

Ю.Я. Гріневич, Г.Д. Бендюг, Н.М. Храновська, Ю.М. Білокінь, О.М. Остапенко

## Вплив тироксину і тималіну на проліферацію та апоптоз тимоцитів у щурів після тиреоїдектомії

*Установлено, що у крыс через 3 мес после удаления щитовидной железы наблюдается угнетение эндокринной функции тимуса, снижение его массы и клеточности. Эти изменения прежде всего обуславливаются ослаблением пролиферативных процессов в тимусе и снижением индекса пролиферативной активности. В группах животных, которые в послеоперационном периоде получали заместительную гормонотерапию тироксином и курсы тималина, такие нарушения либо не возникают, либо носят менее выраженный характер.*

### ВСТУП

Тимус являє собою систему взаємопов'язаних і динамічних компонентів, де різноманітні процеси супроводжуються поширенням тимоцитів і коригуються їх загибеллю. Ця рівновага має лише кількісний характер, оскільки відбувається відбір і диференціювання клітин Т-ряду [11, 14]. Встановлено, що фізіологічна загибель тимоцитів може відбуватися через апоптоз [10]. Однак високий ступінь загибелі клітин, що відбувається в тимусі, повинен бути компенсований інтенсивною проліферацією. Саме вона визначає заповнення тимуса клітинами. Отже, комбінація процесів проліферації та апоптозу тимоцитів є важливим при відборі їх клонів і є основою для контролю за диференціюванням Т-лімфоцитів, формуванням імунної системи та реалізацією імунологічного захисту організму [5, 11].

Як ендокринний орган, тимус тісно пов'язаний з іншими залозами внутрішньої секреції, зокрема з щитовидною, і тому досить чутливо реагує на зміну гормонального балансу організму [4, 8, 9, 13]. При експериментальному гіпотиреозі, який розвивається внаслідок видалення щитовидної залози, у дослідних тварин разом зі зміною стану гіпофізарно-тиреоїдної сис-

теми, спостерігається ослаблення ендокринної функції тимуса [2,4]. Тиреоїдектомія викликає зміну морфоструктури тимуса, наприклад пролонговану атрофію його мозкового шару [1].

У пошуку препаратів, за допомогою яких стабілізується фізіологічна загибель клітин через апоптоз на генетично детермінованому рівні, перспективним може бути дослідження пептидних біорегуляторів – фізіологічно активних речовин органного походження, які володіють вираженими гомеостатичними ефектами [3]. Один із них – тималін, що може запобігати процесам апоптозу тимоцитів завдяки підвищенню експресії антиапоптичних (bcl-2) і зниженню рівня проапоптичних (CD95 та p53) факторів [7].

Мета нашої роботи дослідження зміни процесів апоптозу та проліферації тимоцитів, як двох складових відповіді на стимуляцію, за умов гіпотиреозу під впливом замісної гормонотерапії тироксином та введення препарату тимічного походження – тималіну.

### МЕТОДИКА

Досліди проведено на 42 щурах-самцях масою 80–100 г, віком 6–8 тиж (розведення

віварію Інституту онкології АМН України). Тварин було поділено на п'ять груп (по 7–9 щурів у кожній). Контрольну (I групу) склали псевдооперовані тварини. Щурам дослідних груп (I–V) було здійснено тиреоїдектомію під ефірним наркозом. До II групи ввійшли щури, які отримували 1 мл дистильованої води, до III групи – тварини, які отримували тироксин (Tuthyrox 75, “Merck RyaA”, Німеччина) в дозі 2 мкг/кг щодобово у вигляді водного розчину об'ємом 1 мл, *per os*, упродовж 3 міс, до IV групи – тималін (“Біофарма”, Україна), який вводили підшкірно по 0,2 мл у дозі 0,2 мкг/кг протягом 5 діб, усього 4 курси з перервою 2 тиж, до V групи – тироксин і тималін.

Після закінчення введення препаратів тварин зважували і декапітували під ефірним наркозом. Визначали масу тимуса, кількість його клітин і тимусний індекс (відношення маси тимуса до маси тіла).

Ендокринну функцію тимуса оцінювали за вмістом тимуліну, який визначали в тесті *Wash* і співавт. [12]. Для дослідження рівнів спонтанного та індукованого апоптозу, проліферації тимоцитів частину тимуса кожної тварини забирали у флакони з 2 мл фосфатного буфера. Отримували суспензію клітин і культивували в пеніцилінових флаконах у середовищі RPMI з додаванням 300 мкг/мл глутаміну, 100 мкг/мл гентаміцину та 10 % сироватки ембріонів теляти. Як стимулятор використовували L-ФГА (“Sigma”) в масовій концентрації 20 мкг/мл [6]. Культивування здійснювали в CO<sub>2</sub>-інкубаторі протягом 3 діб. Вміст ДНК у тимоцитах оцінювали протоковцитометричним методом після їх фарбування флюорохромом (пропідій йодид), який селективно зв'язується з ДНК в ядрі клітини [16].

Метод визначення рівня апоптозу базується на відомому факті втрати клітинами в процесі їх запрограмованої загибелі частини ДНК внаслідок її міжнуклеосомної фрагментації. Аналіз розподілу клітин за фазами мітотичного циклу визначали

протоковцитометричним методом [15] з нашими модифікаціями, відокремлюючи окремі клітинні ядра. Фарбування клітин проводили за допомогою флюорохромного барвника пропідію йодиду.

Клітини у кількості 10<sup>6</sup> на пробу після одноразового відмивання в 5 мл фосфатного буфера при 200 г протягом 10 хв ресуспендували в 1 мл гіпотонічного буфера (0,1 %-й цитрат натрію, 0,1 %-й тритон X-100, 5 мкг/мл PI, “Sigma Chemical Co”, США). Після обережного струшування клітини інкубували при 22–25 °C протягом 30 хв у темряві.

Аналізи проводили на приладі FACScan (“Becton Dickinson”, США), що обладнаний аргонним лазером з довжиною хвилі 488 нм, з використанням програми CellQuest для комп'ютерів Mac. Флуоресценцію PI вимірювали, використовуючи вузькополосний фільтр 585/42 нм.

Визначали індекс проліферативної активності (ІПА); відношення відсоткового показника кількості клітин проліферативного пулу до відсоткового показника кількості клітин, що знаходяться за умов апоптозу.

Для оцінки вмісту клітин в основних фазах мітотичного циклу (G<sub>1/0</sub>, S, G<sub>2</sub>+M) гістограми розподілу обробляли за допомогою спеціалізованої математичної програми Mod Fit LT 2.0 (BDIS, USA) для комп'ютерів Mac.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

З наведених у табл. 1 результатів видно, що тиреоїдектомія викликає зниження маси тіла тварин (II група) до 110,0 г ± 10,2 г порівняно з 235,0 г ± 21,8 г у псевдооперованих тварин (I група). Введення самого тироксину (III група), так і в комплексі з тималіном (IV група) протягом 3 міс призводило до підвищення маси тіла тварин.

Після видалення щитовидної залози спостерігається зменшення маси тимуса

тварин, яка відновлюється під впливом як гормонотерапії тироксином, так і в комплексі з тималіном (див. табл. 1). У тварин зазначених груп відновлювалася також загальна кількість тимоцитів.

Як показали результати досліджень процесів проліферації та апоптозу в тимусі (табл. 2), через 3 міс після тиреоїдектомії у тварин не відбувається посилення процесів програмованої загибелі тимоцитів – показники спонтанного (що відбувається під час культивування) та стимульованого мітогеном (L-ФГА) апоптозу залишаються в межах значень, зареєстрованих у тварин I групи. Однак було відмічено суттєве порушення процесів проліферації тимоцитів. Так, рівень спонтанної проліферації був знижений в 2 рази, а індукована L-ФГА проліферативна відповідь тимоцитів – в 1,8 раза. Внаслідок цього ПА знижувався до 0,26 з 0,57 у псевдооперованих тварин.

Отримані нами результати свідчать, що замісна терапія тироксином викликала послаблення апоптотичних процесів у тимусі і одночасно посилювала спонтанну проліферацію тимоцитів ( $P < 0,05$ ). ПА при цьому збільшувався до 0,40. Проте показники спонтанної та індукованої проліферації в II групі тварин залишалися суттєво зниженими відносно відповідних значень у тварин контрольної групи. Незважаючи на

те, що тироксин вводили тваринам майже відразу після видалення щитовидної залози, отримані результати свідчать про недостатність однієї гормонотерапії тироксином для усунення розладів, що розвинулися в тимусі внаслідок тиреоїдектомії.

За цих умов більш ефективним було призначення тималіну. Майже не впливаючи на апоптотичну відповідь тимоцитів на ФГА і на рівень спонтанного апоптозу, тималін викликав істотну активацію проліферативних процесів, що визначалося як за показником спонтанної, так і індукованої ФГА проліферації тимоцитів ( $P < 0,05$  відносно показників у тварин після тиреоїдектомії). ПА в цьому випадку збільшувався до значень псевдооперованих щурів і становив 0,58. Це свідчить про те, що зазначені порушення в тимусі, асоційовані з дефіцитом тимічних факторів, які можуть дещо ліквідуватися у тварин після тиреоїдектомії, що отримували замісну гормонотерапію.

Наші результати свідчать про те, що призначення тваринам як самого тироксину, так і в комплексі з тималіном упродовж 3 міс після видалення щитовидної залози позитивно впливає і на ендокринну функцію тимуса. Так, на момент обстеження вміст тимуліну у тварин III–IV груп був значно вищим за такий у тварин після тиреоїд-

**Таблиця 1. Вплив тималіну на загальний стан тимуса щурів після тиреоїдектомії, котрі отримували замісну гормонотерапію тироксином**

Показник	Група тварин				
	I (n=7)	II (n=9)	III (n=9)	IV (n=9)	V (n=8)
Маса тіла, г	235,0±21,8	110,0±10,2*	136,1±6,7*	103,8±8,98*	164,00±9,92*.*
Маса тимуса, мг	254,5±45,4	121,6±6,4*	200,8±18,4*	120,4±8,4*	218,5±22,6**
Тимусний індекс	1,10±0,21	1,20±0,13	1,50±0,14	1,17±0,05	1,39±0,18
Кількість клітин у тимусі, 10 <sup>6</sup> /мг	0,31±0,06	0,32±0,06	0,55±0,047*.*	0,28±0,05	0,32±0,06
Всього, x 10 <sup>6</sup>	222,8±33,5	117,7±21,7	267,8±23,0**	124,20±22,8*	187,40±35,1**
Тимулін, -log <sub>2</sub> титру	5,25±0,27	1,30±0,55*	6,00±0,24**	5,50±0,12**	4,55±0,23**

Тут і в табл. 2: \* вірогідно відносно показників I групи тварин,  $P < 0,05$ ;

\*\* вірогідно відносно показників II групи тварин,  $P < 0,05$ .

ектомії (II група) і не відрізнявся від норми (див. табл. 1).

Отже, за результатами наших досліджень найбільш ефективною була схема, що передбачала сумісне застосування тироксину і тималіну. При цьому разом зі збільшенням загальної маси та кількості клітин у тимусі, нівелювалася незначна енергія тимоцитів щодо апоптотичних процесів, що визначалося за показниками спонтанного та індукованого апоптозу, які підвищувалися до значень у псевдооперованих тварин. Відомо, що апоптоз є активною формою реакції клітини не тільки на явно незаживну дію, але й на фізіологічну, в тому числі, активуючу [16]. Рівень же спонтанної проліферації у тварин цієї групи збільшувався майже до такого у псевдооперованих тварин (ІПА становив 0,57). Разом з тим, незважаючи на суттєве відносно показника у тварин після тиреоїдектомії тварин підвищення рівня проліферативної відповіді тимоцитів на L-ФГА, він не сягав такого, як у контрольних тварин і все ще залишався істотно зниженим.

Таким чином, у щурів через 3 міс після видалення щитовидної залози відбувається зниження ендокринної функції тимуса, зменшення його маси та кількості клітин. Ці зміни насамперед зумовлюються послабленням проліферативних процесів зі зниженням ІПА. В групах тварин, що отримували замісну гормонотерапію тирокси-

ном та курси тималіну в післяопераційному періоді, такі порушення не виникають або носять менш виражений характер.

Очевидно, що співвідношення процесів проліферації та апоптозу в тимусі є важливим показником, який відображає стан імунної системи організму. Отже, зазначена схема замісної гормонотерапії тироксином у поєднанні з препаратом тимічного походження – тималіном може бути використано з метою корекції імунологічних зрушень, асоційованих з функціональними та структурними розладами в центральному органі імунної системи – тимусі, які можуть розвинути внаслідок тиреоїдектомії.

**Yu. A. Grinevich, G.D. Bendyng, N.N. Khranovskaya, Yu.N. Belokon, A.N. Ostapenko**

#### **THE EFFECT OF COMBINED USE OF THYROXIN AND THYMALIN IN SUBSTITUTIVE HORMONOTHERAPY ON THE INTENSITY OF PROLIFERATION AND APOPTOSIS OF THYMOCYTES AFTER THYROIDECTOMIA**

It is found that 3 months after removal of thyroid gland in rats, a suppression of thymic endocrine function, loss of weight and cellularity occurs. These changes are mainly caused by a weakening of index of proliferative activity. In animals that postoperatively received substitutive thyroxin hormone therapy and courses of thymulin these disorders don't occur or they are not expressed significantly.

*Institute of Oncology, AMS of Ukraine, Kiev*

**Таблиця 2. Рівень спонтанного та індукованого L-ФГА апоптозу і проліферації тимоцитів щурів, що отримували гормонотерапію тироксином і тималіном, через 3 міс після тиреоїдектомії**

Показник	Група тварин				
	I	II	III	IV	V
Кількість клітин у апоптозі, %					
спонтанному	53,68 ± 1,70	56,48 ± 4,52	47,62 ± 3,59	44,96 ± 5,36	49,93 ± 5,78
індукованому	53,12 ± 2,36	52,06 ± 3,59	42,24 ± 4,73*, **	47,10 ± 7,54	54,99 ± 4,63
Кількість клітин проліферативного пулу, %					
спонтанного	30,53 ± 1,80	14,79 ± 1,83*	19,09 ± 2,42*, **	25,89 ± 1,25*, **	28,56 ± 3,24**
індукованого	51,36 ± 3,49	28,47 ± 1,24*	30,22 ± 2,48*	38,39 ± 2,42*, **	42,80 ± 1,93**
Індекс проліферативної активності	0,57	0,26	0,40	0,58	0,57

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бобро Л.И., Гриневич Ю.А., Бендюг Г.Д. Изменения органов иммуногенеза после тиреоидэктомии и гормональной коррекции в эксперименте // *Арх. патологии.* – 2002. – №5. – С. 45–50.
2. Гриневич Ю.А., Бендюг Г.Д., Югінова Л.Г., Селезньова Т.Н. Эндокринна функція тимуса при експериментальному гіпотиреозі // *Фізіол. журн.* – 2002. – **48**, №5. – С. 34–38.
3. Иммунология гормонов тимуса: Под ред. Гриневича Ю.А., Чеботарева В.Ф. – К.: Здоров'я, 1989. – 151 с.
4. Корнева Е.А., Шхинек Э.К. Гормоны и иммунная система. – Л.: Наука, 1988. – 250 с.
5. Никонова М. Ф., Григорьева Т. Ю., Литвина М. М. и др. Трипептид неоген усиливает апоптоз Т-лимфоцитов человека при их ответе на митоген // *Иммунология.* – 2000. – №4. – С.35–37.
6. Никонова М. Ф., Литвина М. М., Варфоломеева М. И. и др. Апоптоз и пролиферация как альтернативные формы ответа Т-лимфоцитов на стимуляцию // *Там же.* – 1999. – №2. – С.20–23.
7. Ножинова О.А., Рябенко В.В., Губенко І.Я., Кайдашев І.П. Вплив пептидних комплексів нирок та тимуса (тималіна) на процеси апоптозу лімфоцитів периферійної крові // *Імунологія і алергологія.* – 2000. – №1. – С. 63–65.
8. Савина Н.П. Поздний пострадиационный иммунодефицит как нарушения контроля и функции тимуса: роль межсистемных взаимодействий // *Мед. радиология и радиац. безопасность.* – 1999. – **44**, №1. – С. 44–63.
9. Шідловський В.О., Герасимчук П.О. Щитовидна, підгрудина залози та імунна система // *Лікар. справа.* – 1998. – №7. – С. 21–25.
10. Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме // *Патол. физиол. и эксперим. терапия.* – 1998. – №2. – С. 38–48.
11. Ярилин А. А., Пинчук В. Г., Гриневич Ю. А. Структура тимуса и дифференцировка Т-лимфоцитов. – К.: Наук. думка. – 1991. – 244 с.
12. Bach J.F., Dardenne M. Studies on thymus products. II. Demonstration and characterization of a circulating thymic hormone // *Immunology.* – 1973. – **25**. – P. 353–362.
13. Dardenne M., Savino W. Neuroendocrine control of the thymic epithelium: modulation of thymic endocrine function, cytorine expression and cell proliferation by hormones and peptides. *Progres in Neuroendocrin // Immunology.* – 1990. – **3**. – P. 18–25.
14. Durkin H. G., Waksman B. H. Thymus and tolerance. Is regulation the major function of the thymus? // *Immunological Reviews.* – 2001. – **182**. – P. 33–57.
15. Moorhead P.S., Nowele P.S., Mellman W.J., Battips D.M., Hungerford. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Cell. Res.* – 1960. – **20**, – №3. – P. 613–616.
16. Nicoletti G. Migliorati Pagliacci M.C. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry // *J. Immunol. Methods.* – 1991. – **139**. – P. 271–279.

*Ин-т онкології АМН України, Київ*

*Матеріал надійшов до редакції 25.02.2003*