

Б. М. Холназаров^{2, 3}, Н. Д. Бунятян^{1, 2}, Ю. В. Олефир^{1, 2}, Г. М. Бобизода³,
А. Б. Прокофьев^{1, 2}

ТОКСИЧЕСКИЕ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА КООРДИНАЦИОННОГО СОЕДИНЕНИЯ ДИПЕПТИДА ИЗОЛЕЙЦИЛ-ТРИПТОФАНА С ИОНОМ ЖЕЛЕЗА(II)

¹ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Россия, Москва.

² ФГБУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Минздрава России, Россия, Москва.

³ Таджикский государственный педагогический университет им. С. Айни, Республика Таджикистан, Душанбе.

Представлены результаты исследования токсикологических и фармакологических свойств координационного соединения иммуноактивного дипептида изолейцил-триптофана с ионом железа(II) — тимофера. Установлено, что тимофер является практически нетоксичным и проявляет высокую иммуностимулирующую активность при совместном применении с вакцинами против вирусных и микробных заболеваний.

Ключевые слова: иммуноактивные пептиды; координационные соединения; токсикологическая активность; фармакологическая активность; лекарственные средства.

В ряде работ [1 – 6] показано, что координационные соединения триптофансодержащих низкомолекулярных пептидов с ионами металлов (железа, цинка, серебра) обладают иммуноактивными и другими фармакологическими свойствами. Ранее описан синтез и получение лекарственной формы дипептида изолейцил-триптофан с ионом железа(II) (тимофер) [7, 8].

В настоящей работе приведены сведения о токсичности и иммуномодулирующей активности тимофера.

Экспериментальная часть

Изучение токсикологических свойств тимофера проводили в соответствии с действующими правилами доклинических исследований [7].

Острую токсичность и переносимость тимофера изучали на мышах и собаках. В опытах по определению "острой" токсичности тимофер вводили белым нелинейным мышам обоего пола массой 20 – 22 г внутримышечно однократно в общем объеме, не превышающем 0,5 мл, максимальном для данного вида животных. Вводимые дозы составляли 1000, 1500, 2000 и 2500 мкг/кг. В контрольных сериях экспериментов подопытным животным внутримышечно вводили 0,9 % раствор натрия хлорида.

Эксперименты по оценке переносимости тимофера проведены на 4 беспородных собаках обоего пола массой 8 – 12 кг. Препарат вводили внутримышечно в объеме 15 мл, допустимом для данного вида животных. Вводимая доза в данном случае составляла 1500 мкг/кг и в 650 раз превышала терапевтическую дозу для человека с учетом межвидового переноса доз. Животные наблюдались в течение 2 недель с начала эксперимента. Влияние тимофера на биохимические показатели крови изучали у крыс обоего пола при внутримышечном введении в течение 120 дней в дозах 8 и 80 мкг/кг.

При изучении эмбриотоксичности на белых нелинейных крысах оценивали пред- и постимплантационную эмбриональную смертность, морфологические (анатомические) пороки развития, а также общую задержку разви-

тия плодов при введении тимофера в дозах 8 и 80 мкг/кг, эквивалентных терапевтической и 10-кратной терапевтической дозе для человека с учетом межвидового переноса доз. Препаратом сравнения служил циклофосфамид, обладающий эмбриотоксическим действием, который вводили однократно на 12 день беременности в дозе 20 мг/кг (положительный контроль).

Специфическую фармакологическую активность тимофера в дозе 148 мкг/мл на 100 кг живой массы изучали при его совместном применении с ассоциированной вакциной против рота-, коронавирусных энтеритов и колибактериоза телят. Эксперимент проведен на 35 особях крупного рогатого скота, которые были разделены на 2 группы (опытную — 20 телят) и контрольную (15 телят). Ассоциированная формолвакцина против рота-, коронавирусных энтеритов и колибактериоза телят изготовлена во Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной ветеринарии им. Я. П. Коваленко. Вакцину вводили внутримышечно двукратно с интервалом 10 – 15 дней в дозах 5 мл.

Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что внутримышечное введение тимофера мышам в указанных дозах не влияет на состояние животных. После введения тимофера признаков интоксикации не наблюдали во всем диапазоне использованных доз.

При динамическом наблюдении за животными в течение 14 сут гибели среди подопытных животных не отмечали.

При анализе динамики массы тела, потребления корма и воды у подопытных животных существенной разницы по сравнению с контрольными группами мышей не обнаружено.

По результатам вскрытия, макро- и микроскопического исследования внутренних органов выживших экспериментальных животных, получавших опытный препа-

рат, каких-либо патологических изменений по сравнению с контрольными группами не обнаружено.

Потребление корма и воды, изменения в массе тела у собак, получавших тимофер, не отличались от обычного. При этом летальных исходов не зафиксировано. По результатам вскрытия, макро- и микроскопического исследования внутренних органов экспериментальных животных, получавших исследуемый препарат, каких-либо патологических изменений не обнаружено.

При изучении “хронической” токсичности тимофера, прежде всего, необходимо было подобрать дозы препарата для проведения подобного рода исследований. В данном случае в качестве ближайшего аналога выбран ранее разработанный и близкий по фармакологическим и химико-технологическим свойствам препарат тимоген (производитель ЗАО “Медико-биологический научно-производственный комплекс “Цитомед” (Санкт-Петербург), торговое название ТИМОГЕН®).

Разовая терапевтическая доза ранее изученного препарата тимогена для человека составляет 50 – 100 мкг дипептида (0,5 – 1 мл) при введении 1 раз в сутки.

Исходя из этого, базовая терапевтическая доза для тимофера также составляла 50 – 100 мкг (0,5 – 1 мл) 1 раз в сутки.

Нелинейным белым крысам обоего пола препарат вводили внутримышечно в течение 120 дней в дозах 8 и 80 мкг/кг, эквивалентных терапевтической и 10-кратной терапевтической дозе для человека с учетом межвидового переноса доз.

При введении тимофера на протяжении 120 дней в обеих дозах показатели периферической крови крыс (гемоглобин, эритроциты, лейкоциты, цветовой показатель, тромбоциты) подопытных групп не отличались достоверно от контроля.

Проведенные исследования показали, что тимофер не влияет на общее состояние крыс и не вызывает изменений биохимических показателей крови у подопытных животных (таблица).

Эксперименты на кроликах подтвердили полученные на крысах данные о том, что многократное (в течение 120 дней) ежедневное внутримышечное введение тимофера в

дозах 4 и 40 мкг/кг, эквивалентных терапевтической и 10-кратной терапевтической дозе для человека с учетом межвидового переноса доз, не приводит к изменениям в общем состоянии животных и не оказывает токсического действия на организм. Тимофер в обеих дозах не вызывал отклонений биохимических показателей крови. По результатам вскрытия, макро- и микроскопического исследования внутренних органов экспериментальных животных, получавших исследуемый препарат, каких-либо патологических изменений не обнаружено.

Таким образом, тимофер при длительном многократном введении не оказывает токсического действия на организм экспериментальных животных.

Результаты исследований эмбриотоксичности показали, что циклофосфамид в дозе 20 мг/кг и тимофер в дозах 8 и 80 мкг/кг при введении беременным крысам не влияли на число желтых тел в яичниках. На фоне введения обоих веществ у всех крыс наступала беременность. Введение циклофосфамида приводило к резорбции плодов практически у всех самок, в то время как тимофер не влиял на этот процесс.

Тимофер не оказывал эмбриолетального действия, в то время как циклофосфамид значительно повышал постимплантационную гибель в 7,25 раза. Оба вещества не вызывали предимплантационной гибели эмбрионов. Внутритрунная гибель плодов под влиянием циклофосфамида связана с повышением их смертности, как на ранних, так и на поздних сроках эмбриогенеза, о чем свидетельствует достоверное увеличение мест ранней и поздней резорбции. Циклофосфамид достоверно снижал приблизительно в 1,5 раза массу и длину эмбрионов. Тимофер, в отличие от циклофосфамида, не менял ни один из этих показателей.

Результаты изучения эмбриотоксического действия тимофера в дозах 8 и 80 мкг/кг продемонстрировали отсутствие существенных различий в плодовитости крыс опытных и контрольной групп. Среднее количество плодов на самку в контрольной группе составило $(9,7 \pm 0,22)$, а у крыс, получавших тимофер в дозах 8 и 80 мкг/кг — $(9,65 \pm 0,23)$ и $(9,8 \pm 0,23)$ соответственно. В группах крыс, получавших тимофер в обеих дозах, число

Влияние тимофера на биохимические показатели крови у крыс при введении в течение 120 дней ($n = 10$)

Доза, мг/кг	Условия опыта	Исследуемый показатель							
		глюкоза, мМ/л	общий белок, г/л	мочевина, мМ/л	аспартатами-нотрансфераза, мМ/ч · л	аланинамино-трансфераза, мМ/ч · л	щелочная фосфатаза, МЕ/л	холестерин, мМ/л	общий билирубин, мМ/л
8,0	Исход	$7,8 \pm 0,6$	$74,3 \pm 1,8$	$6,21 \pm 0,17$	$71,8 \pm 2,4$	$34,5 \pm 2,0$	$116 \pm 7,7$	$1,94 \pm 0,13$	$1,23 \pm 0,05$
	30 дней	$8,5 \pm 0,9$	$67,2 \pm 2,0$	$6,30 \pm 0,19$	$85,9 \pm 2,0$	$38,7 \pm 2,2$	$126 \pm 6,0$	$1,82 \pm 0,10$	$0,95 \pm 0,07$
	60 дней	$9,0 \pm 0,7$	$65,3 \pm 2,5$	$6,18 \pm 0,14$	$88,6 \pm 2,2$	$39,9 \pm 2,5$	$118 \pm 5,3$	$1,75 \pm 0,14$	$1,30 \pm 0,08$
	120 дней	$12,2 \pm 0,5$	$64,3 \pm 2,3$	$6,32 \pm 0,18$	$92,3 \pm 2,7$	$46,6 \pm 2,4$	$122 \pm 4,7$	$1,92 \pm 0,07$	$1,22 \pm 0,07$
80,0	Исход	$7,5 \pm 0,4$	$68,9 \pm 2,5$	$6,20 \pm 0,12$	$72,4 \pm 2,8$	$33,7 \pm 2,5$	$101 \pm 5,5$	$1,80 \pm 0,12$	$0,93 \pm 0,09$
	30 дней	$9,1 \pm 0,7$	$63,7 \pm 1,9$	$6,42 \pm 0,18$	$74,0 \pm 2,3$	$45,8 \pm 1,9$	$128 \pm 6,3$	$2,13 \pm 0,11$	$1,15 \pm 0,04$
	60 дней	$10,8 \pm 0,9$	$71,3 \pm 2,3$	$6,34 \pm 0,10$	$89,6 \pm 2,5$	$39,6 \pm 2,7$	$136 \pm 4,8$	$2,31 \pm 0,09$	$1,08 \pm 0,11$
	120 дней	$9,6 \pm 0,7$	$69,2 \pm 2,1$	$6,41 \pm 0,13$	$90,5 \pm 2,8$	$47,0 \pm 2,3$	$140 \pm 5,1$	$2,46 \pm 0,14$	$1,27 \pm 0,08$
Контроль	Исход	$8,0 \pm 0,5$	$67,6 \pm 1,9$	$6,34 \pm 0,18$	$78,3 \pm 2,3$	$36,3 \pm 2,0$	$95 \pm 7,6$	$1,89 \pm 0,10$	$0,93 \pm 0,06$
	30 дней	$8,9 \pm 0,9$	$69,1 \pm 2,0$	$6,27 \pm 0,14$	$80,9 \pm 2,7$	$40,7 \pm 2,2$	$101 \pm 6,0$	$1,96 \pm 0,07$	$1,12 \pm 0,09$
	60 дней	$10,2 \pm 0,4$	$67,8 \pm 1,7$	$6,31 \pm 0,11$	$79,4 \pm 2,4$	$38,3 \pm 1,9$	$113 \pm 8,0$	$2,18 \pm 0,15$	$0,82 \pm 0,07$
	120 дней	$9,6 \pm 0,8$	$64,6 \pm 1,9$	$6,29 \pm 0,17$	$82,7 \pm 2,2$	$40,4 \pm 2,1$	$109 \pm 5,5$	$2,16 \pm 0,09$	$11,4 \pm 0,10$

крысят не отличалось от контрольной группы, а циклофосфамид приводил к снижению их числа в 11,3 – 11,5 раза. Крысята, рожденные от самок опытных групп, не отличались от крысят контрольных самок. Проведенные морфологические исследования показали отсутствие аномалий развития внутренних органов и скелета плодов, рожденных от крыс опытных групп.

Циклофосфамид приводил к появлению специфических аномалий развития у зародышей, таких как краниолизис, отек, поли- и олигодактилия, анофтальмия, выпадение языка, микрогнатия. При изучении внутренних органов и скелета плодов крыс, получавших циклофосфамид, зарегистрированы различные аномалии головного мозга, небных отростков, почек, мочевого пузыря. В группах крыс, получавших тимофер, аномалии развития у плодов не зарегистрированы. Результаты исследования оссификации разных отделов скелета плодов крыс показали выраженное негативное влияние циклофосфамида, что проявлялось достоверным снижением длины и числа точек окостенения крупных костей. Тимофер в обеих дозах не оказывал влияния на эти процессы.

Наблюдение за состоянием потомства самок крыс, которые в течение всего периода беременности получали тимофер в обеих дозах, осуществляли в течение 1 мес. У крысят регистрировали массу тела, силовую выносливость, сроки опушения, открытия глаз, отлипание ушной раковины. Результаты исследований показали, что тимофер в изученных дозах не оказывает тератогенного действия. Не наблюдалось аномалий и уродств, масса крысят и их силовая выносливость, оцененная по времени подвисяния на горизонтальном стержне, через 1 мес после рождения не отличались от показателей контрольных групп.

Таким образом, тимофер в терапевтической и 10-кратной терапевтической дозе не оказывает негативного влияния на ход беременности и на развитие потомства крыс.

При изучении специфической фармакологической активности тимофера при его совместном применении с ассоциированной вакциной против рота-, коронавирусных энтеритов и колибактериоза телят выбор вакцины был обусловлен тем, что она включает антигены вирусного и бактериального происхождения. До иммунизации в сыворотке крови коров содержались антитела к ротавирусу в ИФА в титре $2,5 \log_2$, к коронавирусу в РТГА — $3 \log_2$, к *Escherichia coli* — 1:50. После иммунизации уровень

титра антител к ротавирусу в ИФА у животных первой и второй групп достигал соответственно 8,0 и $6,5 \log_2$, к коронавирусу в РТГА — $9,3$ и $7,5 \log_2$, и к *E. coli* коли в РА — 1:1600 и 1:800. Лизоцимная и бактерицидная активность сыворотки крови животных до применения препарата составляла 65 и 3,1 % соответственно.

В группе животных, получавших вместе с вакциной тимофер, по сравнению с группой животных, которым вводили только вакцину, титр антител был выше: к ротавирусу — в 4 раза, коронавирусу — 3,48 раза, *E. coli* — в 2 раза, лизоцимная активность повышалась — в 1,13 раза, бактерицидная — в 1,42 раза. Следовательно, тимофер увеличивает как уровень гуморального иммунного ответа, так и факторы неспецифической инфекционной резистентности и проявляет высокие иммуномодулирующие свойства.

Таким образом, проведенные исследования показали, что тимофер является нетоксичным лекарственным средством, проявляет иммуномодулирующие свойства и представляется перспективным для фармацевтической промышленности.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. П. Афиногенова, И. В. Лукачев, М. П. Костинов, *Иммуно-терапия: механизм действия и клиническое применение иммунокорректирующих препаратов*, 4, Лечащий врач (2010). (<http://www.lvrach.ru/2010/04/12830578>).
2. Г. М. Бобиев, Н. Д. Бунятян, Х. С. Саядян, М. М. Саповский, *Иммуноактивные пептиды и их координационные соединения в медицине*, Русский врач, Москва (2009), с. 228.
3. Г. М. Бобиев, С. Д. Исупов, А. Н. Шахматов, К. Х. Хайдаров, *Хим.-фарм. журн.*, **34**(5), 24 – 25 (2000); *Pharm. Chem. J.*, **34**(5), 245 – 247 (2000).
4. Б. М. Холназаров, Г. М. Бобиев, Н. Д. Бунятян, *Технология инновационного препарата на основе триптофансодержащего дипептида и его координационных соединений с ионом железа*, Москва (2015), с. 198.
5. A. Gangakhedkar, *Clinical Possibilities of Metal – Peptide Complexes*, American Peptide Company Inc., Sunnyvale (2013); <http://www.dddmag.com/article/2013/06/clinical-possibilities-metal-peptide-complexes>.
6. J. J. Nestor, *Cur. Med. Chem.*, **16**(33), 4399 – 4418 (2009).
7. А. Н. Миронов, Н. Д. Бунятян [ред.]. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Часть первая, Гриф и К, Москва (2012), с. 944.
8. Б. М. Холназаров, Н. Д. Бунятян, Г. М. Бобиев, *Хим.-фарм. журн.*, **48**(9), 54 – 56 (2014); *Pharm. Chem. J.*, **48**(9), 634 – 636 (2014).

Поступила 31.03.17

TOXIC AND IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF A COORDINATION COMPOUND OF ISOLEUCYL-TRYPTOPHAN DIPEPTIDE WITH IRON(II) ION

B. M. Kholnazarov^{2,3}, N. D. Bunyatyan^{1,2}, Yu. V. Olefir^{1,2}, G. M. Bobizoda³, and A. B. Prokofev^{1,2}

¹ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia

² Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, 127051 Russia

³ Sadriddin Aini Tajik State Pedagogical University, Dushanbe, 733740 Republic of Tajikistan

We have studied the toxicological and pharmacological properties of timofer, the drug based on a coordination compound of immunoactive isoleucyl-tryptophan dipeptide with iron(II). It is established that timofer is almost devoid of toxicity and has high immunostimulatory activity when combined with viral and bacterial vaccines.

Keywords: immunoactive peptides; coordination compounds; toxicological activity; pharmacological activity; drugs.