

Голубев Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ТИМОГЕНА НА ТИМУС УТЯТ

Резюме

В статье приводятся экспериментальные исследования, направленные на изучение влияния синтетического препарата «Тимогена». Исследования проведены на 15 утятах, которые были разделены на три группы: одна контрольная и две опытные.

Тимоген при однократном введении в дозе 10 мг/кг стимулирует увеличение коркового вещества по сравнению с контрольной группой на 44,3%, а при двукратном – на 57,7%. Увеличение размеров коркового вещества тимуса утят связано с плотностью тимоцитов в нем. При двукратном введении тимогена отмечалось увеличение количества лейкоцитов на 42 %, тромбоцитов – в 2 раза по сравнению с контролем. Препарат оказывает воздействие на содержание РНК в лимфоцитах, количество которой возросло на 22% по отношению к контролю. Параллельно с этим наблюдалась активизация фагоцитарной активности тромбоцитов крови, так активность фагоцитоза увеличилась на 52%, фагоцитарный индекс – на 74,6%, процент переваривания – на 87,2, и индекс переваривания – в 2,86 раза по сравнению с контрольной группой. В лейкограмме крови происходит увеличение числа эозинофилов, а также рост числа Т-лимфоцитов как при однократном, так и при двукратном введении тимогена по отношению к контрольной группе.

Summary

The paper presents experimental research aimed at studying the influences of synthetic drug thymogen. The research was conducted at 15 ducklings, which were divided into three groups: one control and two experimental.

A single administration of thymogen a dose of 10 mg/kg stimulates an increase of cortical substance by 44,3%, compared to the control group and by 57.7% when administered twice. The increase of the size of cortical substance in the thymus of ducklings is related to the density of thymocytes in it. When administered twice thymogen is mentioned to increase the number of leukocytes by 42%, and to double the number of platelets compared with the control. The drug affects the RNA content in lymphocytes, the number of which increases by 22% compared to the control group. In parallel with it the activation of phagocytic activity of blood platelets was observed, the phagocytosis activity increased by 52%, the phagocytic index increased by 74,6%, the digestion percentage increased by 87,2, and the index of digestion in 2,86 times in comparison with the control group. In the leukogram of blood there is an increase in the number of eosinophils, as well as the increase in the number of T-lymphocytes, at both single and double administration of thymogen compared to the control group.

Поступила в редакцию 14.03.2016 г.

ВВЕДЕНИЕ

Иммунная система представляет собой комплекс специализированных лимфоидных органов, тканей и клеток, способных выполнять защитные функции.

В иммунной системе выделяют центральные и периферические органы. К центральным органам иммунитета относят костный мозг и тимус, к периферическим – лимфоузлы, селезенку, лимфоидную ткань пищеварительного тракта и органов дыхания, кровь, лимфу, систему мононуклеарных фагоцитов, микрофагальную систему, клетки нейтроглии и кожи [2].

Основная задача иммунной системы – обеспечение постоянства внутренней среды организма, то есть иммунного гомеостаза, сохранение его структурно-функциональной целостности, а также защита его биологической индивидуальности от чужеродной информации [3, 5, 12].

Тимус (вилочковая или зубная железа), который рассматривается в работе, представляет собой один из центральных органов иммунитета, контролирует образование и нормальное функционирование иммунной системы организма путем создания разнородной популяции Т-лимфоци-

тов, а также выработкой гуморальных факторов, воздействующих на периферические органы иммунной системы [7].

В корковом веществе тимуса под капсулой дольки располагается подкапсулярный слой больших лимфоцитов, которые обладают наиболее высокой митотической активностью, что способствует процессу обновления малых лимфоцитов. Сформировавшиеся тимусные лимфоциты движутся к мозговому слою, на их пути расположены корковые макрофаги, которые участвуют в разрушении и фагоцитозе мертвых (апоптотных) тимусных лимфоцитов. Прошедшие созревание в вилочковой железе Т-лимфоциты с током крови мигрируют в тимусзависимые зоны периферических органов иммунной системы [14].

В мозговом слое содержатся лимфоциты средних размеров, которые составляют 3–5% общего числа всех тимусных лимфоцитов. Существует предположение, что эти клетки не покидают тимус, а, оставаясь в нем, участвуют в регуляторных процессах. В мозговой зоне тимуса расположены тельца Гассалья – скопления уплощенных, продолговатых эпителиальных клеток. Функциональное значение их малоизвестно. Основой для образования телец Гассалья служат гипотрофичные эпителиальные клетки. В тельцах Гассалья имеются уплотненные участки, которые могут обызвествляться, в них можно обнаружить вакуоли и внутрицитоплазматические узелки, заполненные аморфным веществом. Характерно, что число телец Гассалья возрастает с возрастом животного [13].

Тимус является одним из первых лимфоидных органов в организме. На ранней стадии развития стволовые клетки костного мозга, переселяясь в вилочковую железу, делают её основным продуцентом лимфоцитов (timoцитов), которые поступают в лимфоидные органы животного на протяжении всей жизни. Следовательно, тимус является продуцентом и регулятором лимфоидных клеток, которые состав-

ляют основу иммунной системы. Он обладает регуляторной функцией иммунных механизмов, является частью эндокринной системы и участвует в регуляции ряда других процессов [4, 10].

Тимус контролирует формирование иммунной системы. В нём образуется разнородная популяция Т-лимфоцитов, имеющих важное значение в развитии как клеточного, так и гуморального иммунитета. Регулирующая функция тимуса связана с выработкой гуморальных факторов, воздействующих на лимфоциты в периферических органах иммунной системы, а тимусные экстракты устраняют отдельные формы иммунодефицитов [11]. Известно, что нервная и эндокринная системы модулируют функции иммунной системы с помощью нейротрансмиттеров, нейропептидов и гормонов, а иммунная система взаимодействует с нейроэндокринной системой с помощью цитокинов, иммунопептидов и других иммуотрансмиттеров. В настоящее время установлена роль эндогенных пептидов в формировании компенсаторно-приспособительных реакций организма в ответ на стресс и нарушения гомеостаза. Система пептидов рассматривается в качестве универсальной при нейроиммуоэндокринных взаимодействиях [12].

Из тимуса был выделен ряд иммунологически активных веществ. Пептидные гормоны (тимозины, тималин, тимарин, и тимостимулин и др.), продуцируемые эпителиальными клетками тимуса, оказывают влияние на состояние Т- и В-систем иммунитета, участвуют в дифференцировке тимоцитов, обеспечивая их нормальное созревание и функционирование. Тимозины обладают широким спектром активности, способствуют увеличению уровня циклоаденозинмонофосфата (сАМР) в клетках, усиливают способность стволовых клеток костного мозга мигрировать в тимус, стимулируют секрецию гипофизом адренокортикотропного гормона, эндорфина, пролактина и других гормонов, а также противоопухолевый и трансплантационный иммунитет. Тимопоэтин и тималин стимули-

руют пролиферацию костномозговых клеток. На основе изученных гормонов тимуса получены иммуностимулирующие препараты (тималин, Т-активин), а также синтезированы их аналоги [9].

Среди целого ряда иммуностимулирующих средств особый интерес представляют препараты тимуса (натуральные и синтетические), оказывающие выраженное стимулирующее действие на иммунную систему. Дипептид L-глутамил-L-триптофан (timoген) известен с середины 60-х годов прошлого века и был выделен из тималина (рисунок 1). При введении ти-

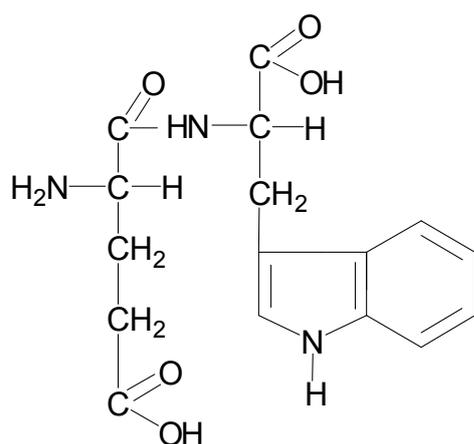


Рисунок 1 – Химическая структура тимогена (L-глутамил-L-триптофан)

Целью наших исследований являлось изучение иммуностимулирующего действия тимогена на иммуноморфологические показатели в тимусе и морфологию крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения эксперимента были отобраны 15 утят суточного возраста в связи с четко выраженным у них строением тимуса и его достаточной массой для исследования. Были сформированы три группы по 5 птиц в каждой: контрольной (№ 1) и двумя опытными (№ 2 и № 3). Для кормления птицы использовали спецкомбикорма, сбалансированные по основным питательным веществам, витаминам, микро- и макроэлементам, соответствующие требованиям, предъявляемым к комбикормам для молодняка птицы указанных возрастов. Для проведения опытов был использован синтетический препарат «Тимо-

могена в дозе, в 1000 раз превышающей терапевтическую, он не накапливается в организме животных, не вызывает токсических реакций, распадаясь на естественные метаболиты – аминокислоты. Препарат не обладает побочным действием и не имеет противопоказаний к применению [8]. В связи с вышеизложенным значительный интерес как с теоретической, так и с прикладной точек зрения представляет выяснение влияния тимогена на морфометрические показатели тимуса и морфологию крови.

ген» (L-глутамил-L-триптофан) в форме натриевой соли, выпускаемый в виде порошка медико-биологическим научно-производственным комплексом «Цитомед» (Россия).

Утятам второй группы внутримышечно в суточном возрасте вводили однократно тимоген на изотоническом растворе хлорида натрия в дозе 10 мг/кг, а утятам третьей группы вводили внутримышечно двукратно тимоген в суточном и 7-дневном возрастах в тех же дозах. Утятам контрольной группы вводили изотонический раствор хлорида натрия.

В суточном возрасте и непосредственно перед исследованиями было проведено взвешивание утят. В 14-тидневном возрасте все утята были подвергнуты исследованиям. У утят для иммуноморфологического исследования были взяты кровь и тимус. Тимус для иммуноморфологических исследований фиксировали в жидко-

сти Карнуа, затем подвергали уплотнению путем заливки в парафин. Изготавливали гистологические срезы толщиной 3–5 мкм на санном МС-2 микротоме и окрашивали гематоксилин-эозином. Абсолютные изменения структурных компонентов осуществляли при помощи светового микроскопа «Olympus» модели ВХ-41 с цифровой фотокамерой системы «Altra20» с использованием программы «Cell^A», а также проводили фотографирование цветных изображений (разрешением 1400 на 900 пикселей) с последующим анализом цветных изображений. В гистосрезах изучали соотношение размеров коркового и мозгового вещества, определяли их коэффициент. Количество тимоцитов, приходящихся на условную единицу площади сетки Автандилова, подсчитывали при 50-кратном ее наложении на корковую зону долек тимуса (объектив 40, окуляр 10, бинокуляр 1, 5).

В крови определяли содержание гемоглобина и эритроцитов фотозлектроколориметрически, подсчитывали количество лейкоцитов и тромбоцитов. Мазки крови готовили на тонких обезжиренных предметных стёклах, высушивали на воздухе и фиксировали в течение 5–10 минут в метиловом спирте. Для морфологического исследования мазки окрашивали азур-эозином по методу Романовского-Гимза. Лейкограмма выводилась на основе под-

счёта 100 клеток. Определяли фагоцитарную активность тромбоцитов и завершённый фагоцитоз [1]. Т- и В-лимфоциты в периферической крови определяли по величине и характеру ядра и цитоплазмы [6, 15]. Содержание РНК в лимфоцитах выявляли по методу Браше в модификации [6]. Относительное количество РНК (СЦК) средний цитохимический коэффициент, оценивали по трехбалльной системе. Статистическую обработку данных проводили компьютерной программой Microsoft Excel. Результаты представляли в виде $M \pm m$ и сравнивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия цифровых показателей считали статистически значимыми при $p > 0,05$. Экспериментальная часть работы выполнена в лаборатории кафедры патологической анатомии и гистологии УО «ВГАВМ».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Абсолютная и относительная масса тимуса при однократном введении тимогена в дозе 10 мг/кг живого веса существенных изменений не претерпела, при двукратном введении тимогена в опытной группе по сравнению с показателями контрольной группы абсолютная масса увеличилась на 15 % ($P < 0,05$). Относительная масса (масса тимуса/масса тела) при двукратном введении тимогена увеличилась на 12,9 % ($P < 0,01$) (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние тимогена на развитие тимуса утят ($n=15$)

Группы	Однократное введение		Двукратное введение	
	абсолютная масса (мг)	относительная масса	абсолютная масса (мг)	относительная масса
контрольная	967,25±138,55	0,33±0,03	883,00±37,23	0,31±0,01
опытная	972,57±53,89	0,34±0,07	1015,57±39,21	0,35±0,01
% к контролю	100,5	103,0	115,0	112,9
P	>0,5	>0,5	<0,5	<0,01

Однократное введение тимогена вызвало увеличение размеров коркового вещества по сравнению к контрольной группе на 44,3 % ($P < 0,05$). При двукратном введении тимогена произошло более интенсивное увеличение коркового вещества тимуса по сравнению к данному показате-

лю в контрольной группе на 57,7 % ($P < 0,05$). В то же время наблюдается уменьшение размеров мозгового вещества при однократном введении на 33,2% ($P < 0,001$), а при двукратном введении – на 54,4% ($P < 0,001$) (таблица 2).

Таблица 2 – Морфометрические (линейные) показатели коркового и мозгового вещества тимуса при введении тимогена (мкм) (n=15)

Группы	Показатели	Корковое вещество, (К)	Мозговое вещество, (М)	Коэффициент К/М
контроль	M±m	230,56±30,7	290,77±20,5	3,89±0,22
однократное введение тимогена	M±m	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	M ± m	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

Увеличение размеров коркового вещества доли тимуса связано прежде всего с пролиферацией тимоцитов в данной зоне.

Сравнивая экспериментальные данные опытных групп с однократным и двукратным введением препарата, можно отметить, что при двукратном введении тимогена продолжалось более интенсивное увеличение размеров коркового вещества в долях тимуса. Сокращение размеров мозгового вещества, предположительно связано с миграционными процессами Т-лимфоцитов из него в кровеносное русло.

Существенных различий в количестве гемоглобина и эритроцитов в крови выявлено не было. В опытных группах обнаружены выраженные количественные из-

менения в содержании лейкоцитов, тромбоцитов и количества РНК в лимфоцитах по сравнению с этими показателями в контрольной группе. Так, при двукратном введении тимогена количество лейкоцитов возросло на 42,3% (P<0,001). Количество тромбоцитов при однократном введении тимогена увеличилось на 80,6% (P<0,001), а при двукратном введении тимогена – на 108,7% по сравнению с контрольной группой (таблица 3). Это связано прежде всего с тем, что тромбоциты у птиц выполняют фагоцитарную функцию. При двукратном введении тимогена в опытной группе возросло количество РНК в лимфоцитах по сравнению с контрольной группой на 22,3% (P<0,001).

Таблица 3 – Морфологический состав крови утят (n=15)

Группы птиц	Hb (г/л)	Эритроциты, 10 ¹² /л	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	Тромбоциты, 10 ⁹ /л	РНК лимфоцитов (СЦК)
контроль, M±m (1)	112,50±2,60	2,08±0,07	22,20±0,86	47,00±2,38	1,12±0,02
однократное введение, M±m (2)	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 (2–1)	>0,05	>0,05	>0,05	<0,001	>0,05
двукратное введение, M±m (3)	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 (3–1)	>0,05	>0,05	<0,001	<0,001	<0,001

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 тромбо-

цитов практически по всем показателям. Так, показатель фагоцитоза увеличивается на 52%, фагоцитарный индекс – на 74,6 %, переваривание – на 87,2 %, а индекс переваривания увеличивается в 2,86 раза по сравнению с показателями контрольной группы (таблица 4).

Таблица 4 – Фагоцитарная активность тромбоцитов крови утят (n=15)

Группы птиц	Показатели	Процент фагоцитоза	Фагоцитарный индекс	Фагоцитарное число	Процент переваривания	Индекс переваривания
контроль	M±m	40,00±3,03	0,71±0,10	1,78±0,16	18,10±4,16	0,15±0,04
однократное введение	M±m	44,80±4,80	0,94±0,11	2,01±0,17	25,30±8,90	0,25±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
	P 2–1	>0,05	>0,1	>0,2	>0,05	>0,2
двукратное введение	M±m	60,80±3,90	1,24±0,10	2,04±0,11	33,90±6,80	0,43±0,09
	% к контролю	152,0	174,6	114,6	187,2	286,6
	P 3–1	<0,001	<0,01	>0,05	<0,001	<0,05

В крови птиц всех опытных групп в период опыта произошло повышение числа эозинофилов в 1,6 раза при однократном введении тимогена и на 56,8% при двукратном его введении по отношению к контролю. Введение тимогена стимулирует рост числа Т-лимфоцитов в крови при однократном введении на 34,6%, при двукратном введении количество Т-лимфоцитов увеличивается не так интенсивно, что связано с сокращением их поступле-

ния в кровь и Т-зависимых зон центральных и периферических органов иммунитета. В те же сроки отмечается снижение количества Т-лимфоцитов на 20,5% при однократном введении, а при двукратном – на 27,3% (таблица 5). Отмеченное снижение В-лимфоцитов скорее всего связано не с угнетением их образования, а с относительным уменьшением их количества на фоне роста Т-лимфоцитов.

Таблица 5 – Лейкограмма крови (n=15)

Группы птиц	Показатели	Эозинофилы	Псевдоэозинофилы			Лимфоциты		Моноциты
			юные	палочко-ядерные	сегментоядерные	Т	В	
контроль (1)	M±m, ед	12,5±0,6	3,0±1,2	17,0±4,7	14,5±4,6	28,5±0,8	19,5±1,8	2,2±1,2
однократное введение (2)	M±m	20,2±0,6	4,0±0,5	12,2±2,1	10,2±2,2	38,8±0,7	4,1± 2,2	1,75±0,6
	% к контролю P 2–1	160,0 <0,001	133,3 >0,05	71,7 >0,05	70,3 >0,05	134,6 <0,001	56,9 <0,05	79,5 >0,05
двухкратное введение (3)	M±m	19,6±0,8	4,3±0,6	13,3±1,08	17,0±2,1	31,0±0,6	10,3±2,4	1,6± 0,4
	% к контролю P 3–1	156,8 <0,01	143,3 >0,05	78,2 >0,05	117,2 >0,05	108,7 <0,05	52,8 <0,01	72,7 >0,05

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Под влиянием тимогена отмечается увеличение массы тимуса по отношению к массе тела, при этом наблюдается увеличение размеров коркового вещества в рамках долики тимуса за счет пролиферации в ней тимоцитов.

В крови опытных групп утят под влиянием тимогена обнаружены изменения в сторону роста количества лейкоцитов, тромбоцитов и РНК в лимфоцитах. При введении тимогена обнаружено увеличение фагоцитарной активности тром-

боцитов, причем в группе с двукратным введением тимогена результаты оказались более выраженными.

В лейкограмме крови утят, которым вводили тимоген в период опыта, отмечено повышение количества эозинофилов и Т-лимфоцитов. Увеличение количества эозинофилов обусловлено ответной реакцией организма на введение иммуностимулятора. Повышение же количества Т-лимфоцитов свидетельствует об интенсивной миграции лимфоцитов из тимуса в кровь.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Алексеева, О.Г. Изучение фагоцитарной активности нейтрофилов крови в токсикологических экспериментах/ О.Г. Алексеева, А.Г. Волкова // Гигиена и санитария. – 1966. – № 8. – С.70–75.
- 2 Болотников, И.А. Иммунология. Иммунитет. Иммунологические реакции. / И.А. Болотников, Н.А. Добротина, С.Н. Лызлова // Петрозаводск. – 1989. – 94 с.
- 3 Голубев, Д.С. Влияние тимогена на иммуноморфологические и биохимические показатели в тимусе утят/ Д.С. Голубев, М. С. Жаков [и др.] // Ученые записки, Т.34. – ВГАВМ, Витебск. – 1998 г. – С.129–131.
- 4 Досаев, Т.М. Анатомия и эмбриогенез органов иммунной системы // Алматы, 2000. – 130 с.
- 5 Жаков, М.С. Иммуноморфология и иммунопатология / М.С. Жаков, В.С. Прудников // Метод. указания. – ВВИ. – Витебск, 1992. – 37 с.
- 6 Жаков, М.С. Окраска мазков и костномозговых пунктатов по методу Браше / М.С. Жаков, И.М. Карпуть // Лабораторное дело. – 1967. – №1. – С.52–54.
- 7 Кемилева, З. Вилочковая железа. – М: Медицина, 1984. – С.7–21.
- 8 Клиническая фармакология тимогена / Ред. В.С. Смирнов. – СПб.; – 2003. – 106 с.
- 9 Куликов, С.В. Способ получения L-глутамил-L-триптофана и его солей / С.В. Куликов, В.С. Смирнов, И.А. Стукань // Патент РФ № 2120446. 2000.
- 10 Морозов, В.Г. Пептидные тимомиметики / В.Г. Морозов, В.Х. Хавинсон, В.В. Калинин // СПб: Наука, 2000. – 158 с.
- 11 Никольский, И.С. Гормоны и другие биологически активные факторы тимуса/ И.С. Никольский, Ю.А. Гриневич // Иммунобиология гормонов тимуса: Под ред. Ю.А. Гриневича и В.Ф. Чеботарева. Киев: Здоровья, 1989. – С. 7–28.
- 12 Решетников, И.С., Тимус центральный орган иммунной системы/ И.С. Решетников, Н.А. Стручков, Г.А. Осогосток // Наука, техника и образование. 2014. – №4 (4). – С.120–121.
- 13 Шарова, Н.И. Результаты взаимодействия лимфоидных и эпителиальных клеток тимуса человека *in vitro*. Активация и апоптоз / Н.И. Шарова, А.Х. Дзуцев М.М. Литвинова [и др.] // Иммунология. – 2000. – № 3. – С. 7–11.
- 14 Ярилин, А.А., Т-клетки — недавние эмигранты из тимуса/ А.А. Ярилин, А. Д. Донецкова // Иммунология. – 2012. – № 6. – С.326–334.
- 15 Vujanovic, N. Premiere demonstration de differences morphologiques entre des lymphocytes appartenant a des population cellulaires thymo-dependantes et thymo-independantes // Acad. Sci. – 1972. – № 17. – P.1933–1936.