

# Сравнительное исследование иммуномодулирующей активности пептидов — тинростима и тималина

Т. А. КУЗНЕЦОВА, Н. Н. БЕСЕДНОВА, Т. С. ЗАПОРОЖЕЦ, Т. П. СМОЛИНА, А. К. ГАЖА, Л. А. ИВАНУШКО

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова СО РАМН, Владивосток

## Comparative Study of Immunomodulatory Activity of Peptides, Tinrostim and Thymalin

T. A. KUZNETSOVA, N. N. BESEDNOVA, T. S. ZAPOROZHETS, T. P. SMOLINA, A. K. GAZHA, L. A. IVANUSHKO

G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology,  
Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Vladivostok

Проведено сравнительное исследование иммуномодулирующей активности пептидных препаратов: тинростима (лекарственной формы), полученного из оптических ганглиев кальмара, и фармакопейного — тималина. Выявлено стимулирующее влияние тинростима при парентеральном введении животным на гуморальный и клеточный иммунный ответ, а также на фагоцитарную активность нейтрофильных лейкоцитов, сопоставимое по эффекту с тималином. Установлено, что оба пептидных препарата усиливали продукцию про- (TNF $\alpha$ , IL-1) и противовоспалительных (IL-10) цитокинов в культуре интактных клеток периферической крови. Существенно, что при введении тинростима в 10-кратно различающихся дозах (0,005 мг/кг и 0,05 мг/кг) эффект меньшей дозы был сопоставим с эффектом большей дозы.

**Ключевые слова:** полипептиды, иммуномодуляторы, гуморальный и клеточный иммунный ответ, нейтрофильные лейкоциты, цитокины.

The immunomodulatory activity of peptide drugs: i.e. tinrostim (dosage form) prepared of squid optical ganglia and pharmacopoeia thymalin was studied. Tinrostim showed a stimulating effect on the humoral and cellular immune responses when administered parenterally in experimental animals, as well as on the phagocytic activity of neutrophils, comparable to the effect of thymalin. It was demonstrated that both the peptide drugs increased the production of pro-(TNF $\alpha$ , IL-1) and antiinflammatory (IL-10) cytokines in the culture of intact cells of peripheral blood *in vitro*. It is essential that when tinrostim was used in 10-fold different doses (0.005 mg / kg and 0.05 mg / kg) in mice, the effect of the lower dose was comparable to the effect of the higher dose.

**Key words:** polypeptides, immunomodulators, humoral and cellular immune responses, neutrophilic leukocytes, cytokines.

Исследование и внедрение в клиническую практику препаратов на основе иммунорегуляторных пептидов является актуальной проблемой, обусловленной необходимостью коррекции иммунодефицитных состояний, сопровождающих большинство заболеваний. К иммунорегуляторным пептидам относятся низкомолекулярные препараты, полученные на основе экстрактов из различных органов или тканей животных и, в первую очередь, из тимуса, селезёнки, костного мозга [1—3].

Регуляторные пептиды обладают полифункциональностью действия, т. е. способностью вызывать разнообразные по характеру и месту проявления физиологические ответы, действовать практически на все функции организма. Основными преимуществами низкомолекулярных пептидов являются быстрый ответ организма на их введение, высокая активность и отсутствие по-

бочных эффектов. Кроме того, иммунорегуляторные пептиды характеризуются тканеспецифичностью и отсутствием видоспецифичности и иммуногенности [3—6].

В последние годы число выявленных и идентифицированных иммунорегуляторных пептидов быстро увеличивается. Подробное изучение их физико-химических свойств, структуры и спектра биологической активности даёт возможность создания синтетических аналогов на основе природных биополимеров. Широкой известностью в экспериментальной и клинической практике пользуются такие пептидные препараты, как тималин, тимоген, тимозин, тимостимулин, тимоптин, Т-активин и их синтетические аналоги (тимозин альфа, тимоген, тимуноксин др.).

В клиниках России достаточно широко используется тималин — полипептид из тимуса теллят, содержащий 38 аминокислотных остатков, и проявляющий широкий спектр фармакологической активности. Препарат способствует восстановлению иммунологической реактивности организма, гемопоэза, гомеостаза, нейроэндокринной

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1. НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова

регуляции и применяется для лечения острых и хронических инфекционных заболеваний, гнойных осложнений хирургических вмешательств, ожогов, невынашивания беременности, гестоза, болезни Альцгеймера, ишемической болезни сердца, язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки и других патологических состояний [2, 7–9].

Совместными усилиями дальневосточных учёных получены новые эффективные оригинальные пептиды из морских беспозвоночных и рыб, в частности, тинростим из нервной ткани дальневосточных видов кальмаров. Проведены широкие экспериментальные исследования тинростима. На его основе получена биологически активная добавка к пище «Тинростим-С», разрешенная МЗ РФ к производству, реализации и применению на территории Российской Федерации в качестве иммунокорректора [10, 11], в стадии разработки находится лекарственная форма тинростима.

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение иммуномодулирующей активности лекарственной формы тинростима и фармакопейного препарата тималина.

## Материал и методы

Объекты исследования — лекарственная форма тинростима (тинростим) и фармакопейный препарат тималин («Самсон-Мед» ООО, Россия). Исследование тинростима проводили в сравнительном аспекте с тималином в соответствии с методическими рекомендациями [12].

Тинростим — комплекс пептидов, полученных из оптических ганглиев кальмаров промысловых видов. Препарат выделен путём экстракции водорастворимых пептидов в слабощелочных растворах с последующим извлечением их с использованием ступенчатой ультрафильтрации, позволяющей разделять и концентрировать пептидные компоненты в зависимости от их молекулярной массы. Тинростим состоит на 84% из низкомолекулярных пептидов с м. м. от 1 до 12,5 кДа и на 16% — из свободных аминокислот, представленных, в основном, аспарагиновой и глутаминовой кислотами и лизином, около 10 % составляет таурин [13]. Экспериментальная партия лекарственной формы тинростима предоставлена ФГУП Тихоокеанским рыбохозяйственным научным центром, произведена в ФГБУ «Пермский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский институт вакцин и сывороток».

В экспериментах *in vivo* дозы препаратов составили 0,05 мг/кг и 0,005 мг/кг при условии однократного подкожного или внутрибрюшинного введения мышам за сутки до исследования, в экспериментах *in vitro* — 0,1 мкг/мл и 10 мкг/мл.

Экспериментальные исследования по оценке влияния тинростима и тималина на гуморальный иммунный ответ (уровень антителообразующих клеток в селезёнке (АОК) к эритроцитам барана и титров сывороточных антител гемоглобулинов (ГА) и гемолизинов (ГЛ), реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) проведены на мышах линии (СВАхС57В1/6)F<sub>1</sub>, на фагоцитарную активность нейтрофильных лейкоцитов (НФ) — на неинбредных белых мышах-самцах массой 18–20 г. Работа выполнена с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных работах. Выведение животных из опыта осуществляли с использованием эфирного наркоза.

Влияние препаратов на пролиферативную активность лимфоцитов и на продукцию цитокинов изучали с использованием крови здоровых доноров. Пролиферативную активность лимфоцитов исследовали при помощи метода ДНК-цитометрии [14]. Количество клеток, находящихся в S/G2 M фазах клеточного цикла, определяли с помощью проточного цитофлуориметра (FACS Calibur «Becton Dickinson») и программного обеспечения CellQuest. Концентрацию цитокинов в супернатантах лимфоцитов периферической крови человека, преинкубированных с тинростимом или тималином, определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем ООО «Цитокин» (Россия) в соответствии с прилагаемой к наборам инструкцией.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы «Statistica-7».

## Результаты и обсуждение

При изучении гуморального иммунного ответа установлено, что парентеральное введение тинростима и тималина в дозе 0,05 мг/кг мышам (СВАхС57В1/6)F<sub>1</sub> оказывало умеренное стимулирующее влияние на процесс антителообразования, что выражалось в статистически значимом по сравнению с контролем увеличении числа АОК в селезёнке и титров антител (ГА и ГЛ) в сыворотке крови. Следует отметить, что в индуктивную фазу стимулирующее влияние тинростима на процесс антителообразования было более выражено по сравнению с таковым у тималина как по числу АОК в селезёнке ( $p=0,048$ ), так и титрам ГА ( $p=0,038$ ). Так, индекс стимуляции антителообразования под влиянием тинростима составил 2,1, под влиянием тималина — 1,4. При введении тинростима в продуктивную фазу стимулирующий эффект на гуморальный иммунный ответ был сопоставим с таковым у тималина (табл. 1).

Исследовано действие тинростима и тималина (концентрация обоих препаратов состави-

**Таблица 1.** Влияние тинростима и тималина на гуморальные факторы иммунитета мышей (СВАхС57В1/6)F<sub>1</sub>

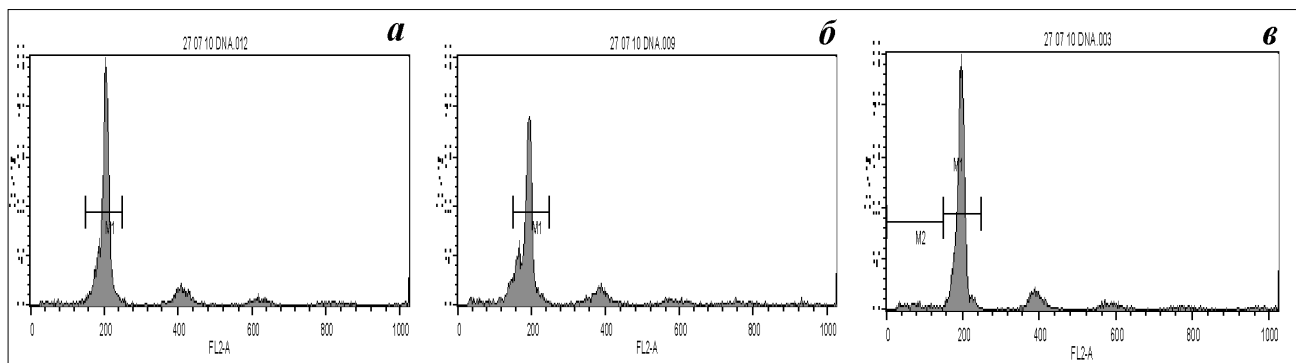
Условия введения	Тинростим			Тималин		
	АОК на селезёнку	ГА (log <sub>2</sub> )	ГЛ (log <sub>2</sub> )	АОК на селезёнку	ГА (log <sub>2</sub> )	ГЛ (log <sub>2</sub> )
Индуктивная фаза	97981±4562	9,33±0,21	8,67±0,33	65679±4217	8,25±0,52	7,5±0,5
<i>p</i>	0,000	0,000	0,000	0,001	0,045	0,013
Продуктивная фаза	87897±8083	8,67±0,42	8,5±0,22	94908±8179	8,67±0,49	8,33±0,33
<i>p</i>	0,000	0,002	0,000	0,000	0,003	0,000
Контроль	47271±2652	6,8±0,29	5,8±0,36	47271±2652	6,8±0,29	5,8±0,36

**Примечание.** Показатели  $M \pm m$ ; *p* — значимость различий по сравнению с контролем; в контрольной группе  $n=10$ , в опытных группах  $n=7$ .

**Таблица 2.** Продукция цитокинов в культуре клеток периферической крови доноров под влиянием тинростима и тималина *in vitro*

Цитокины	Уровень цитокинов в культуре интактных клеток, пг/мл		
	Тинростим	Тималин	Контроль
IL-1 $\beta$	1007,3 $\pm$ 401,3	630,5 $\pm$ 387,0	345,7 $\pm$ 206,5
<i>p</i>	0,01	0,034	
TNF $\alpha$	288,7 $\pm$ 258,5	209,4 $\pm$ 208,1	30,5 $\pm$ 27,3
<i>p</i>	0,035	0,041	
IL-10	569,7 $\pm$ 253,3	403,1 $\pm$ 224,2	82,5 $\pm$ 40,1
<i>p</i>	0,045	0,015	

**Примечание.** *Me* $\pm$ *SD* – медиана  $\pm$  среднее квадратичное отклонение; *p* – значимость различий показателей по сравнению с контролем; *n*=6.



**Гистограммы, иллюстрирующие влияние тинростима и тималина на пролиферативную активность лимфоцитов крови человека (количество клеток, находящихся в S/G2 M фазах клеточного цикла).**

По осям абсцисс – интенсивность флуоресценции клеток (в усл. ед.); по осям ординат – число событий с данным уровнем флуоресценции. Клетки окрашены раствором иодида пропидия в условиях, нарушающих целостность их мембраны. а – тинростим (0,1 мкг/мл); б – тималин (0,1 мкг/мл); в – контроль.

ла 0,1 мкг/мл) на продукцию про- (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) и противовоспалительных (IL-10) цитокинов (в системе *in vitro*). Было установлено значительное (7–9-кратное) стимулирующее влияние препаратов на продукцию TNF $\alpha$  ( $p=0,035$  и  $p=0,041$  соответственно). В меньшей степени проявлялось стимулирующее действие тинростима и тималина на продукцию IL-1 $\beta$  (увеличение в 2,9 раза,  $p=0,01$ , и в 1,8 раза,  $p=0,034$ , соответственно). В отношении IL-10 как тинростим, так и тималин вызывали умеренное (5–6-кратное) по отношению к контролю возрастание продукции этого цитокина ( $p=0,045$  и  $p=0,015$  соответственно) (табл. 2).

Влияние препаратов на клеточный иммунитет оценивали в двух модельных системах: *in vitro* – по пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови путём определения количества клеток, находящихся в S/G2 M фазах клеточного цикла, и *in vivo* – в реакции ГЗТ.

При оценке влияния тинростима на пролиферативную активность лимфоцитов установлено, что препарат в исследуемых концентрациях не оказывал статистически значимого эффекта: количество лимфоцитов в S/G2 M-фазе клеточного цикла под его влиянием в концентрациях 0,1 мкг/мл и 10 мкг/мл составило 14,4 $\pm$ 3,8% и 15,67 $\pm$ 4,1% соответственно при 14,6 $\pm$ 3,2% в кон-

троле ( $p>0,05$ ). Показатели, отражающие эффект тималина, были аналогичны: количество лимфоцитов в S/G2 M-фазе клеточного цикла под влиянием тималина в концентрациях 0,1 мкг/мл и 10 мкг/мл составило 17,7 $\pm$ 4,4% и 14,69 $\pm$ 3,2% соответственно ( $p>0,05$ ). В качестве примера приведены гистограммы ДНК-цитометрии лимфоцитов периферической крови донора X (рисунок).

Оценка результатов реакции ГЗТ показала, что введение тинростима и тималина в дозе 0,05 мг/кг на стадии сенсibilизации мышей (СВАхС57В1/6)F<sub>1</sub> не оказывало влияния на интенсивность этой реакции, о чем свидетельствует показатель процента прироста массы лапки, статистически не отличающийся от контрольного. Введение животным препаратов на стадии разрешения реакции ГЗТ приводило к увеличению её интенсивности ( $p=0,05$ ). Статистически значимых различий в эффектах тинростима и тималина на интенсивность реакции ГЗТ при введении препаратов как в стадию сенсibilизации, так и разрешения не было выявлено (табл. 3).

Исследование фагоцитарной активности нейтрофильных лейкоцитов показало, что при введении мышам тинростима как дозе 0,05 мг/кг, так и в дозе 0,005 мг/кг наблюдалось статистически значимое по сравнению с контролем увеличение фагоцитарного показателя (ФП) и фагоцитарно-

**Таблица 3.** Влияние тинростима и тималина на клеточные факторы иммунитета мышей (СВАхС57BL/6)<sub>F1</sub> по реакции гиперчувствительности замедленного типа

Условия введения (доза, фаза ответа)	Тинростим		Тималин	
	стадия сенсibilизации, %	стадия разрешения, %	стадия сенсibilизации, %	стадия разрешения, %
Опыт	40,4±3,2	50,6±2,5	41,5±3,8	46,1±2,9
Контроль	34,4±1,2	34,4±1,2	34,4±1,2	34,4±1,2
<i>p</i>	0,105	0,05	0,09	0,05

**Примечание.** Показатели  $M \pm m$ ; *p* – значимость различий по сравнению с контролем; в контрольной группе  $n=10$ , в опытных группах  $n=7$ .

**Таблица 4.** Влияние тинростима и тималина на фагоцитарную активность нейтрофильных лейкоцитов перитонеального экссудата мышей

Показатель	Контроль	Тинростим		Тималин	
		0,005 мг/кг	0,05 мг/кг	0,005 мг/кг	0,05 мг/кг
ФП, %	56,67±2,2	75,67±3,55	72,6±0,87	77,75±3,9	75,60±2,6
<i>p</i>		0,001	0,000	0,01	0,006
ФЧ, усл. ед.	1,56±0,12	2,21±0,21	2,57±0,24	2,98±0,40	2,71±0,30
<i>p</i>		0,022	0,003	0,005	0,004

**Примечание.** Показатели  $M \pm m$ ; *p* – значимость различий по сравнению с контролем;  $n=7$ .

го числа (ФЧ). Статистически значимых различий по показателям фагоцитарной активности под действием тинростима в 10-кратно различающихся дозах (0,05 мг/кг и 0,005 мг/кг) не выявлено ( $p > 0,05$ ). Тималин стимулировал показатели фагоцитоза в той же степени, что и тинростим (табл. 4).

Таким образом, лекарственная форма тинростима при парентеральном введении оказывает влияние на факторы врождённого и адаптивного иммунитета, стимулируя показатели гуморального и клеточного иммунного ответа, фагоцитарную активность нейтрофильных лейкоцитов, а в системе *in vitro* усиливает продукцию про- и противовоспалительных цитокинов. Стимулирующее действие тинростима на исследуемые показатели иммунного ответа было сопоставимо по эффекту с фармакопейным препаратом тималином.

Анализируя полученные результаты, особо следует остановиться на «рабочих» дозах этих препаратов. Согласно полученным нами ранее данным [15, 16], а также представленных выше результатов, эффективная доза тинростима для парентерального введения животным составляет 0,005–0,05 мг/кг. Следует отметить, что при введении тинростима в 10-кратно различающихся дозах (0,005 мг/кг и 0,05 мг/кг) эффект меньшей дозы был сопоставим с эффектом большей дозы. Исходя из этого, производили расчёт дозировки тинростима при конструировании БАД к пище «Тинростим-С», применение которой «*per os*» в комплексе с базисной терапией при различных соматических и инфекционных заболеваниях давало выраженный клинико-иммунологический эффект [17, 18]. Следует ожидать, что получение лекарственной формы тинростима для паренте-

рального введения приведёт к усилению эффективности действия этого препарата.

Что касается тималина, то рекомендованная для клинического применения доза составляет 10–20 мг на 70 кг или 0,1–0,3 мг/кг. В то же время, по данным В. Ф. Каменева, Ю. И. Журавлёва [19], только применение высоких доз тималина (50 мг на протяжении 4–5 дней) обеспечивало положительную динамику показателей иммунитета и гемостаза при ишемической болезни сердца или кардиальных проявлениях атеросклероза, тогда как низкие и средние дозы этого препарата (до 10 мг) в течение 10 дней не обеспечивали положительной динамики в течении этих заболеваний и не вызывали существенных изменений в иммунной и фибринолитической системах.

Кроме того, неоспоримым преимуществом тинростима, выделенного из нервной ткани кальмара, является отсутствие в его составе животного белка, а следовательно, и риска прионовой контаминации. В этой связи необходимо отметить, что тималин получен из природного сырья животного происхождения, которое может нести в себе опасность контаминации прионами, инфекционными агентами, протоонкогенами или нуклеиновыми кислотами. Для обеспечения максимальной защиты препарата от присутствия инфекционных агентов и ряда других потенциально опасных веществ требуется строгое соблюдение технологии производства тималина с использованием специальных методов экстракции и очистки, которые приводят к полной деградации крупномолекулярных белков и других веществ с сохранением в субстанции, используемой для производства препаратов, только пептидов с молекулярной массой, не превышающей 10 кДа [19].

## Заключение

Тинростим (лекарственная форма) при парентеральном введении экспериментальным животным оказывает стимулирующее влияние

на клеточные и гуморальные факторы врожденного и адаптивного иммунитета, сопоставимое по эффекту с фармакопейным препаратом тималином.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Беседнова Н.Н., Эпштейн Л.М.* Иммуноактивные пептиды из гидробионтов и наземных животных. Владивосток: ТИНРО-центр. 2004. 248.
2. *Бабиев Г.* Иммуноактивные пептиды и их координационные соединения в медицине. М.: 2009; 228.
3. *Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Малинин В.В.* Пептидные тимомиметики. СПб.: Наука, 2000; 158.
4. *Хавинсон В.Х., Кветная Т.В.* Регуляторные пептиды и гомеостаз. Рос хим журн 2005; XLIX: 1: 112—117.
5. *Целев В.Л.* Механизмы действия регуляторных пептидов при иммунодефицитных состояниях и воспалении: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. Чита, 2003; 41.
6. *Левицкая Н.Г., Каменский Л.П.* Регуляторные пептиды. Природа. 2003; 10; 20—27.
7. *Бондаренко Ф.Л.* Тималин в комплексной терапии больных гепатитом В. Иммунология 2001; 2: 42—45.
8. *Кузник Б.И., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х.* Цитомедины. СПб.: 1998; 305.
9. *Хавинсон В.Х., Морозов В.Г.* Геропротекторная эффективность тималина и эпителина. Успехи геронтологии. 2002; 10: 74—84.
10. *Акулин В.Н., Блинов Ю.Г., Эпштейн Л.М. и др.* Патент № 2105504, Российская Федерация. Пищевая биологически активная добавка «Тинростим-С». Заявитель и патентообладатель Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (ТИНРО-центр), № 96111534/13; 1996.06.05. 1998; 02. 27: 6.
11. Свидетельство о государственной регистрации RU 77.99.11.003.Е. 051620.11.11 от 29.11.2011.
12. *Хайтов Р.М., Пинегин Б.В., Латышева Т.В.* Методические указания по испытанию новых иммуномодулирующих лекарственных средств. Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств. 2002; 1: 32.
13. *Эпштейн Л.М., Боровская Г.А., Ковалев Н.Н. и др.* Патент № 2222337, Российская Федерация. Способ получения иммуностимулятора. Заявитель и патентообладатель Тихоокеанский рыбохозяйственный научный центр (ТИНРО-центр) — № 2002117863/13; 2004.07.03; 2004.01.27: 3.
14. *Jayat C., Ratinaud M.H.* Cell cycle analysis by flow cytometry: principles and applications. Biol Cell 1993; 78: 1—2: 15—25.
15. *Гажва А.К.* Иммуноактивный пептид из оптических ганглиев кальмара: Дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 1994; 124.
16. *Запорожец Т.С.* Клеточные и молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия биополимеров морских гидробионтов: Дис. ... д-ра мед. наук. Владивосток, 2006; 350.
17. *Беседнова Н.Н., Эпштейн Л.М.* Биологически активная добавка к пище тинростим (в помощь практическому врачу). Владивосток: ТИНРО-центр. 2003; 47.
18. *Кузнецова Т.А., Киняйкин М.Ф., Суханова Г.И., Беседнова Н.Н.* Применение тинростима для коррекции нарушений иммунитета и гемостаза в комплексном лечении пациентов с хронической обструктивной болезнью лёгких. Пульмонология. 2010; 1: 106—109.
19. *Каменев В.Ф., Журавлёв Ю.И.* Оценка эффективности лечения больных ишемической болезнью сердца высокими дозами тималина. Фундаментальные исследования. 2009; 4: 42—45.