

# ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ТИМОДЕПРЕССИН НА ТЕЧЕНИЕ АУТОИММУННОГО ПРОЦЕССА У САМОК МЫШЕЙ ЛИНИИ MRL/l

В.А.Насонова, Г.Н.Плесковская, С.Г.Раденска-Лоповок, Ю.В.Муравьев, А.В.Новикова,  
И.С.Дыдыкина, В.А.Дейгин  
ГУ Институт ревматологии РАМН, Москва

## Резюме

**Цель.** Оценить эффективность нового иммуноактивного пептида - тимодепрессина (ТД), селективно ингибирующего Т-клеточный иммунитет при ревматических заболеваниях.

**Материал и методы.** Изучали выживаемость животных и морфологические изменения в селезенке, почках и синовиальной оболочке у 100 самок мышей линии MRL/l. Использовали ТД в дозе 10 мкг/кг и 10+100 мкг/кг по 20 и 40 инъекций на животное. Мышам группы сравнения вводили физиологический раствор в качестве плацебо. Результаты оценивали двойным слепым методом.

**Результаты.** Выживаемость леченных мышей (10+100 мкг/кг) к 6-ти мес возрасту была в два раза выше, чем в контрольной группе. Морфометрические показатели иммуногенеза в селезенке леченных животных оказались сопоставимыми с параметрами одномесячных особей. Нарастала площадь белой и красной пульпы, увеличивалось число зрелых и незрелых плазмочитов на 1 мм<sup>2</sup>, а также количество мегакариоцитов в поле зрения. Результаты исследования селезенки свидетельствовали об иммуносупрессивном действии ТД, подавляющего лимфопролиферативный процесс и как следствие - увеличивающего выживаемость животных - носителей гена Irg/Irg. Однако препарат не влиял на течение аутоиммунного процесса, отраженного в ревматоидоподобных изменениях в почках и синовиальной оболочке животных.

**Заключение.** ТД оказывает дозозависимый эффект на выживаемость и морфологические показатели мышей линии MRL/l: выживаемость животных при дозе 10+100 мкг/кг выше, однако доза 10 мкг/кг оказывает более выраженное положительное действие на морфологические показатели иммуно- и гемопоэза. Целесообразны дальнейшие исследования для отработки дозы и схемы препарата.

**Ключевые слова:** тимодепрессин, иммуногенез, биологические модели, аутоиммунная патология.

Изучению терапевтической эффективности тимических препаратов посвящено много исследований. Получены обнадеживающие результаты, особенно в плане коррекции Т-клеточных эффектов. В частности, обосновано применение тимических препаратов при первичных иммунодефицитных и тяжелых комбинированных иммунодефицитных состояниях, при приобретенных Т-клеточных дефицитах, СПИДе и СПИД-ассоциированном комплексе [3,5,8].

Поэтому интерес к иммуномодулирующим препаратам тимуса не ослабевает, и доказательством тому является создание нового иммуноактивного пептида - тимодепрессина (ТД). Установлено, что препарат обладает заметным иммунодепрессивным эффектом. ТД способен в исключительно малых дозах (0,1 - 10 мкг/кг) ингибировать Т-клеточный иммунитет [1,6,7,9]. Селективное влияние на иммунную систему выгодно отличает его от классических иммунодепрессантов, используемых в ревматологии.

Механизм действия препарата выяснен не полностью. Предполагается, что его лечебное действие обусловлено, главным образом, торможением синтеза и секреции интерлейкина-2 (ИЛ-2) Т-лимфоцитами, в частности Т-хелперами. По-видимому, под влиянием препарата происходит нарушение функции генов, кодирующих синтез цитокинов, в результате чего снижается количество не только ИЛ-2, но и ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-6 и интерферона- $\gamma$  [2,9].

Таким образом, селективные иммунодепрессивные свойства препарата побуждают исследовать его возможный лечебный эффект при ряде заболеваний, связанных с им-

мунной и аутоиммунной патологией, среди которых большое внимание привлекают ревматические болезни, в частности, ревматоидный артрит (РА). Использование биологических моделей данных заболеваний позволяет хорошо контролировать эффективность и переносимость лекарственных препаратов. В представленной работе исследование проводили на мышах линии MRL/Mp-Irg/Irg (MRL/l), используемых в настоящее время как модель аутоиммунной патологии при РА [4,10].

Цель исследования: выявить, обладает ли ТД лечебным эффектом у мышей линии MRL/l. Были поставлены следующие задачи: 1) оценить эффект различных доз (10 и 10+100 мкг/кг) препарата на течение заболевания и выживаемость самок мышей; 2) изучить влияние указанных доз препарата на морфологические изменения в селезенке, почках и синовиальной оболочке опытных животных.

## Материал и методы

Использовали 100 самок мышей 1 - 2 мес возраста MRL/l линии с массой 20 г. Животные содержались на стандартной полнорационной диете, со свободным доступом к питьевой воде и 12-ти час световым днем. Животные были разделены на 5 групп (табл.1). Группой контроля служили мыши в возрасте одного мес, не получавшие каких-либо препаратов. Кроме того, к каждой опытной группе, получавшей ТД, имела группа сравнения, которой вводили физиологический раствор (плацебо) по той же схеме.

Для выяснения дозозависимого лечебного эффекта ТД исследование проводили в два этапа. На первом этапе животным обеих опытных групп ТД вводили внутривенно в разовой дозе 10 мкг/кг (т.е. 0,2 мкг на одну мышь мас-

Таблица 1  
ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МАТЕРИАЛА ИССЛЕДОВАНИЯ

№ группы	n	Возраст (мес)	Доза ТД	Количество введений
1. контроль	20	1	-	-
2. опыт	20	6-7	10 мкг/кг	20
3. сравнения	20	6-7	Физ. раствор	20
4. опыт	20	6-7	10+100мкг/кг	20+20
5 сравнения	20	6-7	Физ. раствор	20+20

сой 20 г). По одинаковой схеме - 5 инъекций в нед в течение 4 нед. На этом этапе мыши получили 20 инъекций препарата. На втором этапе разовая доза ТД во второй группе была увеличена в 10 раз и составила 100 мкг/кг или 2 мкг на мышь массой 20 г. Мыши второй опытной группы получили еще 20 инъекций ТД по схеме 5 введений в нед в течение 4 нед.

Для морфологических исследований внутренние органы мышей помещали в раствор 70° спирта и 10% нейтрального формалина в соотношении 1:1. Впоследствии образцы заливали в парафин. Применяли гистологические и морфометрические методы исследования. В срезах селезенки определяли кровенаполнение органа (сокращение капсулы и кровенаполнение синусоидов), соотношение красной и белой пульпы, состояние сосудов и количество мегакариоцитов в поле зрения при увеличении х 180. В фолликулах определяли количество зрелых и незрелых плазматических клеток. Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью стандартных методик с оценкой достоверности различий ( $\chi^2$  и критерия Стьюдента).

**Результаты и обсуждение**

Группа контроля состояла из мышей одномесячного возраста. Признаков аутоиммунного заболевания у них не выявлено. Внутренние органы были в пределах возрастной и видовой нормы.

Макроскопически почки были обычного вида и размера с четкими границами между корковым и мозговым слоем. Клубочки распределялись равномерно и имели до 100 мезангиальных и эндотелиальных клеток. Канальцевый аппарат не имел каких-либо особенностей.

Синовиальная оболочка скакательных суставов была тонкая. Кроющие синовиальные клетки располагались в один ряд. Признаки воспаления и пролиферации отсутствовали. Васкулитов не было.

В селезенке у 4 из 5 исследованных животных отмечалось хорошее сокращение капсулы и умеренное полнокровие синусоидов. Стенки артериол обычного вида с умеренными реактивными изменениями эндотелия. В красной пульпе было 4-5 мегакариоцитов в поле зрения. При морфометрическом исследовании обнаружено, что красная пульпа составила  $43,4 \pm 2,9$  % площади селезенки, белая -  $56,6 \pm 3,2$  % (табл.2). В красной пульпе на  $1 \text{ мм}^2$  ткани выявлялась  $2458 \pm 243$  незрелых и  $923 \pm 117$  зрелых плазмоцитов. В белой пульпе этот показатель составил  $652 \pm 53$  и  $79 \pm 38$  соответственно.

Животные в возрасте 6-7 мес, получившие 20 и 40 инъекций плацебо, были объединены для морфологического анализа в одну группу в связи с аналогичными изменениями в органах и изучались как группа сравнения.

В почках этих животных выявлены массивные лимфогистиоцитарные инфильтраты в интерстиции мозгового слоя и скудные периваскулярные инфильтраты в корковой зоне. Имели место выраженные продуктивно-деструктивные васкулиты с формированием кровоизлияний. Местами в клубочках 2 из 8 исследованных животных выявлялось расширение мезангиального матрикса.

В синовиальной оболочке скакательного сустава имелись признаки выраженного синовита. Кроющие синовиоциты пролиферировали, местами формировали "частокол". Отмечалась пролиферация фибробластов и развитие продуктивно-деструктивных васкулитов. В 2 из 8 случаев изменения синовии напоминали ланнус при РА с частичной облитерацией суставной полости.

В селезенке всех мышей из группы сравнения выявлено выраженное полнокровие синусоидов. Капсула селезенки была незначительно сокращена. В 2 из 8 случаев отмечалось утолщение стенок артерий. В поле зрения выявлялись в среднем 2,5 мегакариоцита. При морфометрическом исследовании обнаруживалось значительное увеличение площади красной пульпы по сравнению с контрольной группой (табл.2). Этот показатель составил  $70,2 \pm 3,2$  % против  $43,4 \pm 2,9$  % ( $p < 0,01$ ). В красной пульпе возросло число незрелых плазмоцитов до  $3391 \pm 249$  клеток на  $1 \text{ мм}^2$  против  $2458 \pm 243$  ( $p < 0,05$ ) и зрелых плазмоцитов до  $1739 \pm 232$  против  $923 \pm 117$  ( $p < 0,05$ ). В белой пульпе также увеличилось количество незрелых плазмоцитов до  $1477 \pm 121$  против  $652 \pm 53$

Таблица 2

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРАСНОЙ И БЕЛОЙ ПУЛЬПЫ СЕЛЕЗЕНКИ У МЫШЕЙ MRL/L (M±m)

Показатели	1 гр n=5	3 и 5 гр n=8	2 гр n=5	4 гр n=5	p1	p2	p3	p4
Площадь красной пульпы, %	$43,4 \pm 2,9$	$70,2 \pm 3,2$	$36,3 \pm 2,4$	$41,2 \pm 2,7$	0,01	0,01	0,01	-
Незрелые плазмоциты в красной пульпе на $1 \text{ мм}^2$	$2458 \pm 243$	$3391 \pm 249$	$2556 \pm 207$	$2589 \pm 187$	0,05	0,05	0,05	-
Зрелые плазмоциты красной пульпе на $1 \text{ мм}^2$	$923 \pm 117$	$1739 \pm 232$	$829 \pm 89$	$1357 \pm 128$	0,05	-	0,02	0,05
Площадь белой пульпы, %	$56,6 \pm 3,2$	$29,8 \pm 2,7$	$63,7 \pm 5,4$	$58,8 \pm 3,4$	0,01	0,01	0,01	-
Незрелые плазмоциты в белой пульпе на $1 \text{ мм}^2$	$652 \pm 53$	$1477 \pm 121$	$1093 \pm 96$	$769 \pm 65$	0,05	0,01	0,05	0,05
Зрелые плазмоциты в белой пульпе на $1 \text{ мм}^2$	$79 \pm 38$	$494 \pm 96$	$345 \pm 71$	$178 \pm 22$	0,02	0,01	-	-

- p1 - достоверность различий 1 и 3-5 групп (контроль и плацебо)
- p2 - достоверность различий 4 и 3-5 групп (плацебо и 10 + 100 мкг препарата)
- p3 - достоверность различий 2 и 3-5 групп (плацебо и 10 мкг препарата)
- p4 - достоверность различий 2 и 4 групп (10 + 100 мкг препарата и 10 мкг препарата)

( $p < 0,05$ ) и зрелых плазмочитов до  $494 \pm 96$  против  $79 \pm 38$  ( $p < 0,02$ ).

Выживаемость у 6-7 мес мышей линии MRL/l, получивших ТД в дозе 10 мкг/кг 20 инъекций + 20 инъекций по 100 мкг/кг, составила 60%, что было в 2 раза выше этого показателя в группе сравнения (30%). Выживаемость животных, леченных ТД в дозе 10 мкг/кг 20 инъекций, не отличалась от таковой в группе плацебо.

При гистологическом исследовании почек опытных мышей, получавших 10+100 мкг/кг ТД, отмечена выражен-

ность. Имели место слабо выраженные васкулиты и умеренный фиброз субсиновиальной ткани.

Капсула селезенки была сокращена; синусоиды - умеренно полнокровны. Стенки артерий в 2 из 5 случаев утолщались в связи с развитием склероза. В красной пульпе выявлялись в среднем по 2,1 мегакариоцита в поле зрения. Во всех случаях в фолликулах обнаруживались лимфоциты с фигурами митоза. Морфометрический анализ показал уменьшение площади красной пульпы до  $36,3 \pm 2,4\%$ , тогда как в группе сравнения этот показатель составил  $70,2 \pm 3,2\%$  ( $p < 0,01$ ). Белая пульпа увеличивалась до  $63,7 \pm 5,4\%$  против  $29,8 \pm 2,7\%$  ( $p < 0,01$ ). В красной пульпе снижалось количество незрелых плазмочитов до  $2\ 556 \pm 207$  против  $3\ 391 \pm 249$  ( $p < 0,05$ ) и зрелых плазмочитов до  $829 \pm 89$  против  $1\ 739 \pm 232$  ( $p < 0,025$ ). В белой пульпе число незрелых плазмочитов уменьшалось до  $1\ 093 \pm 96$  ( $p < 0,05$ ). Количество зрелых плазмочитов в белой пульпе у контрольных и опытных мышей линии MRL/l не имело статистически достоверных различий.

При сравнении морфометрических показателей селезенки мышей, получавших 10 мкг/кг и 10+100 мкг/кг препарата, оказалось, что в первой опытной группе уменьшалось число зрелых плазмочитов в красной пульпе, а в белой пульпе увеличивалось число незрелых плазмочитов, что свидетельствует о более выраженной активации иммуногенеза при меньшей дозе ТД. Следует отметить, что у 6-7 мес животных наблюдалось подавление гемопоэза, выражающееся в уменьшении количества мегакариоцитов в поле зрения как в группе плацебо, так и опытных группах, независимо от дозы препарата и схемы введения.

Таким образом, гистологические и морфометрические исследования внутренних органов у 6-7 мес мышей линии MRL/l выявили, что с возрастом нарастают морфологические изменения в селезенке, почках и синовиальной оболочке как при получении животными плацебо, так и при введении им ТД в дозе 10 и 10+100 мкг/кг. Наблюдалась некоторая тенденция благоприятного действия ТД на развитие ревматоидоподобного заболевания. Положительная динамика выявлена в селезенке на фоне применения 10 мкг/кг препарата. Это проявилось уменьшением площади красной и увеличением площади белой пульпы. Количество зрелых и незрелых плазматических клеток красной пульпы снижалось по сравнению с группой плацебо и приближалось к показателям одномесячных мышей.

Следует подчеркнуть, что у мышей, получавших ТД в дозе 10+100 мкг/кг, наблюдалось уменьшение числа зрелых плазматических клеток в белой и красной пульпе, но их количество оставалось значительно выше, чем у одномесячных особей.

Отмечено снижение числа мегакариоцитов как у животных, получавших плацебо, так и ТД, в сравнении с животными одномесячного возраста (в среднем 2,5 - 2,1 и 4,5 соответственно). Этот факт может быть обусловлен возрастными особенностями изучаемой мышшиной модели заболевания. Нам представляется, что 40 инъекций препарата в опыте, так же как и 40 инъекций физиологического раствора в контроле, необоснованно велико и является тяжелой нагрузкой для организма мышей данной линии. Целесообразно продолжение эксперимента в целях отработки дозы, схемы введения препарата и изучения непосредственного влияния ТД на гемопоэз.

Результаты исследования селезенки свидетельствуют об иммуносупрессивном действии препарата ТД, подавляющего лимфопрлиферативный процесс, и как следствие - увеличивающего выживаемость животных - носителей гена Irg/Irg. Полученные результаты по выживаемости мышей подтверждают наши предыдущие исследования и данные других авторов, изучавших биологическую модель РА на примере мышей MRL/l линии [4,10]. Однако данный препарат, вероятно, не влияет на течение аутоиммунного процесса, отражающегося ревматоидоподобными изменениями в почках и синовиальной оболочке опытных животных.

Таблица 3

#### ВЛИЯНИЕ ТИМОДЕПРЕССИНА НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ МЫШЕЙ MRL/l

	10мкг/кг 20 инъекций	Физ. раствор 20 инъекций	10мкг/кг+ 100мкг/кг 40 инъекций	Физ.раствор 20 инъекций
Взятые в эксперимент, n	10	10	10	10
Достигшие 6-7 мес, n	3	3	6	3
Выжившие (%)	30	30	60	30

ная патология паренхимы. Однако макроскопический размер органов не отличался от параметров группы сравнения. Структура почек была сохранена, но в клубочках 3 из 5 исследованных животных выявлен фибриноидный некроз сосудистых петель. В строме имели место лимфо-гистиоцитарные инфильтраты различной степени выраженности - от мелко-очаговых до массивных. Во всех зонах почки отмечались продуктивно-деструктивные васкулиты.

Синовиальная оболочка скакательных суставов была склерозирована. В 2 из 5 случаев имелись признаки воспаления, пролиферации клеточных элементов, а также васкулиты. Эти изменения характерны для исхода острого синовита, но облитерации суставной полости не отмечалось.

В селезенке наблюдалось значительное полнокровие синусоидов и незначительное сокращение капсулы у 4 из 5 мышей. Мегакариоциты составили в среднем 2,1 клетки в поле зрения. Стенки артерий одного животного были утолщены. У 3 особей имели место митозы в лимфоцитах белой пульпы. Площадь красной пульпы уменьшилась до  $41,2 \pm 2,7\%$  против  $70,2 \pm 3,2\%$  в группе сравнения ( $p < 0,01$ ). Площадь белой пульпы возросла до  $58,8 \pm 3,4\%$  против  $29,8 \pm 2,7\%$  ( $p < 0,01$ ). Число незрелых плазматических клеток в красной пульпе уменьшилось до  $2589 \pm 187$  против  $3\ 361 \pm 249$  ( $p < 0,05$ ), тогда как снижение зрелых плазматических клеток было статистически недостоверным. В белой пульпе число незрелых плазмочитов было снижено до  $769 \pm 65$  против  $1\ 477 \pm 121$  ( $p < 0,01$ ), а число зрелых плазмочитов до  $178 \pm 22$  против  $494 \pm 96$  ( $p < 0,01$ ).

Морфологическое исследование проводилось также в группе животных в возрасте 6-7 мес, получавших 10 мкг/кг ТД. Почки у этих мышей были не увеличены и имели четкую структуру. Определялась граница коркового и мозгового слоя. Клубочки были несколько расширены в связи с пролиферацией мезангиальных клеток (более 100 в одном клубочке) и фибробластов. В корковом слое определялись очаговые инфильтраты вокруг сосудов и клубочков. Их клеточный состав был представлен лимфоцитами, моноцитами и гистиоцитами с примесью плазматических клеток. В мозговом слое выявлялись массивные инфильтраты. На их фоне было видно большое количество разрушенных извитых канальцев. Эпителий единичных сохранных канальцев имел признаки зернистой и гиалиново-капельной дистрофии.

Синовиальная оболочка суставов была тонкая. Проллиферующие кроющие синовиоциты формировали несколько рядов. Облитерации суставной полости не отмеча-

**Выводы**

1. Тимодепрессин оказывает благоприятный эффект на течение заболевания самок мышей линии MRL/1, о чем свидетельствует вдвое увеличенный процент выживаемости опытных животных, получавших препарат в дозе 10+100 мкг/кг.
2. Восстановление некоторых морфометрических

показателей в селезенке животных, получавших 10 мкг/кг и 10+100 мкг/кг препарата, указывает на положительное влияние ТД на иммуногенез.

3. Выявленные патологические изменения в почках и синовиальной оболочке свидетельствуют, что доза 10 мкг/кг и 10+100 мкг/кг не оказывает терапевтического эффекта на ревматоидоподобные изменения у данных животных.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Дейгин В.И., Дамбаева С.В., Мазуров Д.В., Пинегин Б.В. Влияние тимических пептидов на функциональную активность фагоцитарных клеток периферической крови доноров. Тез. докл. 4-ого конгресса Росс. Асс. аллергол. и клинич. иммунологов, 2001, 326.
2. Дейгин В.И., Климова С.В., Хамидуллина К.Ф., Пинегин Б.В. и др. Влияние тимических пептидов на синтез цитокинов *in vitro*. Тез. докл. 4-ого конгресса Росс. Асс. аллергол. и клинич. иммунологов, 2001, 157.
3. Лямперт И.М., Рыжикова Е.В., Плесковская Г.Н., Насонова В.А. Аутоантитела к эпителиальной ткани тимуса и кожи у мышей и гибридов F1 (NZBxNZW). Бюлл. эксп. биол. мед., 1986, 9, 321-324.
4. Плесковская Г.Н. Природные биологические модели аутоиммунных заболеваний (обзор литературы). Ревматол., 1991, 4, 38-44.
5. Плесковская Г.Н. Новозеландские мыши как модель иммунодефицитов. Автореф. дис. д.б.н. М., 1994.
6. Семенец Т.Н., Семина О.В., Виноградова Ю.Е. и др. Использование синтетических иммуномодулирующих пептидов для восстановления кроветворения у мышей после цитостатика цитозин-арабинозида (Ара-II). Иммунол., 2000, 6, 20-22.
7. Семина О.В., Дейгин, В.И. Семенец Т.Н. и др. Синтетический пептид D-(iEW) (Тимодепрессин) защищает КОЕе костного мозга от воздействия ионизирующей радиации. Радиацион. биология. радиэкол., 2000, 40, 3, 315-318.
8. Arion V.J., Zimina I.V., Lopuchin J.M. Contemporary views on the nature and clinical application of thymus preparations. Russian J.Immun., 1997, 2, 3-4, 157-166.
9. Deigin V.I., Poverenny A.V., Semina O.V., Semenets T.N. Reciprocal effect of optical isomerism of EW-dipeptides on immune response. Immunol. Letters, 1999, 67, 1, 41-46.
10. Merino R., Iwamoto M., Fossati L. et al. Polyclonal B-cell activation arises from different mechanisms in lupus-prone (NZBxNZW)F1 and MRL/Mpl-lpr/lpr mice. J.Immunol., 1993, 151, 11, 6509-6516.

**Abstract**

**Influence of thymodepressine on the course of autoimmune process in MRL/1 female mice.**

*V.A. Nassonova, G.N. Pleskovskaya, S.G. Radenska-Lopovok, Y.V. Murayjov, A.V. Novikova, I.S. Didikina, V.A. Deygin.*

**Objective.** To assess efficacy of new immunoactive peptide thymodepressine (TD) selectively inhibiting T-cell immunity in rheumatic diseases

**Methods.** Spleen, kidneys and synovial membrane morphological changes and survival were assessed in 100 MRL/1 female mice. 20 and 40 per animal TD injections in doses 10 mcg/kg and 10+100 mcg/kg were made. Control group animals received placebo (saline solution). Results were assessed by double blind method.

**Results.** Survival of treated mice (10+100 mcg/kg) at the 6 months age was two times higher than in control group. Morphometric indices of immunogenesis in spleen of treated animals were comparable with parameters of one month age mice. White and red pulp area, number of mature and immature plasmacytes per 1 mm<sup>2</sup>, number of megacariocytes were increased. Results of the spleen examination shows immunosuppressive action of TD suppressing lymphoproliferative process and increasing survival of animals having lpr/lpr gen. But TD does not influence course of autoimmune process providing rheumatoid like changes in kidneys and synovial membrane of mice.

**Conclusion.** TD has dose-dependent effect on survival and morphological indices in MRL/1 mice. Survival of animals at dose 10+100 mcg/kg was higher but dose 10 mcg/kg more expressively effected morphological indices of immuno- and hemopoiesis. Additional examinations are needed to determine optimal dose and scheme of treatment.

**Key words:** *thymodepressine, immunogenesis, biological models, autoimmune pathology.*

Поступила 21.03.01