

УДК : 577.154 : 636.5

**В.И. Гидранович, В.В. Емельянов, Д.С. Голубев,
Е.И. Большакова, С.А. Большаков**

Роль тимогена в регуляции пентозофосфатного пути в тимусе и иммунной реактивности птицы

Тимус является одним из центральных органов иммунитета и, как эндокринная железа, выполняет две основные функции. После рождения животного в тимусе происходит образование лимфоидных клеток, которые, поступая в лимфатические узлы и селезенку, обеспечивают появление Т-лимфоцитов, участвующих в иммунологических реакциях. Кроме того, тимус син-

тезирует и секретирует гормоны, которые влияют на скорость развития и созревания Т-иммуноцитов [1, 2].

Гормоны тимуса и их синтетические аналоги испытываются как иммуностимуляторы [3, 4, 5, 6], и особенно остро эта проблема стоит в промышленном птицеводстве. Однако известно, что положительный эффект применения гормонов может сопровождаться изменениями и нарушениями функционального состояния эндокринных желез.

Функциональная активность эндокринных желез определяется уровнем обмена веществ в этих органах. Разработка способов целенаправленного воздействия на организм через эндокринную систему и применения гормональных препаратов должна основываться на глубоком знании особенностей метаболизма и механизмов его регуляции в эндокринных железах.

Преыдушие наши исследования показали, что тимоген при внутримышечном введении повышает активность фосфоглюкомутазы и биосинтез пентозофосфатов и нуклеиновых кислот в тимусе, увеличивает относительную массу тимуса и стимулирует иммунную реактивность и клеточный иммунитет [4,5,6].

Целью настоящей работы было изучение роли синтетического аналога природного гормона тимуса – тимогена в регуляции пентозофосфатного пути обмена углеводов в тимусе и иммунной реактивности в организме утят при аэрозольном его применении.

Исследования по решению поставленной цели и соответствующих задач были проведены на трех группах утят, которые были сформированы в суточном возрасте по 7 голов в каждой группе. Первая группа утят была контрольной. Утята второй и третьей групп в начале эксперимента (1-дневном возрасте) были обработаны тимогеном аэрозольно в дозе 200 мкг/м^3 в течение 50 минут. Утята третьей группы были обработаны тимогеном повторно в 7-дневном возрасте в той же дозе и экспозиции. В начале и в конце опыта проводили индивидуальное взвешивание, а в 14-дневном возрасте произвели убой утят всех групп. Для биохимических и иммуноморфологических исследований были взяты кровь и тимус.

В крови определяли содержание гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, фагоцитарную активность тромбоцитов, заверченный фагоцитоз, содержание РНК в лимфоцитах. Эти методы подробно описаны в предыдущей работе [4]. Изучение метаболизма рибозо-5-фосфата в тимусе определяется тем, что рибоза и дезоксирибоза являются составными компонентами нуклеиновых кислот, а тимус отличается их высоким содержанием [2].

Рибоза и ее производные входят в состав нуклеозидмоно-, нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфатов, коферментов нуклеотидного строения (НАД, НАДФ, ФМН, ФАД и КоА) выполняющих исключительно важные функции в обмене веществ и энергии. Рибозо-5-фосфат является одним из основных метаболитов пентозофосфатного пути обмена углеводов. Поэтому вполне логично предположить, что метаболизм рибозо-5-фосфата играет определяющую роль в функциональной активности тимуса.

Для изучения метаболизма рибозо-5-фосфата в тимусе утят готовили гомогенаты на 0,05 М трисс-буфере, рН 7,4 в соотношении 1:49. Инкубационная смесь состояла из равных объемов гомогената и раствора рибозо-5-фосфата 8-ммолярной концентрации. В реакционной среде разведение ткани тимуса было 100 кратным, а концентрация субстрата 4-ммолярной. Инкубирование проводили в течение 5 минут в ультратермостате при температуре 42°C (температура тела). Ферментативные реакции останавливали осаждением белков в реакционной среде трихлоруксусной кислотой из расчета 1часть 20% кислоты на 4 части инкубационной смеси. К каждой пробе ставили соответст-

вующий контроль без инкубации, при этом белки осаждали перед добавлением субстрата. В центрифугатах определяли концентрацию рибозо-5-фосфата и продуктов рибозофосфатизомеразной, транскетолазной и трансальдолазной реакций, по образованию которых оценивали активность соответствующих ферментов [7,8,9,10]. Активность ферментов рассчитывали в нмоль (или у.е. – ΔЕ·100) в секунду на грамм ткани. Полученные экспериментальные данные подвергали статистической обработке.

Экспериментальные исследования показали, что изменения в крови утят под влиянием тимогена были незначительными, за исключением РНК лимфоцитов (табл. 1). Содержание РНК в лимфоцитах увеличилось после двукратной обработки тимогеном на 18,47% (P<0.001).

Результаты анализа лейкограммы крови утят свидетельствуют, что тимоген вызывает повышение количества Т-лимфоцитов на 23,47% (P<0.01) по сравнению с контролем. Аналогичное действие оказывает тимоген и при внутримышечном введении.

Объективным показателем иммунной реактивности организма является фагоцитарная активность тромбоцитов крови (табл. 2).

Из приведенных данных видно, что аэрозольная обработка утят тимогеном стимулирует фагоцитарную активность тромбоцитов крови практически по всем основным показателям.

Таблица 1

Морфологический и биохимический состав крови утят

Группа	Показатели	Гемоглобин г/л	Эритроциты, 10 ¹² /л	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	Тромбоциты, 10 ⁹ /л	РНК лимфоцитов (СЦК)
1	M±m	107,60±2,60	2.16±0.07	28.90±5.89	44.00±3.13	1.57±0.03
2	M±m	111,80±2,38	2.14±0.05	26.60±1.94	42.10±2.46	1.63±0.03
	% 2-1	103.90	99.07	92.04	95.68	103.82
	P 2-1	>0.2	>0,5	>0.5	>0.5	>0,5
3	M±m	113.00±2.60	2.26±0.03	29.60±3.55	46.70±3.19	1.86±0.06
	% 3-1	105.01	104.63	102.42	106.13	118.47
	P 3-1	>0.5	>0.02	>0.5	>0,5	<0.001

Таблица 2

Фагоцитарная активность тромбоцитов крови утят

Группы птиц	Показатели	Процент фагоцитоза	Фагоцитарный индекс	Фагоцитарное число	Процент переваривания	Индекс переваривания
1	M±m	34,81±1,70	0,97±0,03	2,70±0,18	12,30±0,26	0,13±0,01
2	M±m	42,01±1,71	1,20±0,01	2,70±0,20	13,00±0,17	0,16±0,01
	% 2-1	120.68	123.71	100	105.69	123
	P 2-1	<0.05	<0.01	-	>0.05	<0.05
3	M±m	44.40±3.00	1.11±0.01	2.62±0.02	15.41±0.28	0.16±0.01
	% 3-1	127.55	114.43	97.04	125.28	123.00
	P 3-1	<0.01	<0.01	>0.5	<0.01	<0.05

Показателями развития тимуса могут служить абсолютная его масса и относительная, т.е. отношение массы тимуса к массе тела. Результаты этих исследований и расчетов приведены в таблице 3.

Таблица 3

Влияние тимогена на рост и развитие тимуса утят

Группы	Показатели	Масса утят (г)		Масса тимуса	
		1-дневных	14-дневных	Абсолютная масса (г)	Относительная масса (%)
1	M±m	50,00±0,65	267,10±4,65	0,77±0,01	0,288±0,01
2	M±m	50,10±0,54	273,00±4,98	0,81±0,01	0,296±0,004
	% 2-1 P 2-1	100,20 -	102,20 >0,5	105,19 >0,05	102,9 >0,05
3	M±m	51,60±0,86	279,90±6,93	0,87±0,02	0,311±0,001
	% 3-1 P 3-1	103,20 >0,5	104,79 >0,5	112,98 <0,01	111,46 <0,05

Масса утят за 14 дней эксперимента возросла в первой группе в 5,34, во второй – в 5,45 и в третьей – в 5,42 раза. Результаты этих расчетов и данные, приведенные в таблице 3, свидетельствуют, что тимоген при аэрозольном применении не оказал какого-либо заметного влияния на рост утят, в то время как при двукратном внутримышечном введении стимулировал прирост массы утят на 10% [4].

Более определенное влияние оказывает тимоген на развитие тимуса. При однократной обработке утят изменения являются незначительными, а при двукратной обработке тимоген стимулировал увеличение абсолютной массы тимуса на 12,98% (P<0.01), а относительной массы – на 11,46% (P<0,05).

Значительный интерес представляло изучение метаболизма рибозо-5-фосфата в тимусе под влиянием тимогена во взаимосвязи с иммунной реактивностью организма утят.

По убыли рибозо-5-фосфата в инкубационной среде оценивали общую рибозофосфатметаболизирующую активность [8].

Рибозофосфатметаболизирующая активность в тимусе утят контрольной группы составила 47,633±1,19 нмоль·сек⁻¹·г⁻¹. После однократной и двукратной аэрозольных обработок рибозофосфатметаболизирующая активность соответственно составила 54,30±1,97 и 57,37±2,13 нмоль·сек⁻¹·г⁻¹. Таким образом, тимоген при однократной аэрозольной обработке стимулировал рибозофосфатметаболизирующую активность в тимусе на 14% (P<0,02), а при двукратной – на 20,43% (P<0,01).

Убыль рибозо-5-фосфата сопровождается образованием кетопентозофосфатов в реакционной среде, что свидетельствует о его изомеризации. Рибулозофосфат-изомераза (Д-рибозо-5-фосфат-кетоизомераза, КФ.5.3.1.6.) катализирует превращение рибозо-5-фосфата в рибулозо-5-фосфат, а далее рибулозофосфат-3-эпимераза (Д-рибулозо-5-фосфат-3-эпимераза, КФ 5.1.3.1) принимает участие в превращении рибулозо-5-фосфата в ксилулозо-5-фосфат. Обе эти ферментативные реакции легко обратимы, а ферменты характеризуются высокой специфичностью к субстратам. Рибулозофосфат-3-эпимераза по активности в различных тканях превосходит рибозофосфат-

изомеразу в 3-8 раз и это позволяет определять активность рибозофосфат-изомеразы по образованию кетопентозофосфатов [11].

Активность рибозофосфат-изомеразы в тимусе интактных утят была равна $35,13 \pm 2,95$; в тимусе утят второй группы – $38,39 \pm 2,22$ и в тимусе утят третьей группы – $41,67 \pm 2,65$ у.е. $\text{сек}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$. Следовательно, наряду со стимуляцией рибозофосфатметаболизирующей активности в тимусе, тимоген оказывает определенное активирующее действие на течение рибозофосфат-изомеразной реакции в тимусе утят.

Рибозофосфат-изомераза является регулирующим ферментом во взаимопревращении пентозофосфатов в неокислительной ветви пентозофосфатного пути. От интенсивности и направленности действия этого фермента зависит дальнейшее использование пентозофосфатов. Так как тимоген стимулирует биосинтез нуклеиновых кислот [4], а тимус характеризуется высоким их содержанием, то это дает основание считать, что активирование рибозофосфат-изомеразы тимогеном, в силу обратимости действия, может играть важную роль в обеспечении тимуса рибозо-5-фосфатом для биосинтетических процессов.

Превращению рибозо-5-фосфата в трансферазных реакциях структурной перестройки предшествуют не только изомеризация в рибулозо-5-фосфат, но и эпимеризация в ксилулозо-5-фосфат. Продукты рибозофосфат-изомеразной и рибулозофосфат-3-эпимеразной реакций являются субстратами транскетолазной и далее трансальдолазной реакций.

Транскетолазная активность тимуса утят контрольной группы составила $116,37 \pm 5,33$, группы с однократной обработкой тимогеном – $124,70 \pm 2,74$ и группы с двукратной обработкой – $134,52 \pm 2,53$ у.е. $\text{сек}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$. Таким образом, однократная аэрозольная обработка утят тимогеном оказала стимулирующее действие на активность транскетолазы тимуса на 7,16%, а двукратная – на 15,60% ($P < 0,01$).

Активность трансальдолазы в тимусе утят первой группы составила $44,62 \pm 1,33$; второй – $47,84 \pm 2,35$ и третьей – $51,88 \pm 2,57$ нмоль $\cdot \text{сек}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$. Тимоген стимулировал активность трансальдолазы в тимусе при однократной и двукратной обработке утят соответственно на 7,22% и 16,27% ($P < 0,05$).

Обобщенные данные о влиянии тимогена на метаболизм рибозо-5-фосфата представлены на рисунке 1.

Обращает на себя внимание тот факт, что тимоген оказывает в одинаковой степени стимулирующее влияние на интенсивность образования продуктов транскетолазной и трансальдолазной реакций в тимусе при использовании рибозо-5-фосфата в качестве исходного субстрата. По-видимому, это связано с тем, что транскетолаза является лимитирующим ферментом неокислительного пентозофосфатного пути.

Тимоген, оказывая активирующее действие на течение транскетолазной и трансальдолазной реакций, способствует переключению метаболизма углеводов с пентозофосфатного пути на гликолитический и наоборот.

Анализ результатов экспериментальных исследований и обобщение ранее полученных данных [4,5,6] свидетельствует, что тимоген как при парентеральном, так и аэрозольном применении стимулирует развитие тимуса и метаболическую активность пентозофосфатного пути. Повышение метаболической активности пентозофосфатного пути способствует образованию пентозофосфатов, необходимых для биосинтеза нуклеозидфосфатов и нуклеиновых кислот, обеспечивающих биосинтез белков иммунной системы. Это, в



Рис. 1. Влияние тимогена на метаболизм рибозо-5-фосфата

Обозначения: РФМА – рибозофосфатметаболизирующая активность
 РФИ – рибозофосфатизомеразная активность
 ТК – транскетолазная активность
 ТА – трансальдолазная активность

свою очередь, ведет к повышению иммунной реактивности и усилению клеточного иммунитета в организме птицы. Следовательно, тимоген как парентерально, так и аэрозольно можно использовать в качестве активатора пентозофосфатного пути обмена углеводов в тимусе и стимулятора иммунной реактивности в организме утят в раннем возрасте

ЛИТЕРАТУРА

1. Уайт А., Хеидлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии: В 3-х т. Т.3. М.: Мир, 1981. -726 с.
2. Кемилева З. Вилочковая железа. М: Медицина, 1984. С. 7-21.
3. Петров Р.В. Костномозговой стимулятор антителопродуцента // Итоги науки и техники. Серия иммунология. ВИНТИ. М.,1983. Т.12. С.63-85.
4. Жаков М.С., Гидранович В.И., Голубев Д.С., Большакова Е.И., Громов И.Н. Биохимические и иммуноморфологические показатели в крови, тимусе и поджелудочной железе утят под влиянием тимогена // Веснік ВДУ, 1998, №4(10). С.52-58.
5. Жаков М.С., Гидранович В.И., Голубев Д.С., Луппова И.М. Влияние иммуностимулятора тимогена на иммуноморфологические и биохимические реакции в тимусе утят // Матер. международной научн.-практ. конф. Мн., 1998. С.121.
6. Жаков М.С., Гидранович В.И., Голубев Д.С., Луппова И.М. Влияние тимогена на иммуноморфологические и биохимические показатели в тимусе утят // Учен. зап. ВГАВМ, Т.34. Витебск, 1998. С.129-131.
7. Головацкий И.Д. О взаимосвязи отдельных этапов гликолиза с пентозным циклом // Химия и обмен углеводов. М., 1965. С.280-286.
8. Кудрявцева Г.В. Пентозофосфатный путь и его взаимосвязь с метаболизмом нуклеиновых кислот. // Успехи совр. биологии, 1978. 85, №1. С.3-17.
9. Kulka R.Q. Colorimetric estimation of ketopentoses and ketohexoses // Biochem. J., 1956. V.63. № 4. P. 542-548.

10. **Bruns F.N., Noltmann E., Vahlhaus E.** Über den stoffwechsel von pibose-5-phospate in haemolisaten. 1. Activitats mesung und Eigenschaften der Pentososphosphat Cyclus in rotten Blutrellen // Biochem, 1958. 330. P. 483-491.
11. **Novelo F., Mc Lean P.** The pentosephospat pathway of glucose metabolism. Measurement of the non-oxydative reactions of the cycle // Biochem. J., 1968. 107. P. 775 .

S U M M A R Y

The Role Thymogenum in Regulation Pentososphosphates pathway of Carbohydrates Metabolism in Thymus and Immunoreactivity in the Poultry organism.

As a result of experimental studies it has been stated that thymogenum stimulates the thymus development and metabolic activity of pentososphosphate pathway that is accompanied by increasing of blood immunoreactivity and reinforcement of the cell - mediated immunity in the organism ducklings.