



УДК : 636.5 : 611.438 : 577.154 : 615.37

**М.С. Жаков, В.И. Гидранович, Д.С. Голубев,  
Е.И. Большакова, И.Н. Громов**

## **Биохимические и иммуноморфологические показатели в крови, тимусе и поджелудочной железе утят под влиянием тимогена**

Современная промышленная технология порождает целый ряд стрессовых факторов, оказывающих тормозящее действие на клеточный и гуморальный иммунитет, и способствует подавлению иммунного ответа в организме птицы.

Ответственной за сохранение иммунного статуса организма является иммунная система. Тимус (вилочковая железа) – один из центральных органов иммунитета, который на ранней стадии эмбрионального развития регулирует многие функции иммуногенеза [1]. К настоящему времени из тимуса выделен ряд иммунологически активных веществ. На основе изученных гормонов тимуса получены иммуностропные препараты, а также синтезированы их аналоги [2].

Одним из таких препаратов является синтетический аналог гормона тимуса – тимоген, который представляет синтетический дипептид, состоящий из триптофана и глутаминовой аминокислоты, аналогичный дипептиду, выделенному из нативного тимуса.

Цель наших исследований – изучить биохимические показатели в тимусе и поджелудочной железе, иммуноморфологические изменения в крови и тимусе у утят под влиянием тимогена и возможность его использования в качестве иммуностимулятора в раннем возрасте.

Для выполнения поставленной цели были проведены исследования на четырех группах утят: двух контрольных (1 и 3) и двух опытных (2 и 4). Утятам второй группы вводили в суточном возрасте на изотоническом растворе хлорид натрия в дозе 10мкг/кг однократно внутримышечно, а утятам четвертой группы вводили внутримышечно двукратно тимоген в суточном и 7-дневном возрастах. Утятам контрольных групп в этом же возрасте вводили изотонический раствор хлорида натрия в тех же объемах. Иммуноморфологические исследования проведены на трех группах (одна контрольная и две опытные), а биохимические исследования – на четырех группах.

Все утята в 14-дневном возрасте были подвергнуты убою. В суточном возрасте и перед убоем было проведено их взвешивание. После убоя у утят для иммуноморфологического и биохимического исследований были взяты кровь, тимус и поджелудочная железа. В гистосрезках изучали соотношение размеров коркового и мозгового вещества, определяли его коэффициент.

В крови определяли содержание гемоглобина и эритроцитов фотоэлектронкалориметрически, подсчитывали количество лейкоцитов и тромбоцитов. Лейкограмма выводилась на основе подсчета 100 клеток. Определяли фагоцитарную активность тромбоцитов [3], и завершённый фагоцитоз [4]. Содержание РНК в лимфоцитах выявляли по методу Браше в модификации [5].

Исследовали активность фосфоглюкомутазы и метаболизм глюкозо-1-фосфата (Г-1-Ф) по пентозофосфатному пути (ПФП) в тимусе и поджелудочной железе. С этой целью готовили гомогенаты на охлаждённом 0,05 М трис-буфере с рН 7.4. Из гомогенатов тимуса, поджелудочной железы и раствора Г-1-Ф готовили инкубационные смеси, в которых разведение ткани было 1:100, а концентрация Г-1-Ф 4 ммоль/л. Инкубацию проводили в ультратермостате в течение 15 минут при температуре + 42 °С. Ферментативные реакции останавливали осаждением белков трихлоруксусной кислотой из расчёта 1 часть 20 % кислоты на 4 части инкубационной смеси. К каждой инкубационной пробе ставили соответствующий контроль без инкубации. В центрифугатах определяли фруктозу [6], сумму пентоз и седогептулозу [7]. Образование метаболитов из Г-1-Ф рассчитывали на грамм ткани и выражали в мкмоль/г. Полученные экспериментальные данные подвергали статистической обработке.

В крови утят опытных групп обнаружены изменения в сторону повышения содержания эритроцитов (табл. 1).

Таблица 1

**Морфологический состав крови утят**

Группы птиц	Показатели	Гемоглобин (г/л)	Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л	Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	РНК лимфоцитов (СЦК)
Контроль	М±м	112,50±2,60	2.08±0.07	22.20±0.86	47.00±2.38	1.12±0.02
Однократное введение	М±м	112,70±2,60	2.14±0.07	24.90±2.16	84.90±6.49	1.23±0.05
	% к контролю	100.1	102.8	112.1	180.6	109.8
	P	>0.5	>0.5	>0.5	<0.001	>0.5
Двукратное введение	М±м	108.60±2.30	2.19±0.12	31.60±2.16	98.10±5.52	1.37±0.06
	% к контролю	96.5	105.2	142.3	208.7	122.3
	P	>0.5	>0.5	<0.001	<0.001	<0.001

Однако достоверных изменений по полученным результатам не наблюдается. Обращает на себя внимание факт увеличения количества лейкоцитов, тромбоцитов и РНК лимфоцитов (СЦК) под воздействием тимогена. Более того, выраженное влияние на вышеперечисленные показатели оказывает тимоген при двукратном его введении. При этом установлено достоверное увеличение количества лейкоцитов, тромбоцитов и РНК лимфоцитов в группе с двукратным введением тимогена не только по отношению к контрольной группе, но и к группе с однократным введением иммуностимулятора.

Более полную оценку иммунной реактивности в организме птицы под влиянием иммуностимулятора тимогена может дать изучение фагоцитарной активности тромбоцитов крови. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что при однократном введении тимогена наблюдается тенденция к изменению показателей фагоцитарной активности тромбоцитов в сторону их повышения, а при двукратном введении тимогена повышается фагоцитарная активность тромбоцитов практически по всем показателям (табл. 2).

Таким образом, исследования морфологического состава крови и фагоцитарной активности тромбоцитов показали, что тимоген является эффективным иммуностимулятором и повышает иммунную реактивность в организме утят.

В связи с вышеизложенным, значительный интерес как с теоретической, так и с прикладной точек зрения представляет выяснение влияния тимогена

на морфометрические показатели тимуса и поджелудочной железы утят. Абсолютная масса этих органов и отношение их массы к массе тела могут быть объективными показателями их развития. Так, если при однократном введении тимогена живая масса утят контрольной группы увеличилась за 14 дней в 5,59 раза, а опытной (2) в 5,56 раз, то при двукратном введении – в 5,44 и 5,54 раза, соответственно. Таким образом, тимоген (двукратное введение) стимулировал прирост живой массы утят на 10% ( $P < 0,001$ ) по сравнению с контрольной группой.

Таблица 2

**Фагоцитарная активность тромбоцитов крови утят**

Группы птиц	Показатели	Процент фагоцитоза	Фагоцитарный индекс	Фагоцитарное число	Процент переваривания	Индекс переваривания
Контроль	$M \pm m$	$40,00 \pm 3,03$	$0,71 \pm 0,10$	$1,78 \pm 0,16$	$18,10 \pm 4,16$	$0,15 \pm 0,04$
Однократное введение	$M \pm m$	$44,80 \pm 4,80$	$0,94 \pm 0,20$	$2,01 \pm 0,17$	$25,30 \pm 8,90$	$0,25 \pm 0,09$
	% к контролю P	112,0 >0,5	132,3 >0,5	112,9 >0,5	139,7 >0,5	166,6 >0,5
Двукратное введение	$M \pm m$	$60,80 \pm 3,90$	$1,24 \pm 0,10$	$2,04 \pm 0,11$	$33,90 \pm 6,80$	$0,43 \pm 0,09$
	% к контролю P	152,0 <0,001	174,6 <0,01	114,6 >0,5	187,2 <0,05	286,6 <0,01

Влияние иммуностимулятора тимогена на развитие тимуса и поджелудочной железы представлено в таблице 3.

Таблица 3

**Влияние тимогена на развитие тимуса и поджелудочной железы утят**

Ткани	Группы	Однократное введение		Двукратное введение	
		Абсолютная масса	Относительная масса	Абсолютная масса	Относительная масса
Тимус (мг)	Контрольная	$967,25 \pm 138,55$	$0,33 \pm 0,03$	$883,00 \pm 37,23$	$0,31 \pm 0,01$
	Опытная % к контролю P	$972,57 \pm 53,89$ 100,5 >0,5	$0,34 \pm 0,07$ 103,0 >0,5	$1015,57 \pm 69,21$ 115,0 >0,5	$0,35 \pm 0,01$ 112,9 <0,01
Поджелудочная железа (г)	Контрольная	$2,22 \pm 0,35$	$0,007 \pm 0,0010$	$2,04 \pm 0,15$	$0,005 \pm 0,0008$
	Опытная % к контролю P	$2,09 \pm 0,17$ 94,1 >0,5	$0,006 \pm 0,0007$ 85,7 >0,2	$2,17 \pm 0,15$ 106,3 >0,5	$0,007 \pm 0,0004$ 140,0 <0,05

Масса тимуса и поджелудочной железы при однократном введении тимогена явных изменений не претерпела, в то же время при двукратном введении иммуностимулятора произошло некоторое увеличение массы этих органов. При анализе процентного отношения массы тимуса к массе тела отмечено незначительное увеличение этого показателя в опытной группе с однократ-

ным введением тимогена, а в опытной группе с двукратным введением относительная масса тимуса увеличилась на 12,9% ( $P < 0,01$ ). Отношение массы поджелудочной железы к массе тела в опытной группе с двукратным введением тимогена возрастает на 40 % ( $P < 0,05$ ).

В корковом веществе тимуса утят контрольной группы плотность составила  $32,10 \pm 2,81$ . В опытной группе при однократном введении тимогена эта величина составила  $61,00 \pm 5,47$ , что составило 190% по отношению к контрольной группе ( $P < 0,01$ ), а при двукратном введении плотность тимоцитов увеличилась до  $68,40 \pm 3,36$ , что, по отношению к контрольной группе, составило 213% ( $P < 0,001$ ). Это свидетельствует о способности тимогена активизировать деление тимоцитов в корковом веществе тимуса, что в дальнейшем способствует повышению количества Т- лимфоцитов в крови.

Таблица 4

**Морфометрические показатели коркового и мозгового вещества тимуса при введении тимогена (мкм)**

Группы	Показатели	Корковое вещество (К)	Мозговое вещество (М)	Коэффициент К/М
Контроль	М±м	230,56±30,7	290,77±20,5	3,89±0,22
Однократное введение тимогена	М±м	340,01±20,5	190,91±10,7	8,43±0,3
	% к контролю	144,3	66,8	216,7
	P	<0,05	<0,001	<0,001
Двукратное введение тимогена	М ± м	370,12±30,2	130,60±10,1	13,06±0,7
	% к контролю	157,7	45,6	349,6
	P	<0,01	<0,001	<0,001

Наши исследования показали, что применение синтетического тимогена приводит к увеличению размеров коркового вещества тимуса утят. Так, увеличение размеров коркового вещества (табл. 4) в группе с однократным введением по отношению к корковому веществу тимуса в контрольной группе было больше на 44,3%, вместе с этим произошло уменьшение размеров мозгового вещества тимуса на 33,2%. При двукратном введении тимогена произошло более интенсивное увеличение (на 57,7%) коркового вещества тимуса по отношению к данному показателю в контрольной группе. В то же время уменьшение размеров мозгового вещества тимуса в опытной группе с двукратным введением тимогена произошло на 54,4% по сравнению с контрольной группой.

Сравнивая опытные группы, можно отметить, что при двукратном введении тимогена продолжалось увеличение коркового вещества в тимусе, в то же время наблюдалось уменьшение размеров мозгового вещества. Увеличение размеров коркового вещества тимуса тесно связано с плотностью тимоцитов в нем. Чем интенсивнее идет пролиферация тимоцитов, тем больше размеры коркового вещества и наоборот.

Большой интерес представляло изучение превращения глюкозо-1-фосфата (Г-1-Ф) в мутазно-изомеразной реакции и его метаболизма по пентозофосфатному пути (ПФП) в изучаемых тканях под влиянием тимогена. Г-1-Ф является продуктом фосфорилазной реакции при расщеплении гликогена. Дальнейшее превращение Г-1-Ф происходит в результате действия фосфоглюкомутазы, которая переводит его в глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф), а Г-6-Ф, в свою очередь, под воздействием фермента глюкозофосфат-изомеразы превраща-

ется во фруктозо-6-фосфат (Ф-6-Ф). В этом мутазно-изомеразном превращении лимитирующим этапом является фосфоглюкомутаза, в то же время активность глюкозофосфат-изомеразы значительно превосходит активность фосфоглюкомутазы. Это дает возможность определять активность фосфоглюкомутазы по образованию Ф-6-Ф.

Результаты исследований о влиянии тимогена на активность фосфоглюкомутазы представлены в таблице 5, из которой видно, что при однократном введении тимогена активность фосфоглюкомутазы в тимусе утят увеличивается на 48,6% по сравнению с контрольной группой. В опытной группе с двукратным введением тимогена увеличение активности фосфоглюкомутазы в тимусе было больше только на 15,0%. Активность фосфоглюкомутазы в поджелудочной железе при однократном введении тимогена повысилась на 12,5 %, а при двукратном введении снизилась на 12,9 %, но эти изменения оказались статистически недостоверными.

Таблица 5

**Влияние тимогена на активность фосфоглюкомутазы в тимусе и поджелудочной железе утят (мкмоль/г)**

Ткани	Группы	Однократное введение	Двукратное введение
Тимус	Контрольная	12,89 ± 1,18	15,46 ± 0,76
	Опытная % к контролю Р	19,16 ± 0,64 148,6 < 0.001	17,78 ± 1,06 115,0 > 0,5
Поджелудочная железа	Контрольная	10,42±2,29	12,02±1,51
	Опытная % к контролю Р	11,73±2,04 112,5 >0.5	10,47±2,60 87,1 >0.5

Г-1-Ф может превращаться по ПФП с образованием таких метаболитов, как пентозофосфаты и седогептулозо-7-фосфат (С-7-Ф). Результаты исследований о влиянии тимогена на образование этих метаболитов в тимусе и поджелудочной железе представлены в таблице 6.

Данные таблицы 6 показывают, что тимоген при однократном его введении стимулирует биосинтез пентозофосфатов в тимусе, а при двукратном введении наблюдается обратная зависимость. В поджелудочной железе тимоген практически не оказывает никакого влияния на биосинтез пентозофосфатов из Г-1-Ф. Совсем другая картина наблюдается в отношении влияния тимогена на образование С-7-Ф в тимусе утят. Так, при двукратном введении тимогена в 2,8 раза повышается образование С-7-Ф из Г-1-Ф, в то время как при однократном введении тимогена это увеличение является незначительным. Изменения в образовании С-7-Ф под влиянием тимогена в поджелудочной железе существенных различий не имели.

Известно, что образование пентозофосфатов из гексозофосфатов идет через две параллельные ветви ферментативных реакций: окислительную и неокислительную [8], при этом 70-80% пентозофосфатов синтезируется за счет транскетолазной и трансальдолазной реакции [7,9,10]. В эндокринных железах, синтезирующих гормоны белковой или пептидной природы, преобладает неокислительная ветвь ПФП.

В нашем случае образование пентозофосфатов находится в прямой зависимости с мутазно-изомеразным превращением Г-1-Ф при однократном введении тимогена как в тимусе, так и в поджелудочной железе. Уменьшение

концентрации пентозофосфатов во время инкубации гомогенатов тимуса с Г-1-Ф сопровождается резким нарастанием С-7-Ф.

Таблица 6

**Влияние тимогена на образование пентозофосфатов и седогептулозы из Г-1-Ф в тимусе и поджелудочной железе утят (мкмоль/г)**

Ткани	Группы	Однократное введение	Двукратное введение
<b>Пентозофосфаты</b>			
Тимус	Контрольная	1,36 ± 0,51	1,69 ± 0,40
	Опытная % к контролю Р	2,69 ± 0,38 197,7 < 0,05	0,98 ± 0,39 57,9 >0,5
Поджелудочная железа	Контрольная	16,22±0,90	16,74±1,01
	Опытная % к контролю Р	17,05±0,66 105,1 >0,2	16,90±0,89 100,9 >0,5
<b>Седогептулоза</b>			
Тимус	Контрольная	4,37 ± 1,19	3,75 ± 0,72
	Опытная % к контролю Р	4,64 ± 0,65 106,1 > 0,05	10,50 ± 1,65 280,0 <0,01
Поджелудочная железа	Контрольная	25,31±2,06	24,46±2,27
	Поджелудочная железа % к контролю Р	24,46±2,27 96,6 >0,5	22,14±3,15 90,5 >0,5

Анализ литературных и полученных нами экспериментальных данных по биосинтезу пентозофосфатов и С-7-Ф во взаимосвязи с мутазно-изомеразным превращением Г-1-Ф дает основание считать, что образование метаболитов ПФП из Г-1-Ф идет преимущественно по неокислительному пути с превращением его во Ф-6-Ф. Ф-6-Ф подвергается одновременной атаке транскетолазой и трансальдолазой, в результате чего из двух молекул Ф-6-Ф образуется ксилулозо-5-фосфат и седогептулозо-7-фосфат.

Проведенные исследования показали, что тимоген повышает иммунную реактивность в крови утят, увеличивает относительную массу тимуса и поджелудочной железы и усиливает клеточный иммунитет в организме, являясь эффективным иммуностимулятором. Тимоген также повышает активность фосфоглюкомутазы и стимулирует превращение Г-1-Ф в тимусе по ПФП, что способствует образованию пентозофосфатов, необходимых для биосинтеза нуклеиновых кислот и белков иммунной системы. Следовательно, тимоген является эффективным иммуностимулятором и может быть использован для повышения иммунной реактивности утят в раннем возрасте.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Кемилева З.* Вилочковая железа. М: Медицина, 1984. С.7 - 21.
2. *Петров Р.В.* Костномозговой стимулятор антителопродукента // Итоги науки и техники. Серия иммунология. ВИНТИ. М., 1983. Т.12. С.63-85.
3. *Иванов А.М., Чухловин Б.А.* Методики определения поглотительной и переваривающейся способности нейтрофилов // Лабораторное дело, №10. С.610-614.

4. **Алексеева О.Г., Волкова А.Г.** Изучение фагоцитарной реакции нейтрофилов крови в токсикологических экспериментах // Гигиена и санитария, 1966, №8. С.70-75.
5. **Жаков М.С., Карлуть И.М.** Окраска мазков и костномозговых пунктатов по методу Браше // Лабораторное дело, 1967, №1. С.52-54.
6. **Kulka R.Q.** Colorimetric estimation of ketopentoses and ketohexoses // Biochem. J. 1956. V.63. № 4, P.-542-548.
7. **Головацкий И.Д.** О взаимосвязи отдельных этапов гликолиза с пентозным циклом // Химия и обмен углеводов. М.: Наука, 1965. С.280-286.
8. **Willams J., Clark M.** On error in metabolism the pentose phosphate cycle // Search. 1971. V.2, № 3. P.80-88.
9. **Hofer M., Brand K., Deckner K., Becker G.** Importance of the pentose phosphate pathway for D-glucose catabolism in the obligatory Aerobic Yeast *Rhodotorula gracilis* // Biochem. j. 1971. 123,5. P.855-863.
10. **Jonhson R.,Krasna A., Rittenberg D.** 18<sub>0</sub> studies on the oxidative and Nonoxidative Penthways in wild type and Mutant *Eacherichia* cells // Biochemistry. 1973. V.12, № 10. P.1969-1977.

#### S U M M A R Y

*The immunostimulative effect of thymogenum in ducklings has been studied in this work. It has been stated that this immunostimulator increases immunoreactivity of blood, the relative weigth of thymus, pancreas, and contributea of development of higher level strengthens the cell - mediated immunity of organism, also being the effective immunostimulator. Thymogenum also increases the activity of phosphoglucomutase, and conversion of Glucose – 1 - phosphate in thymus, that contributes to production of pentosophosphates for biosynthesis of nucleine acidis and immunoglobulines.*