

ТИМАЛИН: АКТИВАЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

В.Х.Хавинсон^{1,2}, Н.С.Линькова^{1,3}, И.М.Кветной¹, В.О.Полякова¹,
А.О.Дробинцева¹, Т.В.Кветная¹, О.М.Ивко¹

¹Отдел биогеронтологии АНО ВО НИЦ Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, РФ;

²Группа пептидной регуляции старения ФГБУН Института физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург, РФ;

³Кафедра терапии, гериатрии и антивозрастной медицины Академии постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, Москва

Тималин — комплекс полипептидов, выделенных из тимуса, регулирующий функции иммунной системы. Установлена эффективность тималина в терапии острых респираторных заболеваний, хронического обструктивного бронхита и другой иммунопатологии. Тималин повышает функциональную активность Т-лимфоцитов, но таргетный молекулярный механизм действия препарата требует дальнейшего изучения. Исследовали влияние тималина на дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) человека и экспрессию молекулы CD28, участвующей в реализации противовирусного иммунитета при COVID-19. Установлено, что тималин в 2-3 раза снижал экспрессию маркера стволовых клеток CD44 и молекулы промежуточного этапа дифференцировки ГСК CD117. Также тималин в 6.8 раза повышал экспрессию маркера зрелых Т-лимфоцитов CD28. Это косвенно свидетельствует о том, что под действием тималина CD117⁺-клетки дифференцируются в зрелые CD28⁺ Т-лимфоциты. Известно, что у пациентов с тяжёлой формой течения COVID-19 снижается количество CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺ Т-лимфоцитов в крови, что указывает на выраженное подавление иммунитета. Возможно, противовирусное действие тималина выражается в компенсаторной стимуляции дифференцировки ГСК в CD28⁺ Т-лимфоциты на этапе подавления иммунитета при неблагоприятном течении вирусной инфекции. Тималин может рассматриваться как один из иммунопротективных пептидных препаратов для профилактики COVID-19.

Ключевые слова: тималин; пептиды; гемопоэтические стволовые клетки; дифференцировка; COVID-19

Поиск эффективных и безопасных противовирусных средств становится первоочередной задачей молекулярной биологии и медицины. В марте 2020 г. Всемирная организация здравоохранения признала COVID-19 (заболевание, вызываемое вирусом SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) пандемией. В настоящее время эффективных специфических методов лечения COVID-19 не существует. Одним из патогенетических факторов развития COVID-19 является активация синтеза провоспалительных цитокинов макрофагами лёгких, в тяжёлых случаях приводящая к развитию воспалительной реакции и дистресс-синдрома. При тяжёлой форме COVID-19 происходит

гиперактивация иммунного ответа, "цитокиновый шторм", что может привести к летальному исходу [10].

Тималин представляет собой комплекс пептидов с молекулярной массой до 10 кДа, выделенных из тимуса крупного рогатого скота [6]. Препарат нормализует клеточный и гуморальный иммунитет и функции системы гемостаза, обладает антиоксидантным действием, стимулирует фагоцитоз, процессы регенерации и кроветворения в случае их угнетения, нормализует функции Т-лимфоцитов. Тималин является геропротектором, способствует увеличению продолжительности жизни животных и снижению частоты развития опухолей [1,6,15]. Применение тималина при инфекционных заболеваниях (острый и хронический гепатит А и В, менингит, брюшной тиф, дизентерия, псевдотуберкулёз,

Адрес для корреспонденции: linkova8101984@gmail.com.
Линькова Н.С.

doi: 10.47056/1814-3490-2020-3-158-163



ОРВИ, грипп), а также при острой пневмонии, хроническом обструктивном бронхите, абсцессе лёгкого, бронхиальной астме сопровождается нормализацией иммунограммы, в том числе снижением уровня провоспалительных цитокинов [7]. Следует отметить, что при многолетнем экспериментальном изучении и клиническом применении тималина не отмечено никаких побочных или аллергических реакций. Активными компонентами тималина являются ди- и трипептиды, регулирующие экспрессию генов и синтез белков дифференцировки, пролиферации и апоптоза иммунных клеток [5]. При этом молекулярный механизм влияния тималина на дифференцировку стволовых клеток и его противовирусное действие требует дальнейшего изучения.

Гемопоэтические стволовые клетки человека (ГСК) происходят от гемангиобластов и локализуются в красном костном мозге. ГСК называют плюрипотентными, потому что они дают начало миелоидным и лимфоидным клеткам крови. К миелоидным клеткам, дифференцирующимся из ГСК, относят моноциты, макрофаги, гранулоциты (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы), эритроциты, мегакарициты, тромбоциты, миелоидные дендритные клетки. К лимфоидной линии клеток, которая происходит от ГСК, относят Т- и В-лимфоциты, НК-клетки и лимфоидные дендритные клетки. Таким образом, ГСК являются важным резервом для дифференцировки и поддержания пула функционально активных иммунных клеток.

Цель работы — изучить влияние тималина на дифференцировку стволовых клеток человека и экспрессию молекулы CD28, участвующей в реализации противовирусного иммунитета при COVID-19.

Методика исследования

Для получения ГСК из пуповинной крови использовали протокол выделения мононуклеарных клеток, разработанный компанией GE Healthcare. Кровь получали при отделении последа в ходе физиологических родов в родильном отделении ФГБНУ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта (Санкт-Петербург). Кровь разводили ФСБ Дульбекко (DPBS) в соотношении 1:1. В пробирку набирали 3 мл препарата Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) и добавляли кровь, затем центрифугировали при 400 об/мин в течение 30 мин. Жидкость в пробирке разделялась на четыре слоя: плазма, мононуклеарные клетки, Ficoll, осадок из гранулоцитов и эритроцитов. От образца отделяли верхний слой плазмы, затем слой мононуклеарных клеток пере-

носили в другую пробирку. К клеткам добавляли DPBS в соотношении 1:3 и центрифугировали при 400 об/мин в течение 10 мин. Из пробирки сливали надосадочную жидкость, к осадку добавляли 5 мл культуральной среды RPMI-1640. Клетки с культуральной средой помещали во флакон с неадгезивной поверхностью и выращивали в инкубаторе при 5% CO₂ и 37°C. Все культуры ГСК были разделены на две группы: контрольную — добавление питательной среды, и опытную — добавление тималина в концентрации 100 нг/мл (серия: 70512, производитель ООО "Самсон-Мед"). Препарат добавляли в культуры ГСК при каждом пересеве, культивирование проводили до 2-го и 7-го пассажа.

Экспрессию сигнальных молекул верифицировали иммунофлюоресцентным методом с использованием первичных моноклональных антител к CD44 (1:50; Dako), CD28 (1:50; Novocastra), CD117 (1:150; Abcam). Клетки фиксировали 4% параформальдегидом в течение 10 мин. ГСК инкубировали с 0.5% Тритона X-100 в течение 10 мин при комнатной температуре. Клетки инкубировали с Protein Block (Dako) в течение 10 мин для блокады неспецифического связывания антител. ГСК инкубировали с первичными антителами в течение 60 мин в термостате при 37°C, затем со вторичными антителами, конъюгированными с флюорохромом Alexa Fluor 488 или Alexa Fluor 647 (1:1000; Abcam), в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре. Ядра окрашивали DAPI (Sigma). Готовые препараты заключали под покровные стёкла в монтирующую среду Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako).

Микропрепараты исследовали в конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Olympus FV1000 при увеличении 200 с применением программного обеспечения FW10 для получения микрофотографий с результатами иммуноцитохимического исследования (по 5 полей зрения в каждом образце). Полученные микрофотографии анализировали в программе ImageJ (National Institutes of Health, USA) по двум параметрам: относительная площадь экспрессии (%) и средняя яркость (усл. ед.). Относительную площадь экспрессии исследуемого маркера вычисляли как отношение площади иммунопозитивных клеток к общей площади препарата. Относительную площадь экспрессии характеризует количество иммуноокрашенных клеток. Средняя яркость отражает концентрацию исследуемого маркера в одной клетке.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.). Для сравнения средних значений



исследуемого параметра в группах использовали t критерий Стьюдента при уровне значимости $p < 0.01$. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение от среднего значения.

Результаты исследования

Площадь экспрессии CD44 в ГСК 7-го пассажа под действием тималина значимо снижалась в 2.76 раза по сравнению с таковой в контрольных культурах (табл. 1, рис. 1). Тималин не влиял на площадь экспрессии CD44 в ГСК 2-го пассажа и среднюю яркость экспрессии этой молекулы в клетках 2-го и 7-го пассажа (табл. 1, 2). Молекула CD44 экспрессируется на ГСК и регуляторных Т-лимфоцитах [4,11]. Экспрессия CD44 на ГСК является лигандом для E- и L-селектина, обеспечивающего поддержание субпопуляции стволовых клеток костного мозга [2,9,11]. CD44 является рецептором гиалуроновой кислоты [11], которая составляет большую часть микроокружения стволовых клеток. Этот кластер дифференцировки участвует в активации пролиферации, повышении выживаемости ГСК и модуляции действия цитокинов [11]. Таким образом, снижение экспрессии CD44 на ГСК под действием тималина может указывать на его

способность стимулировать дифференцировку клеток, при которой данная молекула перестаёт экспрессироваться.

Площадь экспрессии CD117 в ГСК 7-го пассажа под действием тималина достоверно снижалась в 2.2 раза по сравнению с таковой в контрольных культурах (табл. 1, рис. 2). Тималин статистически значимо повышал среднюю яркость экспрессии CD117 в ГСК 2-го пассажа в 2.16 раза по сравнению с контролем (табл. 2). Тималин не влиял на площадь экспрессии CD117 в ГСК 2-го пассажа и среднюю яркость экспрессии этой молекулы в клетках 7-го пассажа (табл. 1, 2). Тирозинкиназа CD117 является рецептором фактора роста стволовых клеток и нейтрофилов (SCFR). Активация сигнального пути SCFR индуцирует пролиферацию и ранние этапы дифференцировки ГСК. Активация рецептора CD117 с помощью SCF потенцирует ряд цитокинзависимых сигнальных путей, способствуя пролиферации и дифференцировке ГСК [3,12]. Молекула CD117 участвует в поддержании популяции ГСК в крови и в костном мозге. Экспрессия CD117 снижается в процессе дифференцировки иммунных клеток, сохраняясь только на зрелых нейтрофилах и некоторых CD8⁺ Т-лимфоцитах [3]. Полученные данные свидетельствуют, что

Таблица 1. Влияние тималина на относительную площадь экспрессии сигнальных молекул в культуре ГСК человека (%; $M \pm SD$)

Группа	2-й пассаж			7-й пассаж		
	CD44	CD117	CD28	CD44	CD117	CD28
Контроль	7.55 \pm 1.04	15.25 \pm 1.68	1.24 \pm 0.19	5.47 \pm 0.45	4.33 \pm 0.41	2.01 \pm 0.16
Тималин	8.44 \pm 1.16	13.23 \pm 1.71	3.69 \pm 0.40*	1.98 \pm 0.13*	1.97 \pm 0.11*	14.56 \pm 1.75*

Примечание. * $p < 0.01$ по сравнению с контролем.

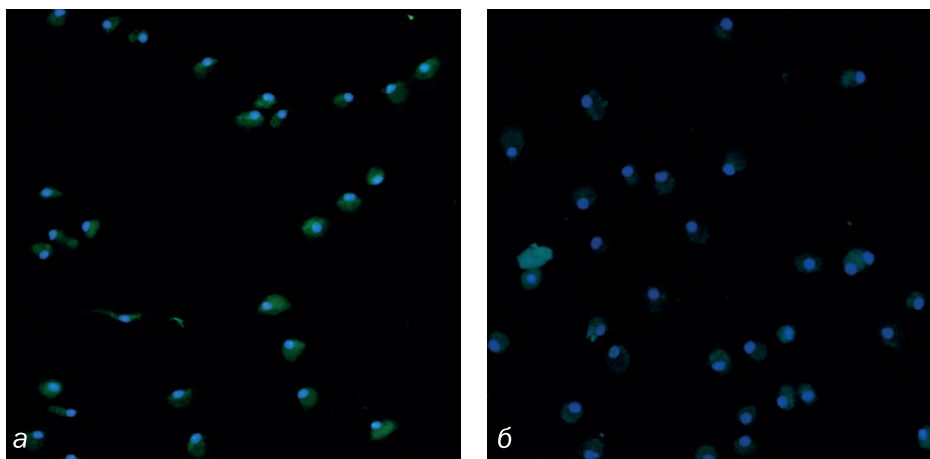


Рис. 1. Экспрессия CD44 в ГСК человека, 7-й пассаж. Иммунофлюоресцентная конфокальная микроскопия, $\times 200$.

Зелёная флюоресценция — экспрессия CD44 (Alexa Fluor 488), синяя флюоресценция — ядра клеток окрашены DAPI.

а — контроль, б — тималин.



при кратковременном культивировании тималин стимулирует экспрессию CD117 на ГСК, что можно рассматривать как начальный этап дифференцировки клеток. При длительном культивировании тималин снижает экспрессию CD117 на ГСК. Можно предположить, что это связано со способностью полипептидного комплекса ти-

муса активировать дальнейшую дифференцировку ГСК, следующую за этапом CD117⁺-клеток.

Площадь экспрессии CD28 в ГСК 2-го и 7-го пассажа под действием тималина достоверно повышалась в 2.98 и 6.93 раза соответственно по сравнению с таковой в контрольных культурах (табл. 1, рис. 3). Средняя яркость экспрессии

Таблица 2. Влияние тималина на среднюю яркость экспрессии сигнальных молекул в культуре ГСК человека (усл. ед.; $M \pm SD$)

Группа	2-й пассаж			7-й пассаж		
	CD44	CD117	CD28	CD44	CD117	CD28
Контроль	22.15±2.85	18.32±2.01	16.49±1.70	9.46±1.22	21.89±1.14	14.5±2.03
Тималин	24.78±2.34	39.48±5.12*	33.48±4.03*	9.02±1.10	22.88±1.12	29.73±2.85*

Примечание. * $p < 0.01$ по сравнению с контролем.

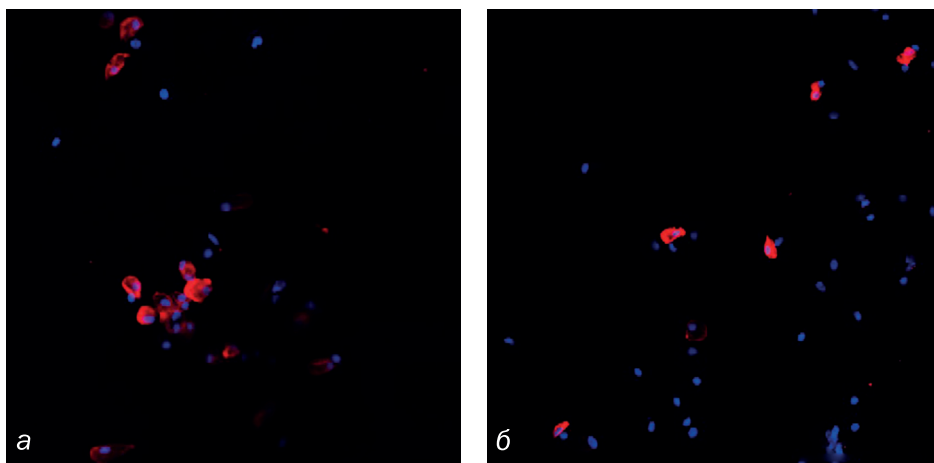


Рис. 2. Экспрессия CD117 в ГСК человека, 7-й пассаж. Иммунофлуоресцентная конфокальная микроскопия, $\times 200$.

Красная флуоресценция — экспрессия CD117 (Alexa Fluor 647), синяя флуоресценция — ядра клеток докрашены DAPI.

а — контроль, б — тималин.

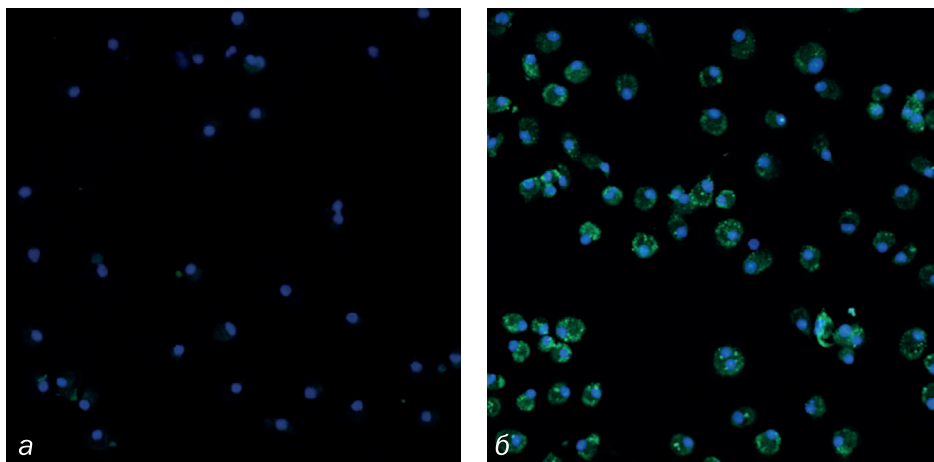


Рис. 3. Экспрессия CD28 в ГСК человека, 7-й пассаж. Иммунофлуоресцентная конфокальная микроскопия, $\times 200$.

Зелёная флуоресценция — экспрессия CD28 (Alexa Fluor 488), синяя флуоресценция — ядра клеток докрашены DAPI.

а — контроль, б — тималин.



CD28 в ГСК 2-го и 7-го пассажа под действием тималина статистически значимо увеличивалась в 2.03 и 2.05 раза соответственно (табл. 2). Гликопротеин CD28 экспрессируется на тимоцитах, CD4⁺, CD8⁺ лимфоцитах и необходим для активации зрелых Т-клеток. Экспрессия CD28 повышается в антигенпрезентирующих клетках при активации клеточных Toll-подобных рецепторов, что приводит к стимуляции синтеза цитокинов. Молекула CD28 играет важную роль в активации иммунитета при вирусных заболеваниях. У пациентов с лёгкой формой коронавирусной инфекции COVID-19 количество CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺ лимфоцитов возрастает, что указывает на активацию функций иммунной системы. При тяжёлом течении коронавирусной инфекции количество Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов снижается с одновременным уменьшением на их поверхности экспрессии гликопротеина CD28 [14]. Следует отметить, что такая же картина наблюдается при воздействии вируса иммунодефицита человека. Установлено, что экспрессия молекулы CD28 на мембране CD8⁺ Т-лимфоцитов способствует повышению их устойчивости к апоптозу и противоопухолевой активности [8]. Стимуляция экспрессии CD28 на ГСК под действием тималина может указывать на активацию дифференцировки зрелых Т-клеток и противовирусного иммунитета.

Установлено, что при кратковременном культивировании (до 2-го пассажа) тималин в 2 раза повышал экспрессию маркера ранней дифференцировки иммунных клеток CD117 на некоторых ГСК. При этом количество ГСК, несущих на своей поверхности гликопротеин CD117, под влиянием тималина снижалось. Таким образом, тималин при кратковременном воздействии на стволовые клетки человека может поэтапно стимулировать начальные стадии дифференцировки этих клеток. На тех клетках, в которых данный гликопротеин ранее не выявлялся, его экспрессия возрастает, а CD117⁺-клетки под действием тималина переходят на более позднюю стадию дифференцировки, теряя способность синтезировать CD117. Эта гипотеза подтверждается тем, что при действии тималина на ГСК 2-го пассажа в 2-3 раза повышается площадь и средняя яркость экспрессии маркера Т-лимфоцитов CD28.

При длительном культивировании (до 7-го пассажа) тималин оказывал ещё более значимый эффект на дифференцировку ГСК в направлении Т-клеток, чем при кратковременном культивировании. Тималин в 2-3 раза снижал экспрессию маркера стволовых клеток CD44 и молекулы промежуточного этапа дифференцировки ГСК CD117. Почти в 7 раз повышал синтез

маркера зрелых Т-клеток CD28. Вероятно, при длительном культивировании сохранялась способность тималина поэтапно стимулировать дифференцировку ГСК. При кратковременном культивировании тималин активировал переход клеток к начальному этапу дифференцировки, что выражалось в индукции синтеза на их поверхности гликопротеина CD117. При длительном культивировании под действием тималина CD117⁺-клетки дифференцировались в зрелые CD28⁺ Т-лимфоциты. Эти данные хорошо согласуются с полученными ранее результатами о способности ди- и трипептидов стимулировать дифференцировку иммунных клеток костного мозга, тимуса, печени эмбриона и периферической крови взрослых людей в направлении зрелых Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток [5].

Полученные результаты имеют важное значение для понимания иммунопротективной активности тималина у пациентов с острыми респираторными заболеваниями вирусной этиологии. У пациентов с вирусной инфекцией, в том числе вызванной SARS-CoV-2, на первом этапе развития патологии наблюдается активация функций иммунной системы, что выражается в повышении количества CD28⁺, CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в крови [14]. Если течение COVID-19 происходит по неблагоприятному сценарию, например при наличии сопутствующей хронической патологии, то иммунный ответ угасает, что коррелирует со снижением количества Т-лимфоцитов крови и может привести к летальному исходу [10].

Возможно, противовирусное действие тималина выражается в компенсаторной стимуляции дифференцировки ГСК в CD28⁺ Т-лимфоциты на этапе подавления иммунитета при неблагоприятном течении вирусной инфекции. Иммуномодуляторы являются одним из возможных способов профилактики и комплексной терапии лёгкой формы COVID-19 [13]. Таким образом, тималин может рассматриваться как один из пептидных препаратов для профилактики вирусных инфекций, в том числе инфекции, вызванной SARS-CoV-2.

Литература

1. Anisimov V.N., Khavinson V.Kh. Peptide bioregulation of aging: results and prospects // *Biogerontology*. 2010. Vol. 11, N 2. P. 139-149.
2. Chen C., Zhao S., Karnad A., Freeman J.W. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications // *J. Hematol. Oncol.* 2018. Vol. 11, N 1. ID 64. doi: 10.1186/s13045-018-0605-5
3. Frumento G., Zuo J., Verma K., Croft W., Ramagiri P., Chen F.E., Moss P. CD117 (c-Kit) is expressed during CD8⁺ T cell priming



- and stratifies sensitivity to apoptosis according to strength of TCR engagement // *Front. Immunol.* 2019. Vol. 10. ID 468. doi: 10.3389/fimmu.2019.00468
4. *Godoy G.J., Paira D.A., Olivera C., Breser M.L., Sanchez L.R., Motrich R.D., Rivero V.E.* Differences in T regulatory cells between mouse strains frequently used in immunological research: Treg cell quantities and subpopulations in NOD, B6 and BALB/c mice // *Immunol. Lett.* 2020. Vol. 223. P. 17-25.
 5. *Khavinson V., Linkova N., Diatlova A., Trofimova S.* Peptide regulation of cell differentiation // *Stem Cell Rev. Rep.* 2020. Vol. 16, N 1. P. 118-125.
 6. *Khavinson V.Kh.* Peptides and ageing // *Neuroendocrinol. Lett.* 2002. Vol. 23, Suppl. 3. P. 11-144.
 7. *Khlystova Z.S., Kalinina I.I., Shmeleva S.P.* Thymalin in developing respiratory organs of human fetus // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2003. Vol. 135, N 6. P. 600-602.
 8. *Kim K.H., Kim H.K., Kim H.D., Kim C.G., Lee H., Han J.W., Choi S.J., Jeong S., Jeon M., Kim H., Koh J., Ku B.M., Park S.H., Ahn M.J., Shin E.C.* PD-1 blockade-unresponsive human tumor-infiltrating CD8⁺ T cells are marked by loss of CD28 expression and rescued by IL-15 // *Cell Mol. Immunol.* 2020. doi: 10.1038/s41423-020-0427-6
 9. *Li J.P., Hsieh M.J., Chou Y.E., Chao Y.H., Tsao T.C., Yang S.F.* CD44 gene polymorphisms as a risk factor for susceptibility and their effect on the clinicopathological characteristics of lung adenocarcinoma in male patients // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020. Vol. 17, N 9. ID 2981. doi:10.3390/ijerph17092981
 10. *Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S., Manson J.J.; HLH Across Speciality Collaboration, UK.* COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression // *Lancet.* 2020. Vol. 395. P. 1033-1034.
 11. *Morath I., Hartmann T.N., Orian-Rousseau V.* CD44: more than a mere stem cell marker // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2016. Vol. 81, Pt A. P. 166-173.
 12. *Myburgh R., Kiefer J.D., Russkamp N.F., Magnani C.F., Nuñez N., Simonis A., Pfister S., Wilk C.M., McHugh D., Friemel J., Müller A.M., Becher B., Münz C., van den Broek M., Neri D., Manz M.G.* Anti-human CD117 CAR T-cells efficiently eliminate healthy and malignant CD117-expressing hematopoietic cells // *Leukemia.* 2020. doi: 10.1038/s41375-020-0818-9
 13. *Scavone C., Brusco S., Bertini M., Sportiello L., Rafaniello C., Zoccoli A., Berrino L., Racagni G., Rossi F., Capuano A.* Current pharmacological treatments for COVID-19: what's next? // *Br. J. Pharmacol.* 2020. doi:10.1111/bph.15072
 14. *Wang F., Hou H., Luo Y., Tang G., Wu S., Huang M., Liu W., Zhu Y., Lin Q., Mao L., Fang M., Zhang H., Sun Z.* The laboratory tests and host immunity of COVID-19 patients with different severity of illness // *JCI Insight.* 2020. Vol. 5, N 10. ID e137799. doi: 10.1172/jci.insight.137799
 15. *Zhukova G.V., Schikhlyarova A.I., Barteneva T.A., Shevchenko A.N., Zakharyuta F.M.* Effect of Thymalin on the tumor and thymus under conditions of activation therapy in vivo // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018. Vol. 165, N 1. P. 80-83.

Получено 26.06.20