

РЕФЕРАТ

Отчет на 28 стр, 14 рис., 1 таб.

Ключевые слова: тимодепрессин, готовая лекарственная форма, иммунодепрессивное средство.

Цель работы: изучение механизмов действия и специфической активности при atopическом дерматите иммунодепрессивного средства, содержащего тимодепрессин (гамма-D-глутамил-D-триптофана натриевая соль) по данным исследований *in vivo* и *in vitro*.

Атопические заболевания - I тип гиперчувствительности - анафилактический, при котором первичное поступление аллергена вызывает продукцию плазмацитами IgE. Стимулируют выработку IgE-антител ИЛ-4 и ИЛ-10, выделяемые Th2, а угнетают - γ -интерферон и ИЛ-2, выделяемые Th1. Синтезированные IgE прикрепляются Fc-фрагментом к Fc-рецепторам (FcεR1) тучных клеток в слизистых оболочках, соединительной ткани и базофилов в крови. При повторном введении аллергена на тучных клетках и базофилах образуются комплексы IgE с аллергеном (перекрестная сшивка FcεR1 антигеном), вызывающие дегрануляцию клеток. Из гранул в ткани выбрасываются биологически активные медиаторы: вазоактивные амины (гистамин), протеогликаны (гепарин), липидные медиаторы (лейкотриены, простагландины, тромбоцитактивирующий фактор), ферменты (триптаза, химаза, карбоксипептидаза, катепсин G), и цитокины (TNF- α , IL-4, -13, -3, -5, GM-CSF). Хемотаксические факторы привлекают нейтрофилы, эозинофилы и макрофаги. Эозинофилы выделяют ферменты, катионные белки, лейкотриены и основной белок, повреждающий эпителий. Тромбоциты тоже выделяют медиаторы воспаления. Перечисленные компоненты вызывает сокращение гладких мышц, ослабление сердечной деятельности, развитие коллапса, повышение сосудистой проницаемости, отек.

Эозинофилы играют ключевую иммунорегуляторную роль в качестве антигенпредставляющих клеток. Они модулируют активность CD34+ Т-клеток, дендритных клеток, В-клеток, тучных клеток, нейтрофилов и базофилов.

Исследование специфической активности лекарственного средства проводилось *in vitro* на нескольких типах клеток человека и *in vivo* на лабораторных животных, при этом использовались трансгенные мыши с биологической моделью atopического дерматита. Влияние тимодепрессина на выработку цитокинов было исследовано на культуре мононуклеарных клеток крови. Также на культуре клеток человеческого костного мозга было изучено влияние тимодепрессина на пролиферацию CD34+ клеток человеческого

костного мозга, а также подавление фибронектин-связывания эозинофилов, продуцируемых *in vitro* дифференцировкой CD34 + клеток. На трансгенных мышах с моделью атопического дерматита были изучены соотношение веса селезенки к массе тела, содержание гранулоцитов селезенки, содержание эозинофилов селезенки, содержание гранулоцитов лимфатических узлов, кожное воспаление и содержание IgE.

Анализируя результаты проведенных исследований по изучению механизма действия лекарственного средства, содержащего тимодепрессин (Гамма-D-глутамил-D-триптофан) по данным исследований можно сделать следующее заключение: тимодепрессин подавляет иммунную реактивность организма, что проявляется в ингибировании реакций гуморального и клеточного иммунитета.

Проведенные исследования по изучению механизмов лечебного действия препарата Тимодепрессин показали, что на клеточном уровне он ингибирует реакции гуморального и клеточного иммунитета, оказывая обратимое подавляющее действие на содержание гранулоцитов крови. Под его воздействием происходит нормализация дисфункционального состояния гуморального звена иммунитета, характеризующаяся снижением концентрации В-лимфоцитов и гранулоцитов, уменьшением продукции сывороточных иммуноглобулинов. Тимодепрессин подавляет накопление в цитоплазме Т-клеток ИЛ-4 и γ -интерферона, которые являются основными цитокинами, продуцируемыми ТН-2 и ТН-1 типа соответственно, и необходимы для образования антител типов IgE, IgG1 и IgG2a. Также уменьшает количество маркеров активации (CD-34) на лимфоцитах.

В экспериментах *in vitro* было выявлено, что Тимодепрессин[®] снижает пропорцию гранулоцитов, особенно эозинофилов, которые вызывают экспрессию Fc-рецепторов, специфичных для IgE.

В экспериментах *in vivo* применение Тимодепрессина вызывало нормализацию аномально повышенного соотношения массы селезенки/массы тела, процента эозинофилов и гранулоцитов в селезенке и лимфатических узлах и показатель воспаления кожи. В заключение, Тимодепрессин может иметь терапевтическое преимущество при эозинофильных и воспалительных заболеваниях кожи через его ингибирующее действие на развитие и активацию эозинофилов. Также по сравнению с контролем наблюдалось значительное снижение уровня IgE.

ОГЛАВЛЕНИЕ

РЕФЕРАТ	2
1. ВВЕДЕНИЕ	7
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	9
2.1. Характеристика животных и условий их содержания	9
2.2. Процедура введения вещества и изучаемое лекарственное средство	12
2.3. Исследования <i>in vitro</i>	13
2.4. Исследования <i>in vivo</i>	14
2.5. Статистическая обработка результатов	15
3. ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА	16
3.1. Изучение на мононуклеарных клетках крови	16
3.2. Изучение на CD34+ клетках человеческого костного мозга	17
3.3. Изучение на модели атопического дерматита <i>in vivo</i>	21
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	26
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	28

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем отчете применяют следующие термины с соответствующими определениями.

Атопические заболевания - I тип гиперчувствительности, анафилактический, при котором первичное поступление аллергена вызывает продукцию плазмацитами IgE.

Биологическая модель - моделирование биологических структур, функций и процессов на разных уровнях организации живого. Биологические модели воспроизводят на лабораторных животных определённые состояния или заболевания, встречающиеся у человека или животных.

Специфическая активность лекарственного средства – характеристика свойств препарата, демонстрирующая избирательность его действия.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АР	Аллергический ринит
АтД	Атопический дерматит
БА	Бронхиальная астма
ИЛ (IL)	Интерлейкин
НИР	Научно-исследовательская работа
ФГА	Фитогемагглютинин
ФМА	Фосформолибдат аммония
ФНО	Фактор некроза опухоли
IFN	Интерферон
IgE	Иммуноглобулин E
OVA	Овальбумин

1. ВВЕДЕНИЕ

Целью настоящей НИР является изучение механизма действия и доклинические исследования специфической активности лекарственного средства на основе гамма-D-глутамил-D-триптофана натриевой соли.

Генетическую предрасположенность к повышенной выработке иммуноглобулина E (IgE) к разным аллергенам окружающей среды называют «атопия». Этот термин был впервые введен в 1922 г. А.Соса. Данное заболевание обусловлено опосредованным IgE механизмом развития, когда имеется генетическая предрасположенность к выработке антител класса E; взаимодействие антитела и антигена запускает каскад аллергической реакции, разрушая в первую очередь тучную клетку, из которой выделяется гистамин.

Группа atopических заболеваний (атопическая форма бронхиальной астмы – БА, поллиноз, atopический дерматит – АтД) сопровождается значительным увеличением уровня общего IgE. Общим он называется потому, что в его состав входят как IgE-антитело к определенному антигену (специфическим), так и молекулы IgE, которые не являются специфичными к данному антигену. При этом большая их часть приходится на молекулы неспецифического IgE; концентрация специфического IgE, как правило, меньше [7]. Организм с уже измененной реактивной чувствительностью легко подвергается воздействию не только специфических, но и неспецифических агентов, расширяя спектр непереносимых аллергенов. В структуре аллергических заболеваний АтД является самым ранним и самым частым проявлением atopии, причем в последние годы отмечается тенденция к более тяжелому клиническому течению АтД с изменением его патоморфоза [1]. Степень тяжести АтД можно рассматривать как фактор риска БА. По данным ряда исследований, при тяжелом АтД риск развития БА составляет 70%, при легком – 30%, а в целом 8–10%. Именно поэтому так важно, чтобы лечение АтД было направлено не только на предотвращение обострений самого кожного процесса, но и предупреждение формирования других форм аллергической патологии.

Широко используемое понятие «атопический марш» подтверждает эволюционирующий характер течения аллергии: дебютировав в детском возрасте, эта патология сопровождает больного в течение всей жизни [5]. Известно, что АтД, аллергический ринит (АР) и БА относятся к трем взаимосвязанным заболеваниям по своим патоморфологическим основам и механизмам развития.

В патогенезе atopического дерматита ведущую роль играют иммунные механизмы. Установлено, что ДК кожи (клетки Лангерганса) презентруют антиген Т-хелперам, активация которых происходит по Th2-типу. Активированные Th2-лимфоциты

продуцируют цитокины, особенно ИЛ-4. В коже больных АтД обнаруживают значительно больше клеток Лангерганса, чем у здоровых. При повторном поступлении аллергена происходит дегрануляция тучных клеток и выделение медиаторов воспаления, запускающих раннюю фазу аллергической реакции, клинически проявляющуюся зудом кожных покровов, гиперемией, отеком. В дальнейшем под действием ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8 происходит усиление миграции эозинофилов и макрофагов в очаг воспаления и хронизация аллергического воспаления кожи.

Эпителиальные клетки продуцируют подобный ИЛ-7 цитокин — TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin), способный существенно активировать миелоидные ДК человека и индуцировать опосредованный Th2-клетками воспалительный ответ, характеризующийся высоким уровнем образования ФНО- α и низкой продукцией ИЛ-10. Обнаружено, что TSLP экспрессируется в большом количестве кератиноцитами кожи больных АтД и связан с активацией ДК *in situ*. Показано, что у человека TSLP может потенциально активировать CD11c⁺ ДК и индуцировать образование хемокинов-аттрактантов Th2-клетками: TARC (англ. Thymus and Activation-Regulated Chemokine, известный также как CCL17) и MDC (англ. Macrophage Derived Chemokine, или CCL22). Активированные ДК притягивают Th0-лимфоциты к образованию цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13, ФНО- α , тогда как синтез/секреция ИЛ-10 и ИФН- γ снижаются. Экспрессия TSLP связана с миграцией и активацией клеток Лангерганса *in situ*. Воспалительный ответ Th2-клеток, инициированный TSLP, реализуется через экспрессию молекул OX40L. В настоящее время описано больше 20 факторов, ответственных за формирование АтД. Предрасположенность к атопии связывают преимущественно с генами, находящимися на хромосомах 1q23-q25, 13q14.1, 11q12-q13, 6p21.2-p12, 5q33.2t 5q32. Формированию аллергического воспаления в коже способствуют цитокины (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-13, ИЛ-18, ТФР- β , ФНО- α), а также хемокины (CCL11, или эотаксин, и др.).

Исходя из представленных данных, является весьма перспективной разработка, а также доклиническая оценка эффективности и безопасности препаратов, обладающих иммунодепрессивной активностью.

Исследование специфической активности лекарственного средства проводилось *in vitro* на нескольких типах клеток человека и *in vivo* на лабораторных животных, при этом использовались трансгенные мыши с биологической моделью атопического дерматита.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Характеристика животных и условий их содержания

Содержание животных и уход за ними производился на основании законодательных и нормативных документов, регламентирующих работу с лабораторными животными.

Этично-правовые нормы регламентированы в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986).

Характеристики тест-системы (мыши):

- Вид – трансгенные мыши;
- Масса тела в начале исследования – 18-22 г;
- Возраст на начало исследования – 3 месяца;
- Период акклиматизации – 14 суток.

Карантин/адаптация. Прибывшие животные до начала исследования были помещены в отдельную комнату на период адаптации (14 дней). Во время этого периода у животных контролировали проявление отклонений в состоянии здоровья.

Распределение по группам. Животных распределяли по группам случайным образом, используя в качестве критерия массу тела, так, чтобы индивидуальная масса животных не отличалась более чем на 20% от средней массы животных одного пола.

Идентификация. Каждому животному был присвоен индивидуальный номер, в соответствии с которым животному ставилась метка либо проколом ушной раковины, либо окраской красителями (эозин и метиленовый синий) поверхности хвоста по разработанным схемам. На этикетке клетки определенного цвета указывали группу, номер животного, метку, код исследования, руководителя.

Содержание животных. Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, изложенным в руководстве «Guide for care and use of laboratory animals (ILAR publication, 1996, National Academy Press)».

В комнате содержания животных поддерживались следующие условия окружающей среды: температура окружающего воздуха 18-24°C; относительная влажность 30-70%; автоматическая смена 12-ти часового светового периода (06.00-18.00 – день, 18.00-06.00 – ночь); 100% вентиляция без рециркуляции со сменой воздуха 7-12 объемов комнаты в час.

Мыши содержались в отдельных помещениях в поликарбонатных клетках на подстилке с учетом пола животных, так как исследуются половозрелые животные.

В качестве подстилки использовались опилки деревьев хвойных пород, стерилизованные в сухожаровом шкафу.

Комбикорм полнорационный для лабораторных давался *ad libitum* в кормовое углубление крышки клетки (табл.1).

Таблица 1. Состав комбикорма для лабораторных животных (экструдированный)

Корм для лабораторных животных		
В состав корма входят	Показатели качества	
1. Кукуруза	1. Сырой протеин	22,98 %
2. Шрот соевый	2. Обменная энергия	332 ккал
3. Пшеница	3. Сырая клетчатка	2,66 %
4. Мясная мука	4. Сырой жир	6,08 %
5. Кукурузный глютен	5. Фосфор	0,62 %
6. Премикс П2 Пушновит 0,5%	6. Натрий хлористый	0,1 %
7. Масло растительное подсолнечное стабилизированное	7. Лизин	1,5 %
8. L-лизин моногидрохлорид	8. Метионин+Цистеин	1,15 %
9. DL-метионин	9. Кальций	0,93%
10. Фосфат дефторированный	10. Медь	9 мг/кг
11. Известняковая мука	11. Цинк	53 мг/кг
12. Д-треонин	12. Кобальт	1,35 мг/кг
	13. Йод	1 мг/кг
	14. Марганец	57 мг/кг
	15. Железо	100 мг/кг
	16. Витамин А	27 тыс. МЕ/кг

	17. Витамин D3	1,5 тыс. МЕ/кг
	18. Витамин E	125 мг/кг
	19. Витамин K3	5 мг/кг
	20. Витамин B1	30 мг/кг
	21. Витамин B2	20 мг/кг
	22. Витамин B3	30 мг/кг
	23. Витамин B4	1000 мг/кг
	24. Витамин B5	80 мг/кг
	25. Витамин B6	15 мг/кг
	26. Витамин Bc	4 мг/кг
	27. Витамин B12	00,05 мг/кг
	28. Витамин C	70 мг/кг
	29. Витамин H	0,04 мг/кг

Корм сбалансирован по аминокислотному составу, минеральным веществам и витаминам, изготовлен из высококачественных компонентов. Проведены лабораторные исследования на токсичность. Корм не токсичен. Экологически чистый продукт.

Профильтрованная водопроводная вода давалась в стандартных автоклавированных питьевых бутылочках.

Все процедуры по рутинному уходу за животными осуществлялись в соответствии с правилами, принятыми в виварии и лаборатории.

Ежедневно производился внешний осмотр состояния животных и показателей внешних параметров среды.

Эвтаназия (безболезненное умерщвление животного) проводилась ответственным лицом в соответствии с требованиями, принятыми в институте, путем ингаляции CO₂. Уборка трупа животного производилась только после того, как смерть была констатирована лицом, ответственным за работу с животным.

Владелец регистрационного удостоверения

ООО «Триатоп»

Дипептид γ -DGl_u-DT_{gr} (Тд) инъецировали мышам внутривентриально, 500 мкг/кг.

2.3. Исследования in vitro

Влияние тимодепрессина на выработку цитокинов было исследовано на культуре мононуклеарных клеток крови. Периферическую кровь здоровых доноров получали в 9-10 часов утра натощак в центрифужные пробирки в объеме 10 мл с гепарином из расчета 25 МЕ/мл. Использовали мононуклеарную фракцию клеток крови. Мононуклеарные клетки выделяли из крови центрифугированием на слое фикола-верографина ($d=1,077$ г/мл) по методу Воум. Клетки из интерфазы отмывали и культивировали в CO₂-инкубаторе в полной питательной среде (ППС) при исходной концентрации $2 \cdot 10^6$ клеток/мл. Состав ППС: среде RPMI-1640 с добавлением гентамицина (150 мкг/мл), инактивированной эмбриональной телячьей сывороткой (10%), глутамина (15 мМ; все реагенты фирмы «Sigma», США).

Продукцию цитокинов определяли в супернатантах культур активированных клеток после 48-часовой инкубации со стимуляторами. При изучении индуцированной синтеза ИФН α в качестве стимулятора в культуральную среду добавляли соответственно вирус болезни Ньюкасла (ВБН) в субоптимальном титре, для индукции синтеза ФНО α и ИФН γ использовали фитогемагглютинин (ФГА) в концентрации 5 мкг/мл. Содержание цитокинов в супернатантах определяли с использованием твердофазного иммуноферментного анализа с применением коммерческих тест-систем фирм «Протеиновый контур» (ФНО α , ИФН α) и «Diacclone» (ИФН γ).

Для определения внутриклеточных цитокинов (ИФН γ и ИЛ-4) мононуклеарные клетки крови активировали смесью фоболмиристатацетата (10 нг/мл; «Sigma») и иономицина (750 мкг/мл; «Sigma») в присутствии моненсина (3 мкг/мл) в течение 5 ч в ПКС при 37°C в CO₂-инкубаторе. После отмывания клетки фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида («Sigma») в течение 10 мин при 4°C. Отмытые клетки пермеабелизировали 0,1%-ным раствором сапонина («Sigma») на фосфатно-солевом буферном растворе, pH 7,2 в течение 20 мин при IFN γ или к IL-4, мечеными флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) («Becton Dickinson», США). Для оценки содержания внутриклеточных цитокинов в Т-лимфоцитах мононуклеары одновременно окрашивали моноклональными антителами к CD3, мечеными фикоэритрином (PE). Клетки отмывали 0,1 %-ным раствором сапонина на фосфатно-солевом буфере и анализировали методом

двухцветной цитометрии на проточном цитометре FACSCalibur («Becton Dickinson») в программе CELL QUEST.

Препарат добавляли в двух концентрациях: 1 и 10 мкг/мл культуры клеток непосредственно в питательную среду на весь срок роста культуры

Выработка ФНО α , IFN α и IFN γ регистрировалась по их концентрации в надосадочной жидкости культивируемых клеток. Кроме того, продукцию IFN γ и IL-4 определяли по накоплению этих цитокинов в клетках. Эффект Тимодепрессина изучен на нескольких типах клеток человека, которые можно объединить в две группы. В одну из них входят фагоцитирующие клетки (нейтрофилы, моноциты), а также эпителиальные клетки тимуса и эндотелиальные клетки сосудов пуповины (известно, что в условиях активации два последних типа клеток могут проявлять макрофагоподобную активность). Вторую группу образуют лимфоциты - незрелые (тимоциты) и зрелые (лимфоциты крови), покоящиеся и активированные. В работе использовалась цельная моноклеарная фракция, в которой объектом изучения действия пептидов служили Т-лимфоциты, это определялось деталями использованных тест-систем: оценивали экспрессию маркеров Т-клеток, в качестве стимулятора использовали Т-клеточный митоген ФГА, внутриклеточные цитокины выявляли в CD34+ клетках. Длительность эксперимента составила 17 дней, пробы отбирали на 10 и 17 день.

Также на культуре клеток человеческого костного мозга было изучено влияние тимодепрессина на пролиферацию CD34+ клеток человеческого костного мозга, а также подавление фибронектин-связывания эозинофилов, продуцируемых *in vitro* дифференцировкой CD34 + клеток.

Препарат добавляли в двух концентрациях: 1 и 10 мкг/мл культуры костного мозга человека непосредственно в питательную среду на весь срок роста культуры [1, 2].

2.4. Исследования *in vivo*

Для моделирования атопического дерматита были использованы трансгенные мыши обоих полов массой 18-22 г. Препарат инъецировали мышам внутривентрально, 500 мкг/кг ежедневно или периодически: 5-дневное лечение - 1 неделя отмены препарата, дважды, затем 8 дней лечения; продолжительность эксперимента составила 32. Кровь отбирали перед введением препарата, непосредственно после введения, на 10 и на 17 день после введения.

Чтобы имитировать генетический или воспалительный эпидермальный барьер, который существует в коже человека, использовали метод снятия ленты. Эта процедура состоит из повторного применения клейкой ленты в той же области поверхности кожи для удаления последовательных верхних слоев, тем самым изменяя защищающий кожу роговой слой.

Для увеличения проникновения экзогенных веществ в этот роговой слой использовали метод окклюзии кожи пятнами. Данный метод позволяет предотвратить потерю воды и, таким образом, позволяет удерживать воду внутри кожи, вызывая повреждение эпидермального барьера и, следовательно, увеличивая проникновение приложенных веществ.

Для моделирования атопического дерматита использовали аллерген-индуцированную модель. Большинство аллерген-индуцированных животных моделей для человеческого АД включают сенсibilизацию мышей овалбумином (OVA). Эпикальное применение OVA к интактной коже сенсibilизирует и инициирует развитие поражения у мышей.

Воспалительный ответ, вызванный OVA зависит от $\alpha\beta$ и не зависит от $\gamma\delta$ Т-клеток; при этом повышается количество дермальных тучных клеток, эозинофилов и дендритных клеток. После трех периодов патча, воспаление кожи и уровни IL-4 обычно ослабевает.

Сенсibilизация OVA вызывает следующие реакции: острая реакция (эритема, отек, папулы, спонгиоз), хроническая реакция (лихенификация, эпидермальная гиперплазия), повышение Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), повышение общего или специфического IgE, повышение Th1 (IFN- γ , IL-12), повышение Th17 (IL-17), повышения фактора некроза опухоли (ФНО), что приводит к повышенной выработке гранулоцитов, в частности, эозинофилов.

Регистрируемые показатели: соотношение веса селезенки к массе тела, содержание гранулоцитов селезенки, содержание эозинофилов селезенки, содержание гранулоцитов лимфатических узлов, кожное воспаление и содержание IgE.

Эозинофилы играют ключевую иммунорегуляторную роль в качестве антигенпредставляющих клеток. Они модулируют активность CD34⁺ Т-клеток, дендритных клеток, В-клеток, тучных клеток, нейтрофилов и базофилов.

2.5. Статистическая обработка результатов

Данные представлены в таблицах и графиках как среднее и стандартное отклонение от среднего. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ SPSS-10. Учитывая независимость выборок, значимость различий оценивали Н-тестом Крускала-Уоллиса с последующими попарными сравнениями критерием Манна–Уитни. Различия признавались значимыми при $p < 0,05$. Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента (t) и критерия χ^2 при 5% уровне значимости [Лангер Г.Ф., 1990]. Данные обрабатывали в программе SPSS –10, на базе процессора Intel Pentium 333.

3. ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

3.1. Изучение на мононуклеарных клетках крови

Исследовано действие Тимодепрессина на выработку мононуклеарными клетками крови ряда цитокинов. Выработка ФНО α , IFN α и IFN γ регистрировалась по их концентрации в надосадочной жидкости культивируемых клеток. Кроме того, продукцию IFN γ и IL-4 определяли по накоплению этих цитокинов в клетках. Тимодепрессин не оказывал значимого влияния на секрецию цитокинов нестимулированными лимфоцитами, хотя при действии на спонтанную секрецию IFN α проявляется отчетливая тенденция к ее усилению. При действии пептида на фоне стимуляции клеток ФГА регистрируется значимое подавление секреции ФНО α при концентрациях 1,0 и 10,0 мкг/мл.

Обращаясь к исследованию влияния пептидов на содержание Т-клеток, продуцирующих IFN γ и IL-4 и определяемых по накоплению этих цитокинов в условиях блокады процесса секреции, мы исходили из представлений о возможности маркирования субпопуляций Т-хелперов - Th1 и Th2 – обнаружением в них указанных цитокинов – IFN γ и IL-4.

Присутствие Тимодепрессина в культуре мононуклеаров крови, стимулированных смесью ФМА и иономицина, оказывало существенное влияние на процент клеток, содержащих IFN γ и IL-4. В присутствии Тимодепрессина, процент клеток, несущих цитокины, снижается, причем ингибирующий эффект особенно сильно выражен при концентрациях пептидов 1,0 и 10 мкМ/л.

Эффект Тимодепрессина изучен на нескольких типах клеток человека, которые можно объединить в две группы. В одну из них входят фагоцитирующие клетки (нейтрофилы, моноциты), а также эпителиальные клетки тимуса и эндотелиальные клетки сосудов пуповины (известно, что в условиях активации два последних типа клеток могут проявлять макрофагоподобную активность). Вторую группу образуют лимфоциты - незрелые (timoциты) и зрелые (лимфоциты крови), покоящиеся и активированные. В работе использовалась цельная мононуклеарная фракция, в которой объектом изучения действия пептидов служили Т-лимфоциты, это определялось деталями использованных тест-систем: оценивали экспрессию маркеров Т-клеток, в качестве стимулятора использовали Т-клеточный митоген ФГА, внутриклеточные цитокины выявляли в CD3+ клетках.

Результаты исследования с достаточной очевидностью позволяют констатировать, что при действии на лимфоциты – тимодепрессин проявляет значительный ингибирующий эффект.

Препарат усиливает адгезию тимоцитов на эпителиальных и эндотелиальных клетках. Следует оговорить, что в последнем случае эффект можно быть связан с действием пептида как на эпителиальные/эндотелиальные клетки, так и на тимоциты, Тимодепрессин при совместной ко-инкубации с клетками тимуса их усиливал адгезию. Тимодепрессин подавляет различные проявления активности лимфоцитов (прежде всего Т-клеток), особенно в условиях активации: он ослабляет экспрессию маркеров активации тимоцитов и Т-клеток, при действии ФГА также ослабляет пролиферативный ответ и в то же время усиливают апоптоз (усиление гибели клеток в процессе активации ведет к ослаблению суммарной результативности ответа на митоген), подавляет выработку и/или секрецию TNF α (в данной системе она индуцировалась ФГА, т.е. оценивалось действие пептидов на секрецию ФНО α Т-клетками, а не моноцитами), IFN γ и IL-4. В данной закономерности также IFN γ и IL-4. При действии пептида на экспрессию костимулирующей молекулы CD28⁺ на покоящихся Т-лимфоцитах (в ее отсутствие распознавание антигена ведет не к активации, а к анергии Т-клеток) при кратковременной инкубации регистрируется усиление и лишь при длительной инкубации - ослабление экспрессии. В целом, безусловно, преобладает ингибирующее действие Тимодепрессина, проявляющееся в 10 тестах.

Таким образом, Тимодепрессин в ряде моделей *in vitro* на клетках человека оказывает ингибирующее действие на лимфоциты (прежде всего активированные Т-клетки).

Данные оценки исследования прямого действия Тимодепрессина на клетки человека *in vitro* чрезвычайно важны для оценки путей и механизмов действия пептидных молекул на клеточном уровне.

3.2. Изучение на CD34⁺ клетках человеческого костного мозга

Целью испытаний являлось экспериментальное изучение влияния Тимодепрессина на пролиферацию CD34⁺ клеток человеческого костного мозга *in vitro*, а также изучение подавления фибронектин-связывания эозинофилов, продуцируемых *in vitro* дифференцировкой CD34⁺ клеток.

Экспериментальное изучение проведено на моделях *in vitro* на популяции клеток костного мозга (CD34⁺ клетки).

В ходе эксперимента выявлено, что Тимодепрессин влияет на пролиферацию CD34⁺ клеток человеческого костного мозга *in vitro* с максимальным увеличением на 300% при 100 нМ Тимодепрессина (рис. 2) и увеличением связывания фибронектина CD34 в 2,5 раза (рис. 3). Однако Тимодепрессин подавлял фибронектин-связывание эозинофилов, продуцируемых *in vitro* дифференцировкой CD34⁺ клеток в его присутствии (рис. 4) и,

используя эффект эозинофилов, значительно ингибировал миграцию человеческих CD34+ Т-клеток (рис. 5). Анализ FACS-MS 34 клеточных поверхностных антигенов, экспрессированных на эозинофилах, дифференцированных *in vitro* из CD34+ клеток, показал, что Тимодепрессин ослабляет CD11b и CD66b, а также несколько других маркеров, связанных с адгезией гранулоцитов и функциональной активностью (рис. 6). Тимодепрессин ингибировал дифференцировку Th1-промотирующих дендритных клеток из моноцитов периферической крови человека (рис. 7).

Рис. 2. Влияние Тимодепрессина на пролиферацию гемопоэтических клеток костного мозга (CD34+ клеток)

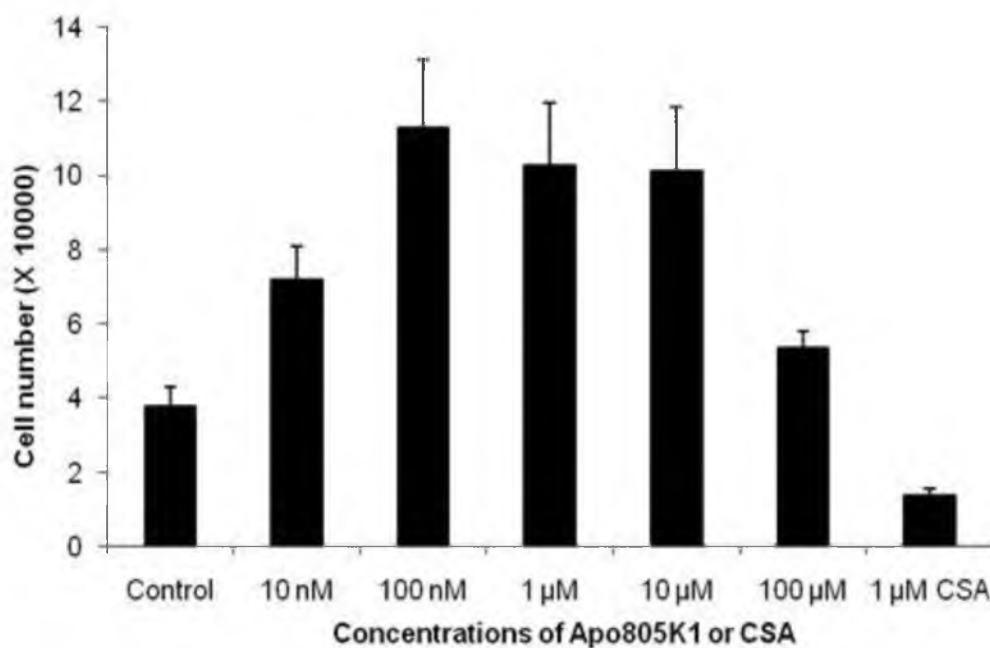


Рис. 3. Влияние Тимодепрессина на адгезию гемопоэтических клеток костного мозга (CD34+ клеток) к фибронектину.

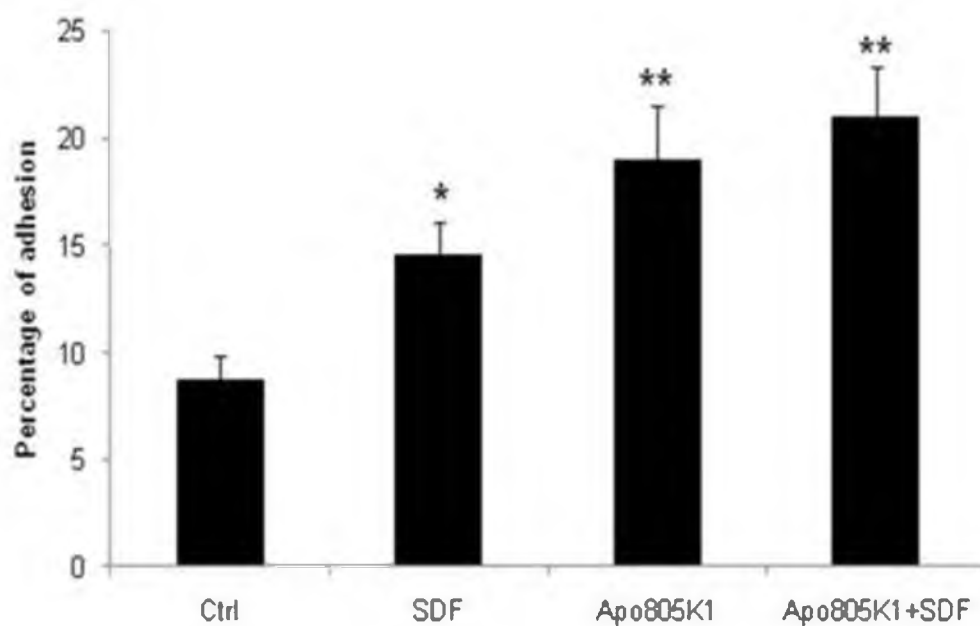
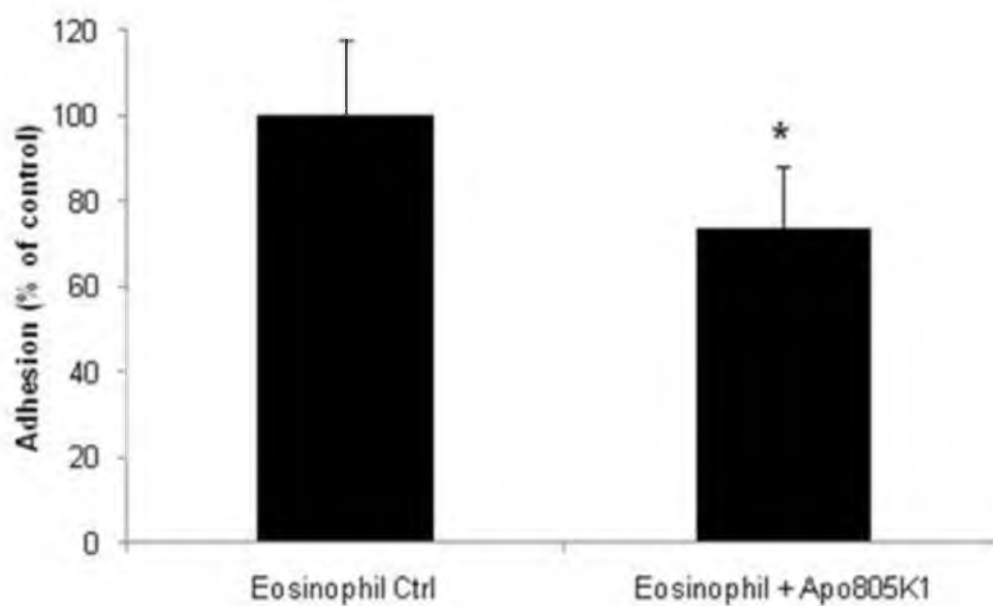


Рис. 4. Влияние Тимодепрессина на адгезию эозинофилов человека к фибронектину



*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ по сравнению с контролем

Рис. 5. Влияние Тимодепрессина на миграцию Т-клеток

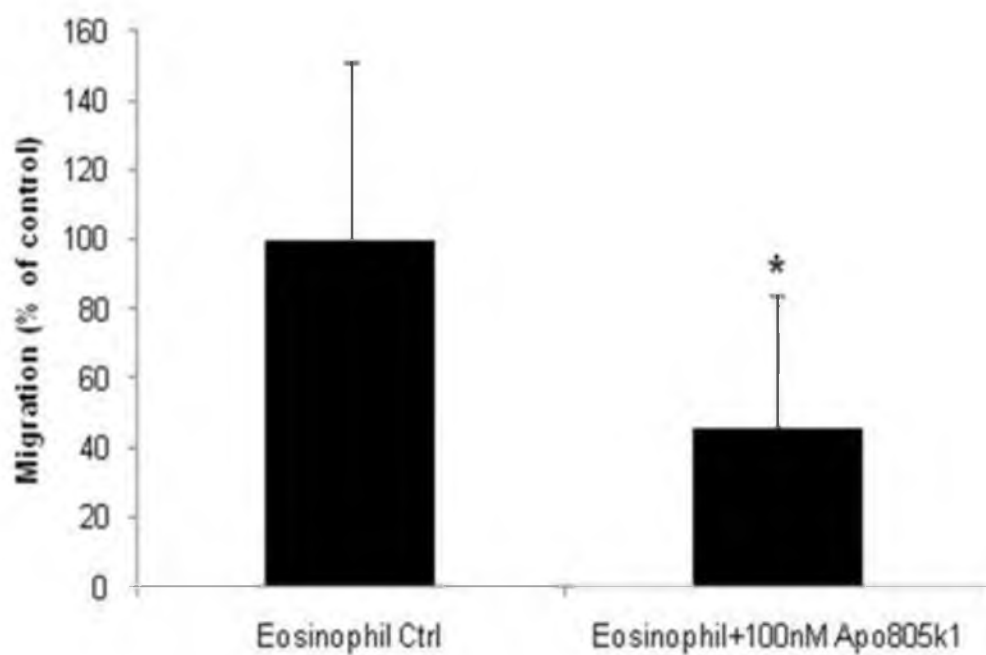


Рис. 6. Влияние Тимодепрессина на содержание CD11b и CD66b клеток на 10 и 17 день дифференциации.

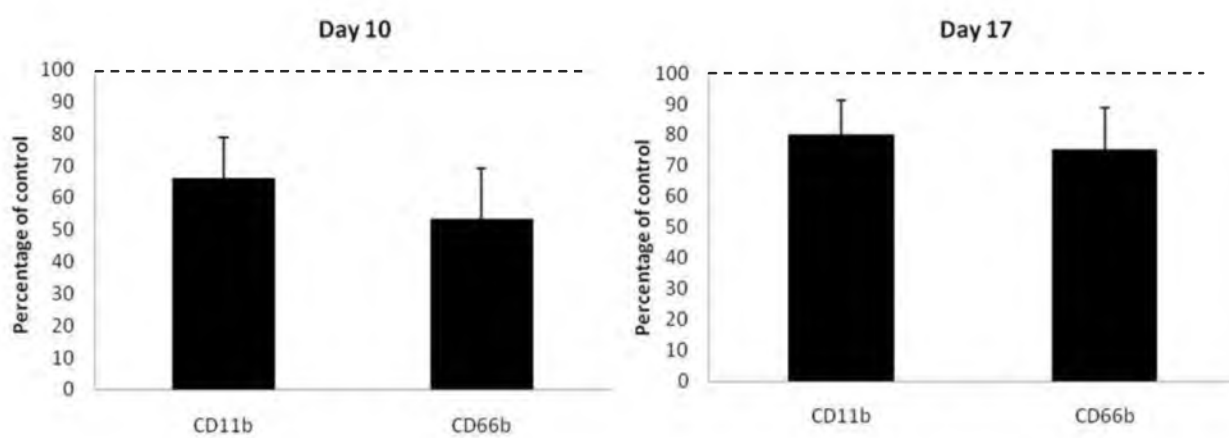
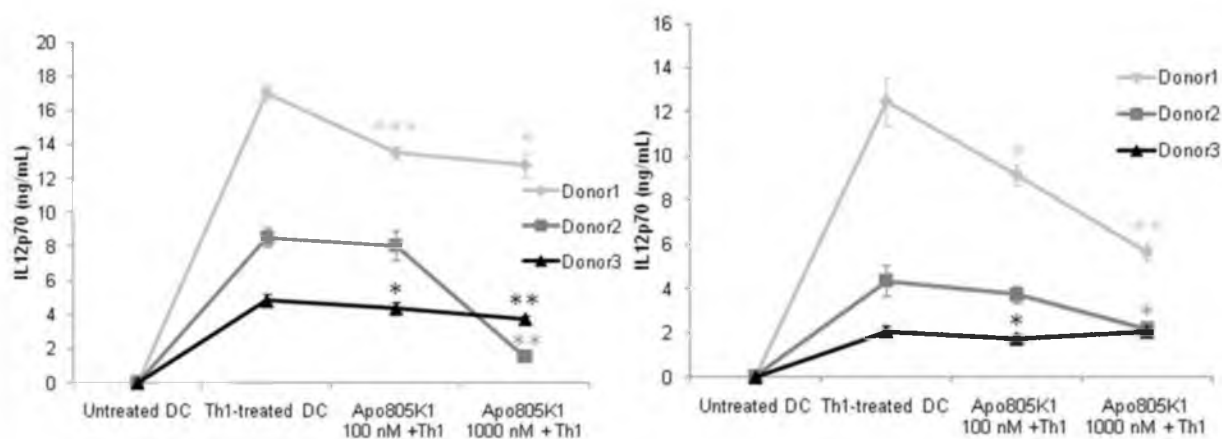


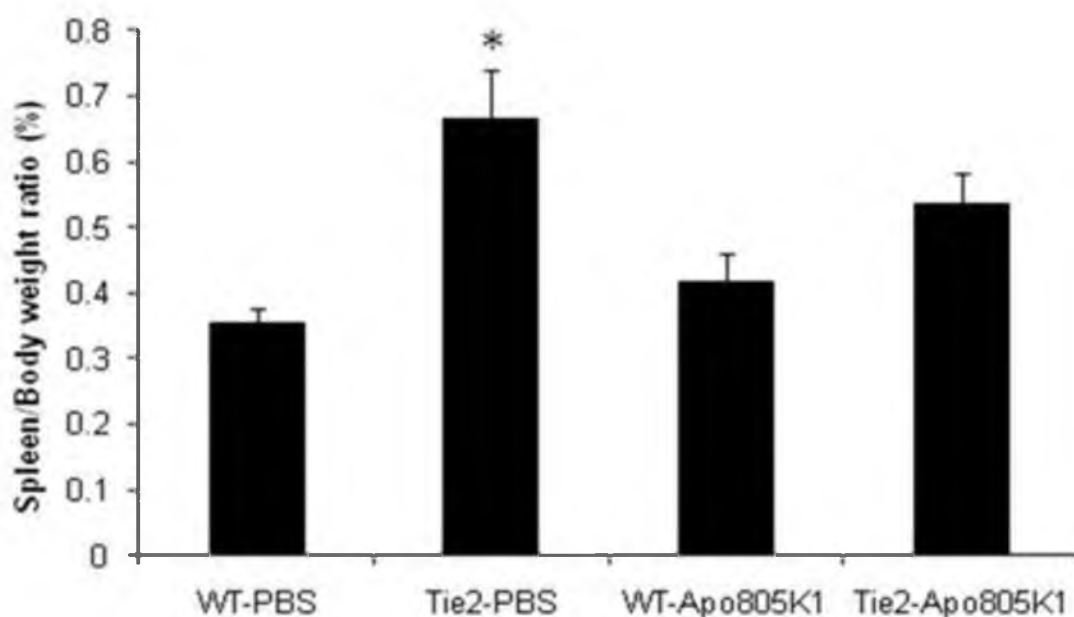
Рис. 7. Влияние Тимодепрессина на выработку ИЛ-12p17 зрелыми дендритными клетками



3.3. Изучение на модели атопического дерматита *in vivo*

У трансгенных мышей с моделью атопического дерматита лечение Тимодепрессином нормализовало аномально повышенное соотношение массы селезенки/массы тела, процент эозинофилов гранулоцитов в селезенке и лимфатических узлах и показатель воспаления кожи. В заключение, Тимодепрессин может иметь терапевтическое преимущество при эозинофильных и воспалительных заболеваниях кожи через его ингибирующее действие на развитие и активацию эозинофилов. Также по сравнению с контролем наблюдалось значительное снижение уровня IgE.

Рис. 8. Влияние Тимодепрессина на соотношение веса селезенки к массе тела у мышей



Интенсивность иммунного ответа напрямую зависит от исходного физиологического состояния организма, которые могут быть подвержены модифицирующему влиянию

различных факторов. Выявлена достоверная положительная связь между массой селезенки (в большей степени значение имеет соотношение массы селезенки к массе тела) и общим количеством антителообразующих клеток. Селезенка является преимущественно лимфоидным органом, изменение ее величины происходит главным образом при миграции лимфоцитов. Тимодепрессин способствовал снижению повышенного соотношения масса тела/масса селезенки (рис. 8).

Рис. 9. Влияние Тимодепрессина на содержание гранулоцитов селезенки у мышей

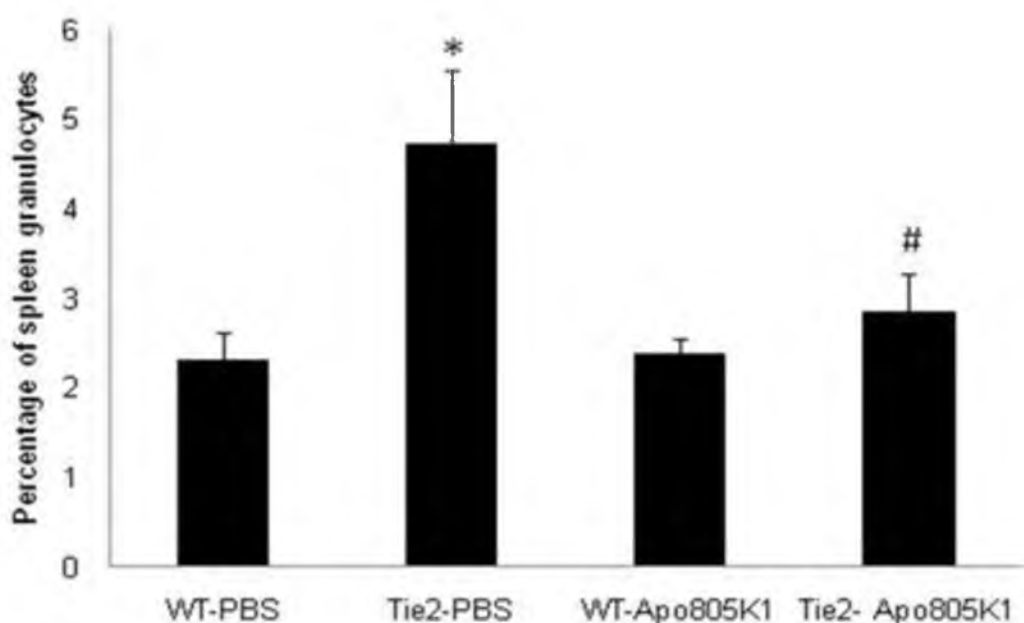
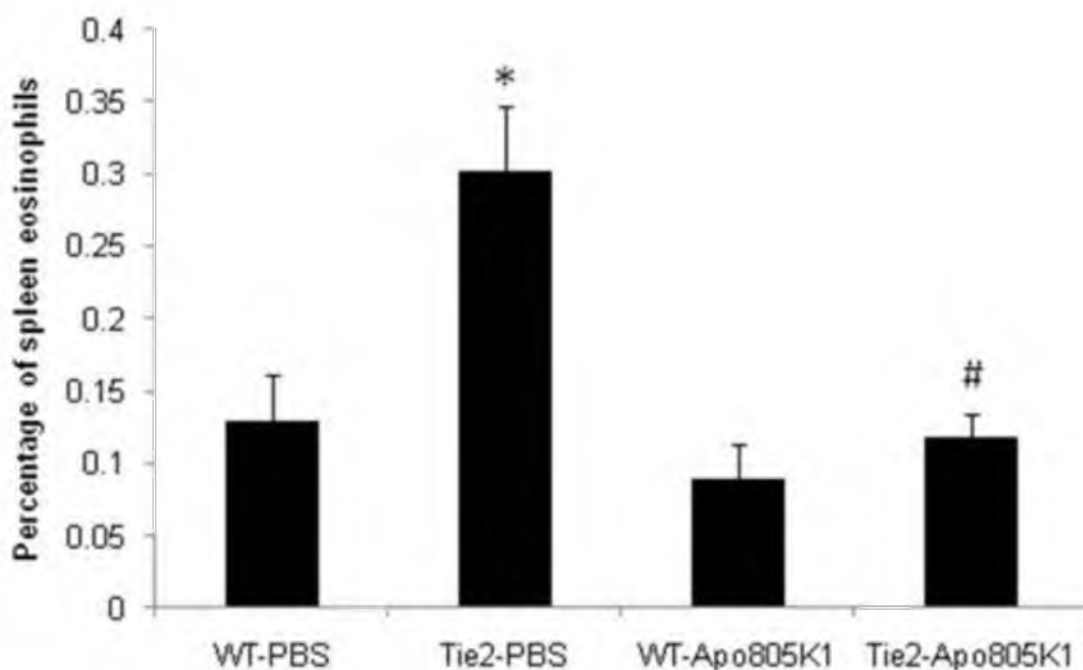
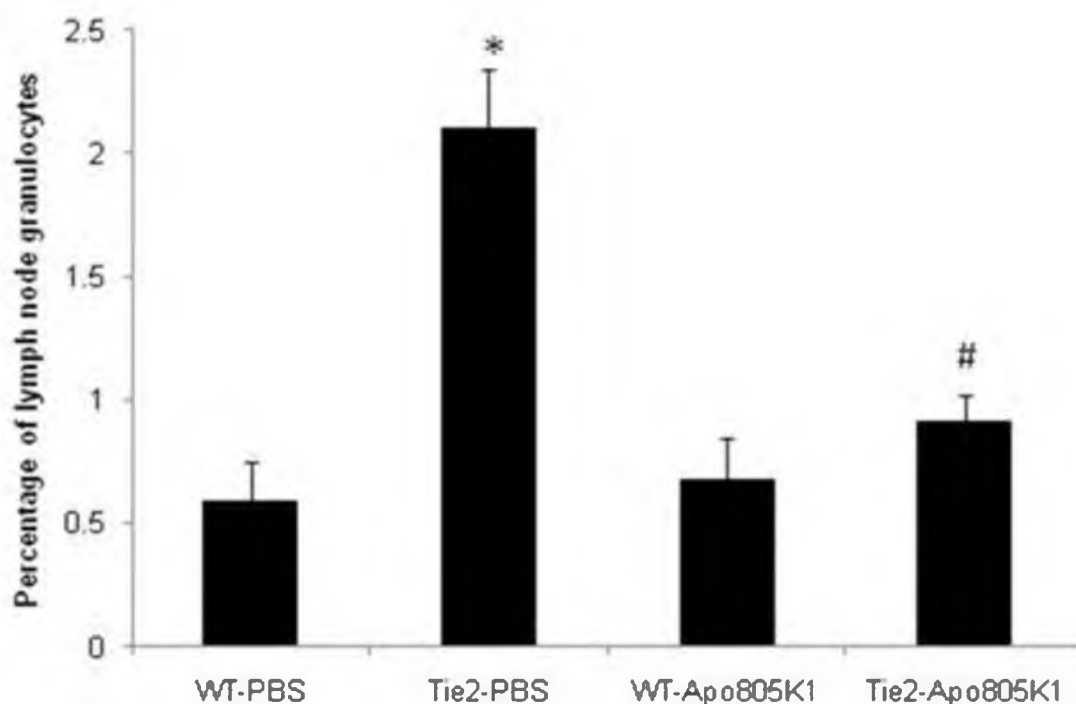


Рис. 10. Влияние Тимодепрессина на содержание эозинофилов селезенки у мышей



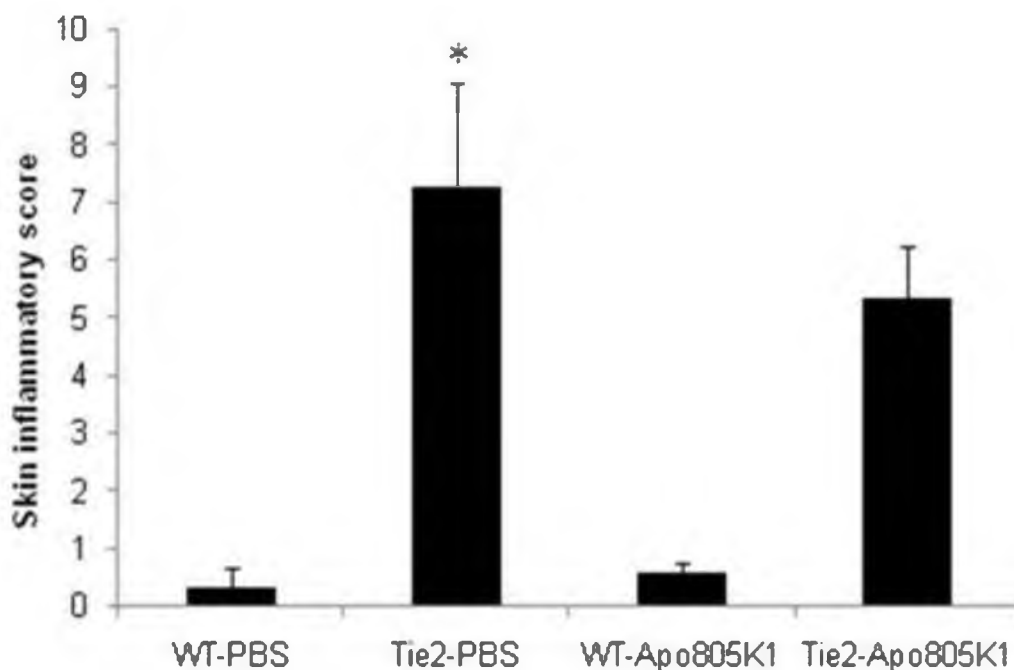
Гранулоциты, в частности, эозинофилы, играют ключевую роль в развитии атопии. Антиген связывается с IgE и тем самым запускает каскад реакций, ведущих к высвобождению медиаторов, таких, как гистами, протеазы, хемотаксические факторы, что, в свою очередь, приводит к синтезу медиаторов воспаления (простагландины, лейкотриены. Фактор активации тромбоцитов, ИЛ). Эти медиаторы обеспечивают вазодилатацию; увеличивают проницаемость капилляров; ведут к гиперсекреции слизи, сокращению гладкой мускулатуры, инфильтрации ткани эозинофилами и другими клетками, участвующими в процессе воспаления. Эозинофилия является одним из основных маркеров атопии. В исследованиях *in vivo* тимодепрессин достоверно снижал до значений, соответствующих норме количество гранулоцитов, в том числе, эозинофилов в крови мышей (рис. 9-10).

Рис. 11. Влияние Тимодепрессина на содержание гранулоцитов лимфатических узлов у мышей



Не менее выраженное действие тимодепрессин оказывал на содержание гранулоцитов лимфатических узлов, достоверно снижая их количество до значений, соответствующих норме (рис. 11).

Рис. 12. Влияние Тимодепрессина на кожное воспаление



Индекс кожного воспаления определялся на основании вычисления суммы трех параметров – размер пораженной области, интенсивность и течение заболевания. Размер оценивали по шкале от 0 до 30, по вовлечению участков кожи разных частей тела. При этом 0 соответствовал отсутствию вовлечения. 30 – полное вовлечение. Интенсивность и течение болезни оценивали по 10 различным критериям по семибальной шкале (0 – отсутствие симптомов. 7 – максимальное проявление), после данные показатели суммировались. Максимальный общий балл составляет 100, последующая оценка осуществлялась по десятибалльной шкале. При введении мышам с моделью атопического дерматита тимодепрессина наблюдалось достоверное снижение (на 27,8 %) индекса кожного воспаления (рис. 12).

Рис. 13. Влияние Тимодепрессина на содержание IgE в плазме крови мышей

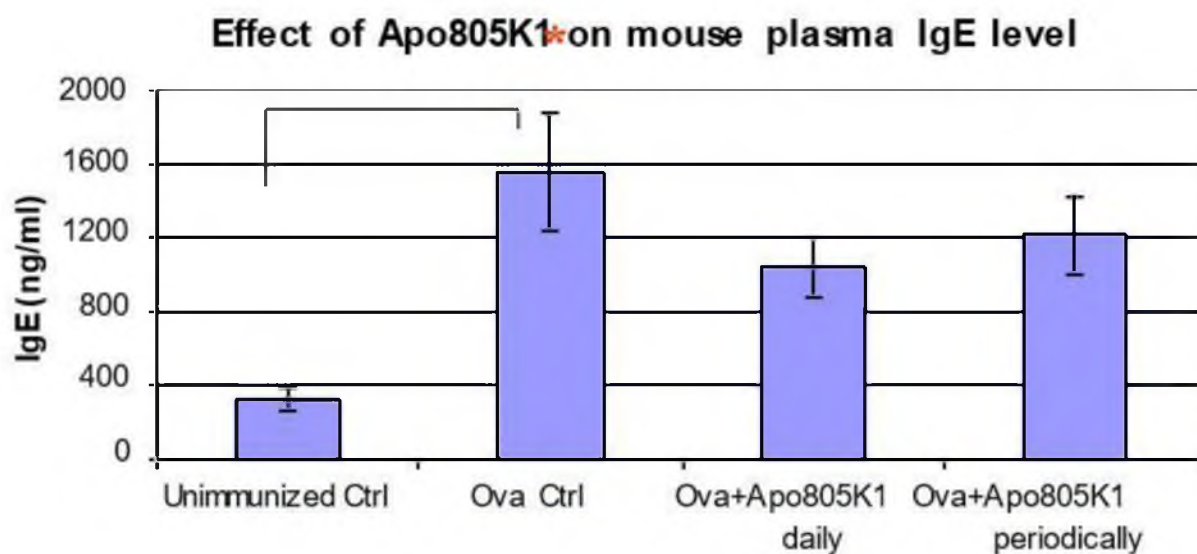
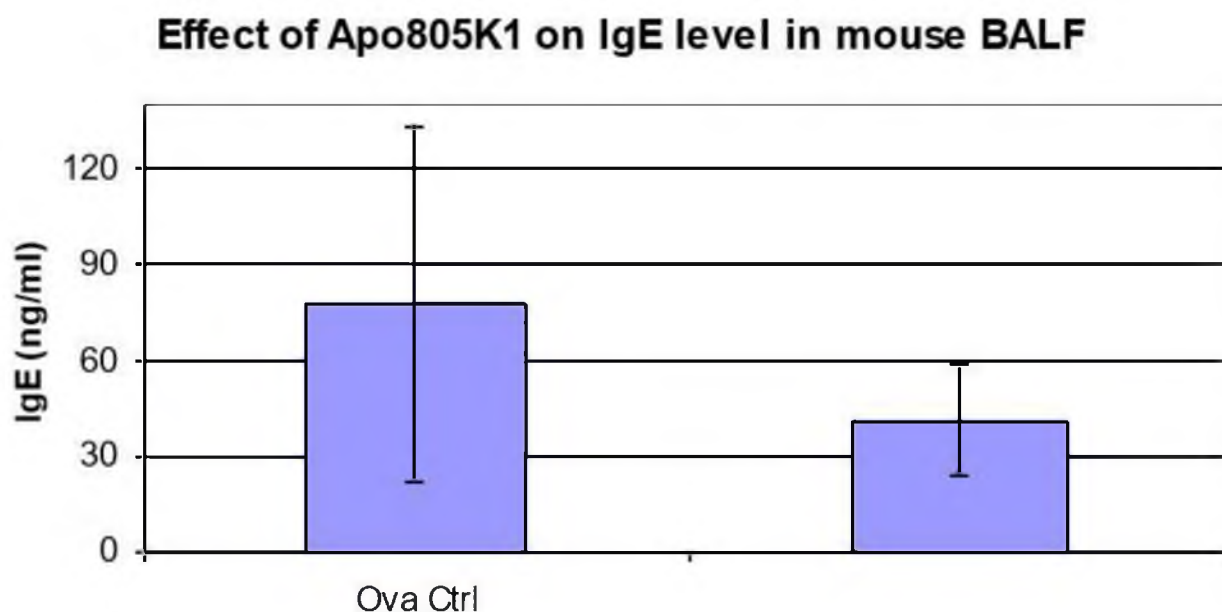


Рис. 14. Влияние Тимодепрессина на содержание IgE в жидкости бронхоальвеолярного лаважа мышей



Так как реакции гиперчувствительности немедленного типа опосредованы IgE, его снижение в плазме крови, а также в жидкости бронхоальвеолярного лаважа является значимым критерием активности препарата. В исследованиях *in vivo* на мышах выявлено достоверное снижение IgE в плазме крови (на 33,8 % при ежедневном использовании и на 21,9 % при периодическом использовании), и снижение IgE в два раза в жидкости бронхоальвеолярного лаважа после введения сенсibilизированным OVA мышам тимодепрессина (рис. 13-14).

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

I тип гиперчувствительности - анафилактический, при котором первичное поступление аллергена вызывает продукцию плазмацитами IgE. Стимулируют выработку IgE-антител ИЛ-4 и ИЛ-10, выделяемые Th2, а угнетают - γ -интерферон и ИЛ-2, выделяемые Th1. Синтезированные IgE прикрепляются Fc-фрагментом к Fc-рецепторам (FcεR1) тучных клеток в слизистых оболочках, соединительной ткани и базофилов в крови. При повторном введении аллергена на тучных клетках и базофилах образуются комплексы IgE с аллергеном (перекрестная сшивка FcεR1 антигеном), вызывающие дегрануляцию клеток. Из гранул в ткани выбрасываются биологически активные медиаторы: вазоактивные амины (гистамин), протеогликаны (гепарин), липидные медиаторы (лейкотриены, простагландины, тромбоцитаактивирующий фактор), ферменты (триптаза, химаза, карбоксипептидаза, катепсин G), и цитокины (TNF- α , IL-4, -13, -3, -5, GM-CSF). Хемотаксические факторы привлекают нейтрофилы, эозинофилы и макрофаги. Эозинофилы выделяют ферменты, катионные белки, лейкотриены и основной белок, повреждающий эпителий. Тромбоциты тоже выделяют медиаторы воспаления. Перечисленные компоненты вызывает сокращение гладких мышц, ослабление сердечной деятельности, развитие коллапса, повышение сосудистой проницаемости, отек.

Эозинофилы играют ключевую иммунорегуляторную роль в качестве антигенпредставляющих клеток. Они модулируют активность CD34+ Т-клеток, дендритных клеток, В-клеток, тучных клеток, нейтрофилов и базофилов.

Анализируя результаты проведенных исследований по изучению механизма действия лекарственного средства, содержащего тимодепрессин (Гамма-D-глутамил-D-триптофан) по данным исследований можно сделать следующее заключение.

Тимодепрессин подавляет иммунную реактивность организма, что проявляется в ингибировании реакций гуморального и клеточного иммунитета.

Проведенные исследования по изучению механизмов лечебного действия препарата Тимодепрессин показали, что на клеточном уровне он ингибирует реакции гуморального и клеточного иммунитета, оказывая обратимое подавляющее действие на содержание гранулоцитов крови. Под его воздействием происходит нормализация дисфункционального состояния гуморального звена иммунитета, характеризующаяся снижением концентрации В-лимфоцитов и гранулоцитов, уменьшением продукции сывороточных иммуноглобулинов.

Тимодепрессин подавляет накопление в цитоплазме Т-клеток ИЛ-4 и γ -интерферона, которые являются основными цитокинами, продуцируемыми ТН-2 и ТН-1 типа

соответственно, и необходимы для образования антител типов IgE, IgG1 и IgG2a. Также уменьшает количество маркеров активации (CD-34) на лимфоцитах.

В экспериментах *in vitro* было выявлено, что Тимодепрессин[®] снижает пропорцию гранулоцитов, особенно эозинофилов, которые вызывают экспрессию Fc-рецепторов, специфичных для IgE.

В экспериментах *in vivo* применение Тимодепрессина нормализовало аномально повышенное соотношение массы селезенки/массы тела, процент эозинофилов гранулоцитов в селезенке и лимфатических узлах и показатель воспаления кожи. В заключение, Тимодепрессин может иметь терапевтическое преимущество при эозинофильных и воспалительных заболеваниях кожи через его ингибирующее действие на развитие и активацию эозинофилов. Также по сравнению с контролем наблюдалось значительное снижение уровня IgE.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Master File: F002-00; Thymodepressin, Injection 0.1% Module 2.4: NONCLINICAL STUDIES OVERVIEW AND SUMMARIES
2. Master File: F002-00; Thymodepressin, Injection 0.1% Module 4: NONCLINICAL STUDIES
3. Семина О.В., Дейгин В.И., Семенец Т.Н. и др. //Радиобиология. Радиоэкология. 2000. Т40 N3. С.315-318.
4. Семина О.В., Семенец Т.Н. Замулаева И.А. и др. //Бюлл. exper.биол.мед. 2005. Т.140. N9. С.335-338.
5. Семина О.В., Семенец Т.Н., Замулаева И.А. и др //Бюлл. exper.биол.мед. 2007
Принята к печати
6. Deigin V.I., Poverenny A.M., Semina O.V. //Immunology Letters. 1999. Vol.67. N1. P.41-46.
7. Kaplan R N, Riba R.D., Zacharoulis S. // Nature.2005. V.438 N8. 820-827.
8. Kucia M., Reza R., Meekus K. et al. //Stem cells. 2005. Vol.23. N7. P.879-894.
9. Solimene AC, Carneiro CR, Melati I et al. //Braz J Med Biol Res. 2001. Vol.34. N5. P. 653-661.
10. Singh S.K., Hawkins C., Clarke LD. et al. // Nature.2004. V.432. 396-402.
11. Wright M.A., Wiers K., Vellody K. et al // Cancer Immunol Immunother. 1998.46. N5. 253-260
12. Young M.R.// Int. J Cancer. 2004. 109. N4. 516-524
13. Young M.R., Wright M.A., Lozano Y.// Int. J Cancer. 1997. 74. 69-74
14. Лабораторные животные: Руководство. Под ред. Каркищенко Н.Н. М.: Медицина; 2003.