опухолевого роста наблюдали значительное снижение доли тимоцитов в S фазе (фазе синтеза ДНК)

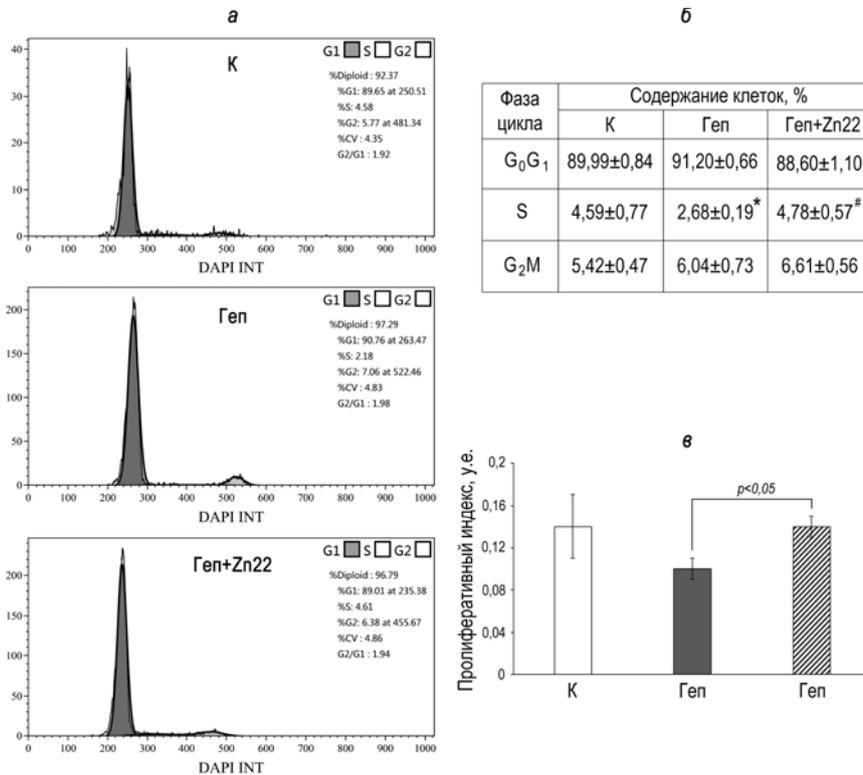


Рис. 1. Влияние приема сульфата цинка на распределение тимоцитов по фазам клеточного цикла у мышей с гепатомой 22а (а) — один из трех репрезентативных экспериментов. По оси ординат: число клеток. По оси абсцисс: интенсивность флуоресценции DAPI; (б) — относительное содержание клеток в разных фазах клеточного цикла, % (M ± m); группы животных: К — контрольные; Геп — животные с гепатомой 22а; Геп + Zn22 — животные с гепатомой 22а, получавшие цинк в концентрации 22 мкг/мл с питьевой водой; в каждой группе 6-7 животных; достоверность различий между группами К и Геп обозначена \* при p < 0,05; достоверность различий между группами Геп и Геп + Zn22 обозначена ## при p < 0,01; (в) — пролиферативный индекс (S + G<sub>2</sub>M)/G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>. По оси ординат: пролиферативный индекс, у.е. По оси абсцисс группы животных; n = 6-7, (M ± m). Достоверность различий между группами Геп и Геп + Zn22 обозначена скобкой.

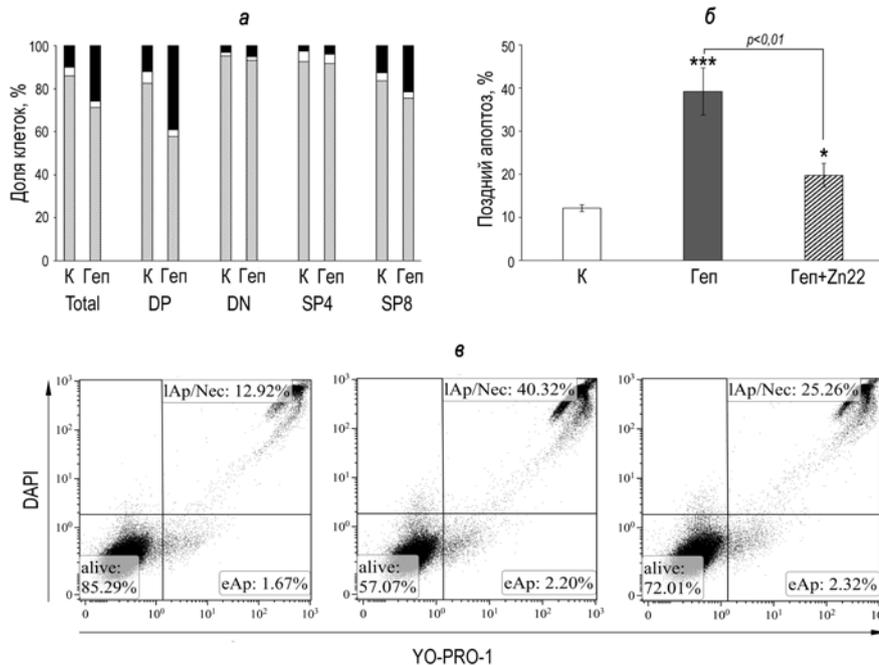


Рис. 2. Влияние приема сульфата цинка на апоптоз тимоцитов у мышей с гепатомой 22а (а) — апоптоз среди разных популяций тимоцитов: Total — все тимоциты, DP — двойные положительные тимоциты с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, DN — двойные отрицательные тимоциты с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, SP4 — единичные положительные тимоциты с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, SP8 — единичные положительные тимоциты с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. По оси ординат: доля клеток, находящихся в разных фазах апоптоза, %; столбцы черные — клетки в состоянии позднего апоптоза/некроза, белые — в состоянии раннего апоптоза; заштрихованные — живые клетки. По оси абсцисс группы животных: К — контроль, Геп — животные с гепатомой на 21 сут опухолевого роста (n = 6); (б) — влияние приема цинка на апоптоз тимоцитов. По оси ординат: доля клеток в состоянии позднего апоптоза среди DP тимоцитов, %. По оси абсцисс группы животных (n = 6): К — контрольные; Геп — животные с гепатомой 22а; Геп + Zn22 — животные с гепатомой 22а, получавшие цинк в концентрации 22 мкг/мл с питьевой водой, (M ± m). Достоверность различий между группами К и Геп обозначены \*\*\* при p < 0,001, между группами К и Геп+Zn22 обозначены \* при p < 0,05. Достоверность различий между группами Геп и Геп + Zn22 обозначена скобкой; (в) — гистограммы проточной цитометрии одного из репрезентативных экспериментов. По оси ординат: интенсивность флуоресценции DAPI; по оси абсцисс: интенсивность флуоресценции YO-PRO-1; область IAp/Nec — клетки в состоянии позднего апоптоза/некроза, eAp — клетки в состоянии раннего апоптоза, alive — живые клетки.

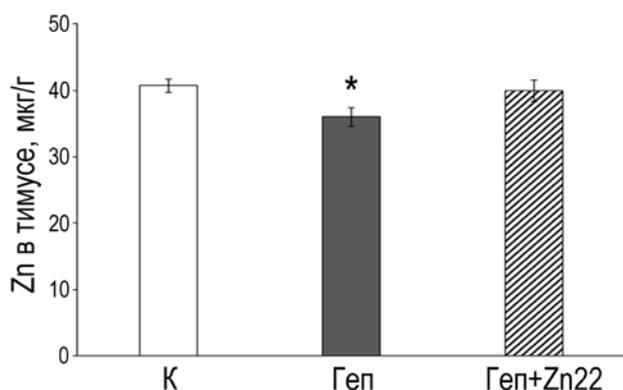


Рис. 3. Влияние приема сульфата цинка на содержание цинка в тимусе у мышей с гепатомой 22а

По оси ординат: содержание цинка по данным атомно-абсорбционной спектрометрии, мкг на г сырой ткани тимуса ( $M \pm m$ ). По оси абсцисс группы животных ( $n = 10$ ): К — контроль; Геп — животные с гепатомой 22а; Геп + Zn22 — животные с гепатомой 22а, получавшие цинк в концентрации 22 мкг/мл с питьевой водой. Достоверность различий между группами К и Геп обозначена \* при  $p < 0,05$ .

(рис. 1 а, б), что подтверждает данные о снижении спонтанной пролиферации тимоцитов, полученные нами ранее с помощью других методов — гистологического и изотопного [11, 13]. У животных с гепатомой 22а, получавших цинк с питьевой водой, относительное содержание тимоцитов в S фазе не отличалось от контрольных показателей (группы мышей без опухоли).

Пролиферативный индекс у животных с гепатомой 22а был также снижен по сравнению с контрольным уровнем, а у опухоленосителей, получавших сульфат цинка, не отличался от показателя у контрольных животных без опухолей (рис. 1, в). При этом достоверных различий по содержанию тимоцитов, находящихся в других фазах клеточного цикла — фазе покоя ( $G_0G_1$ ) и поздней фазе синтеза ДНК/начале митоза ( $G_2M$ ) между тремя группами животных — не выявлено (рис. 1, а, б).

При исследовании апоптоза тимоцитов у животных с гепатомой 22а было выявлено значительное увеличение доли клеток, находящихся в поздней фазе апоптоза, по сравнению с тем же показателем у контрольных животных без опухолей ( $10 \pm 0,9\%$  в контроле и  $25,9 \pm 6,1\%$  у животных опухоленосителей  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ). При этом относительное содержание клеток, находящихся в фазе раннего апоптоза, не менялось (рис. 2, а). Эти результаты подтверждают данные, полученные нами ранее с помощью других методов — морфологического анализа и дифениламинового теста [11, 12].

Для того, чтобы установить, какие популяции тимоцитов наиболее подвержены развитию апоптоза при росте гепатомы 22а, был проведен субпопуляционный анализ. Оказалось, что достоверное повышение апоптоза наблюдалось только среди двойных позитивных клеток (DP) и не вы-

являлось среди других популяций: двойных негативных (DN) и единичных позитивных (SP4 и SP8) (рис. 2, а). Причем среди DP клеток было существенно увеличено относительное содержание тимоцитов, находящихся в фазе позднего, но не раннего апоптоза (рис. 2, а, б). Прием цинка заметно снижал повышенный уровень позднего апоптоза среди DP тимоцитов у животных с гепатомой 22а, хотя он и оставался выше контрольного уровня (у мышей без опухолей) (рис. 2, б, в).

Таким образом, у животных на 3 неделе роста гепатомы 22а наблюдали выраженные нарушения тимопоэза (снижение пролиферативной активности и усиление апоптоза тимоцитов), показатели которых оставались близкими к нормальному уровню в том случае, если эти животные дополнительно получали цинк с питьевой водой.

Далее необходимо было ответить на вопрос, как дополнительный прием цинка влияет на содержание цинка в тимусе и в какой мере функциональные изменения тимоцитов связаны с этим показателем. При исследовании общего содержания цинка в тимусе с помощью атомно-абсорбционной спектроскопии было выявлено снижение этого показателя в группе мышей с гепатомой 22а и отсутствие снижения в группе животных, получавших цинк (рис. 3).

## Обсуждение

Цинк является одним из важнейших микроэлементов. Он является либо структурным элементом, либо используется для активации более чем 300 ферментов, а также входит в состав еще большего числа транскрипционных факторов и других металлопротеинов [16–18]. Цинк необходим для пролиферации и дифференцировки всех клеток, но особенно для Т-лимфоцитов. Он содержится в ДНК и РНК полимеразах, тимидин киназе, а также в тимусной терминальной нуклеотидилтрансферазе (TdT), участвующей в реаранжировке генов Т-клеточного рецептора (TCR). Кроме того, цинк считается физиологическим ингибитором апоптоза. Он проявляет действие на разных этапах этого процесса, в т. ч., блокирует активацию каспаз, необходимых для запуска и реализации апоптоза [19].

Одним из характерных проявлений дефицита цинка в организме животных является инволюция тимуса, сопровождающаяся снижением числа тимоцитов и увеличением апоптоза среди DP клеток [20]. Восполнение пищевого дефицита цинка нормализует показатели апоптоза тимоцитов [21]. Прием цинка с питьевой водой восстанавливает массу и клеточность тимуса у старых мышей [22, 23], а также повышает у них пролиферативный ответ тимоцитов на митогены и цитокины [24].

В проведенных нами исследованиях впервые удалось установить, что прием цинка с питьевой водой животными с гепатомой 22а не только сохраняет массу и клеточность тимуса, как показано ранее [10], но также способствует сохранению функциональной активности тимоцитов, поддерживая их пролиферативную способность и препятствуя развитию апоптоза.

Полученные данные позволили сделать предположение о том, что инволюция тимуса при росте гепатомы 22а связана с дефицитом цинка, а коррекция уровня содержания цинка препятствует прогрессированию негативных процессов в вилочковой железе. Поэтому на следующем этапе работы проводилась оценка уровня содержания цинка в тимусе и его изменения после дополнительного приема цинка. Было впервые показано, что содержание цинка в тимусе мышей с гепатомой 22а снижено, а после приема цинка восстанавливается до контрольного уровня. Однако степень изменений этого показателя у животных с гепатомой 22а была слабо выражена — снижение в 1,1 раза по отношению к контрольным значениям, что ставит под сомнение взаимосвязь инволюции тимуса с недостаточностью цинка в тимусе. Для сравнения другие показатели изменялись более значительно: апоптоз среди DP тимоцитов увеличивался в 3,2 раза, число клеток в S фазе снижалось в 1,8 раза, а масса и клеточность тимуса, как показано ранее, снижались в 3 раза [10].

Это несоответствие можно объяснить следующим образом. Измерение содержания цинка в тимусе проводили с помощью атомно-абсорбционной спектрометрии. Этот метод определяет содержание общего цинка, состоящего из двух основных пулов: одного, фиксированного, структурно связанного с металлопротеинами и хелатируемого, составляющего 80–90 % клеточного цинка, и другого, значительно меньшего по содержанию, динамичного, так называемого лабильного пула цинка, который легко изменяется при дефиците или избытке ионов данного металла [17]. Лабильный пул цинка обычно выявляют с помощью флуоресцентных проб и именно с этим пулом внутриклеточного цинка связывают регуляцию апоптоза [19]. Содержание общего цинка в тимусе, по-видимому, является недостаточно информативным показателем и не отражает те негативные процессы, которые сопровождают процесс инволюции этого органа.

Таким образом, изучение содержания общего цинка не выявило существенных данных, подтверждающих роль внутритимусного дефицита этого микроэлемента в развитии инволюции вилочковой железы. Однако после приема сульфата цинка мы наблюдали у мышей с гепатомой 22а значительное улучшение

функциональных показателей тимоцитов, таких как повышение пролиферативной активности и снижение апоптоза.

Усиление апоптоза тимоцитов характерно не только для роста гепатомы 22а, но наблюдается также при многих других перевиваемых опухолях [5, 25, 26]. У животных с раком молочной железы или карциномой Эрлиха повышение этого показателя связано со снижением соотношения про-апоптотических и анти-апоптотических белков Bcl-2/Bax в тимоцитах [5, 25]. В то же время известно, что добавление цинка может повышать соотношение Bcl-2/Bax и тем самым ингибировать развитие апоптоза в клетках U937 *in vitro* [27]. На основании данных литературы можно предположить, что основным механизмом положительного действия заключается в ингибирующем влиянии цинка на апоптоз и от этого зависит нормализация остальных показателей.

### Заключение

В работе проведен анализ положительного действия ионов цинка на вилочковую железу при росте сингенной перевиваемой гепатомы 22а и впервые показано, что пероральный прием сульфата цинка позволяет значительно улучшить такие функциональные показатели, как пролиферация и жизнеспособность тимоцитов. Прием цинка имеет большие перспективы для коррекции нарушений функций тимуса и нормализации лимфопении у онкологических больных. В литературе уже описан положительный опыт перорального применения высоких доз цинка для восстановления функций тимуса у больных множественной миеломой после пересадки гемопоэтических стволовых клеток [28]. Клиническая востребованность новых стратегий по восстановлению функций тимуса у больных с различными новообразованиями обуславливает необходимость дальнейшего исследования механизмов действия солей цинка на процессы созревания и дифференцировки тимоцитов.

### Благодарности

Авторы приносят благодарность доктору биологических наук, профессору Л.В. Пучковой и кандидату биологических наук 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» FGWG-2022-0005 (рег. № 122020300186-5).

*Участие авторов*

Зеленский Е.А. — постановка экспериментов, работа с животными, статистический анализ, подбор литературы;

Трулев А.С. — ведение культуры клеток;

Рутто К.В. — работа с иллюстрациями;

Кудрявцев И.В. — учет результатов с помощью проточной цитометрии;

Соколов А.В. — обсуждение результатов, написание статьи;

Киселева Е.П. — автор идеи, дизайн исследования, написание статьи.

## ЛИТЕРАТУРА

- Mitchell WA, Lang PO, Aspinall R. Tracing thymic output in older individuals. *Clin Exp Immunol.* 2010;131:497–503. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04209.x.
- Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T cell development, localization, and function throughout life. *Immunity.* 2018;48(2):202–213. doi:10.1016/j.immuni.2018.01.007.
- Liu YY, Yang QF, Yang JS, et al. Characteristics and prognostic significance of profiling the peripheral blood T-cell receptor repertoire in patients with advanced lung cancer. *Int J Cancer.* 2019;145(5):1423–1431. doi:10.1002/ijc.32145.
- Guo L, Bi X, Li Y, et al. Characteristics, dynamic changes, and prognostic significance of TCR repertoire profiling in patients with renal cell carcinoma. *J Pathol.* 2020;251(1):26–37. doi:10.1002/path.5396.
- Carrio R, Lopez DM. Insights into thymic involution in tumor-bearing mice. *Immunol Res.* 2013;57(1-3):106–114. doi:10.1007/s12026-013-8446-3.
- Cardinale A, De Luca CD, Locatelli F, et al. Thymic function and T-cell receptor repertoire diversity: implications for patient response to checkpoint blockade immunotherapy. *Front Immunol.* 2021;12:752042. doi:10.3389/fimmu.2021.752042.
- Kinsella S, Dudakov JA. When the damage is done: injury and repair in thymus function. *Front Immunol.* 2020;11:1745. doi:10.3389/fimmu.2020.01745.
- Velardi E, Tsai JJ, van den Brink MRM. T cell regeneration after immunological injury. *Nat Rev Immunol.* 2021;21:277–291. doi:10.1038/s41577-020-00457-z.
- Hakim FT. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *J Clin Invest.* 2005;115:930–939. doi:10.1172/JCI22492.
- Зеленский Е.А., Рутто К.В., Соколов А.В., Киселева Е.П. Прием цинка тормозит развитие инволюции тимуса при опухолевом росте у мышей. *Вопросы онкологии.* 2021;67(3):436–441 [Zelenskiy EA, Rutto KV, Sokolov AV, Kisseleva EP. Zinc supplementation prevents the development of thymic involution induced by tumor growth in mice. *Voprosy Onkologii.* 2021;67(3):436–41 (In Russ.)]. doi:10.37469/0507-3758-2021-67-3-436-441.
- Киселева Е.П., Суворов А.Н., Огурцов Р.П. Роль апоптоза в процессе инволюции тимуса при росте сингенной пересаживаемой опухоли у мышей. *Известия АН Серия Биологическая.* 1998;(2):172–179 [Kisseleva EP, Suvorov AN, Ogurtsov RP. The role of apoptosis in the thymic involution during growth of the syngeneic transplanted tumor in mice. *Biology Bulletin.* 1998;25(2):129–135].
- Киселева Е.П., Огурцов Р.П., Доценко Е.К. Влияние метаболических факторов на апоптоз тимодитов при опухолевом росте. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2003;135(5):558–561 [Kisseleva EP, Ogurtsov RP, Dotsenko EK. Effect of metabolic factors on apoptosis in thymocytes during tumor growth. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2003;135(5):475–477].
- Зеленский Е.А., Рутто К.В., Кудрявцев И.В. и др. Содержание железа и пролиферация клеток в тимусе и селезенке мышей при росте гепатомы 22А. *Цитология.* 2021;63(2):116–126 [Zelenskiy EA, Rutto KV, Kudryavtsev IV, et al. Iron content and cellular proliferation in thymus and spleen of hepatoma 22a bearing mice. *Cell and Tissue Biology.* 2021;15(4):393–401]. doi:10.1134/S1990519X21040118.
- Darzynkiewicz Z, Huang X. Analysis of cellular DNA content by flow cytometry. *Current Protocols in Immunology.* 2004. Chapter 5: Unit 5.7. doi:10.1002/0471142735.im0507s60.
- Mindukshev I, Kudryavtsev I, Serebriakova M, et al. Flow cytometry and light scattering technique in evaluation of nutraceuticals. *Nutraceuticals.* 2016:319–32. doi:10.1016/B978-0-12-802147-7.00024-3.
- Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev.* 1993;73:79–118. doi:10.1152/physrev.1993.73.1.79.
- Haase H, Rink L. Zinc signals and immune function. *BioFactors.* 2014;40:27–40. doi:10.1002/biof.1114.
- Wang C, Zhang R, Wei X et al. Metalloimmunology: the metal ion-controlled immunity. *Adv Immunol.* 2020;145:187–241. doi:10.1016/bs.ai.2019.11.007.
- Truong-Tran AQ, Carter J, Ruffin RE, et al. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. *Biometals.* 2001;14(3-4):315–330. doi:10.1023/a:1012993017026.
- King LE, Frenzel JW, Mann JJ, et al. Chronic zinc deficiency in mice disrupted T cell lymphopoiesis and erythropoiesis while B cell lymphopoiesis and myelopoiesis were maintained. *J Am College Nutr.* 2005;24:494–502. doi:10.1080/07315724.2005.10719495.
- Kido T, Suka M, Yanagisawa H. Effectiveness of interleukin-4 administration or zinc supplementation in improving zinc deficiency-associated thymic atrophy and fatty degeneration and in normalizing T cell maturation process. *Immunology.* 2022;165(4): 445–459. doi:10.1111/imm.13452.
- Mocchegiani E, Santarelli L, Muzzioli M, et al. Reversibility of the thymus involution and of age-related peripheral immune dysfunction by zinc supplementation in old mice. *Int J Immunopharmacol.* 1995;17(9):703–718. doi: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. *J Nutr.* 2009;139(7):1393–1397. doi:10.3945/jn.109.106021.
- Saha AR, Hadden EM, Hadden JW. Zinc induces thymulin secretion from human thymic epithelial cells in vitro and augments splenocyte and thymocyte responses in vivo. *Int J Immunopharmacol.* 1995;17:729–733. doi:10.1016/0192-0561(95)00061-6.
- Mandal D, Bhattacharyya A, Lahiry L, et al. Failure in peripheral immuno-surveillance due to thymic atrophy: importance of thymocyte maturation and apoptosis in adult tumor-bearer. *Life Sciences.* 2005;77:2703–2716. doi:10.1016/j.lfs.2005.05.038.
- Song Y, Yu R, Wang C, et al. Disruption of the thymic microenvironment is associated with thymic involution of transitional cell cancer. *Urol Int.* 2014; 92(1):104–115. doi:10.1159/000353350.
- Fukamachi Y, Karasaki Y, Sugiura T, et al. Zinc suppresses apoptosis of U937 cells induced by hydrogen peroxide through an increase of the Bcl-2/Bax ratio. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;246(2):346–369. doi:10.1006/bbrc.1998.8621.

28. Iovino L, Mazziotta F, Carulli G, et al. High-dose zinc oral supplementation after stem cell transplantation causes an increase of TRECs and CD4<sup>+</sup> naive lymphocytes and prevents TTV reactivation. *Leuk Res.* 2018;70:20-24. doi:10.1016/j.leukres.2018.04.016.

Поступила в редакцию 24.11.2022  
 Прошла рецензирование 20.03.2023  
 Принята в печать 20.04.2023

*E.A. Zelenskiy<sup>1</sup>, A.S. Trulioff<sup>1</sup>, K.V. Rutto<sup>1</sup>,  
 I.V. Kudryavtsev<sup>1</sup>, A.V. Sokolov<sup>1</sup>, E.P. Kisseleva<sup>1,2</sup>*

### **The influence of zinc sulfate on proliferation and apoptosis of thymocytes from tumor-bearing mice**

<sup>1</sup>FSBSI Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, the Russian Federation

<sup>2</sup>North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, the Russian Federation

**Aim.** To investigate the influence of zinc supplementation on functional activity of thymocytes during the growth of transplanted tumor hepatoma 22a in mice.

**Materials and Methods.** Inbred C3HA mice received zinc sulfate in drinking water at a concentration of 22 µg/mL for three weeks, beginning on the first day after subcutaneous inoculation of syngeneic hepatoma 22a cells. On the 21st day of tumor growth,

the mice were euthanized, and their thymuses were extracted and evaluated for thymocyte proliferative activity, apoptosis, and zinc content. Proliferation (cell cycle analysis) was performed using DAPI staining for flow cytometry. Cell apoptosis was evaluated using DAPI and YO-PRO staining. Zinc content in the thymus was measured using atomic absorption spectroscopy.

**Results.** At 21 days of tumor growth, thymocyte apoptosis increased 2.5-fold, while the proportion of thymocytes in S phase (DNA synthesis phase) decreased 1.8-fold. Apoptosis was mainly observed in the population of double-positive CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes, showing a 3.2-fold increase compared to the control. Zinc supplementation normalized the proliferative activity (proliferative index and proportion of cells in S phase) and reduced the relative proportion of thymocytes in apoptosis. Additionally, zinc sulfate supplementation increased the zinc content in the thymus.

**Conclusion.** Oral zinc supplementation inhibits thymus involution in mice with hepatoma 22a and significantly improves the functional activity of thymocytes. Such mice maintain normal levels of proliferative activity of thymocytes, and exhibit substantially lower rates of apoptotic cells than animals not receiving zinc sulfate. This study suggests that oral zinc supplementation is a promising strategy for developing new approaches for thymus regeneration in cancer patients.

**Keywords:** thymic involution; thymocytes; zinc; hepatoma 22a; proliferation; apoptosis

**For citation:** Zelenskiy EA, Trulioff AS, Rutto KV, Kudryavtsev IV, Sokolov AV, Kisseleva EP. The influence of zinc sulfate on proliferation and apoptosis of thymocytes from tumor-bearing mice. *Voprosy Onkologii.* 2023;69(3):437-443. doi: 10.37469/0507-3758-2023-69-3-437-443

### **Сведения об авторах:**

*Зеленский Евгений Александрович*, аспирант отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова д.12; ez1506@mail.ru.

*Трулев Андрей Сергеевич*, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова д.12; trulioff@gmail.com.

*Кудрявцев Игорь Владимирович*, канд. биол. наук, доц., заведующий лабораторией клеточной иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова д.12; igorek1981@yandex.ru.

*Рутто Кристина Валерьевна*, канд. биол. наук, науч. сотр. отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова д.12, krispins-90@mail.ru.

*Соколов Алексей Викторович*, д-р биол. наук, заведующий лабораторией биохимической генетики отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова д.12; biochemsokolov@gmail.com.

*Киселева Екатерина Прохоровна*, д-р мед. наук, доц., вед. науч. сотр. отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова д.12; профессор кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., д.47; ekissele@yandex.ru.

*Zelenskiy Evgeny Aleksandrovich*, PG student, Department of Immunology, FSBSI Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov St., Saint Petersburg, 197022, Russia, email: ez1506@mail.ru.

*Trulioff Andrey Sergeevich*, PhD (Bio.), Senior Researcher, Department of Immunology, FSBSI Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov St., Saint Petersburg, 197022, Russia, email: trulioff@gmail.com.

*Rutto Kristina Valerievna*, PhD (Bio.), Researcher, Department of Immunology, FSBSI Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov St., Saint Petersburg, 197022, Russia, email: krispins-90@mail.ru

*Kudryavtsev Igor Vladimirovich*, PhD (Bio.), Assoc. Prof., Head of the Laboratory of Cellular Immunology, Department of Immunology, FSBSI Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov St., Saint Petersburg, 197022, Russia, email: igorek1981@yandex.ru.

*Sokolov Alexey Viktorovich*, DSc (Bio.), Head of the Laboratory of Biochemical Genetics, Department of Molecular Genetics, FSBSI Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov St., Saint Petersburg, 197022, Russia, email: biochemsokolov@gmail.com.

*Kisseleva Ekaterina Prochorovna*, DSc (Med.), Assoc. Prof., Leading Researcher, Department of Immunology, FSBSI Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov St., Saint Petersburg, 197022, Russia; Professor of Medical Microbiology Department, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, 47 Piskarevsky Prospekt, Saint-Petersburg, 195067, Russia, email: ekissele@yandex.ru.