

Влияние метаболитов *Trichoderma asperellum* на регенерацию тканей на фоне пирена

Р.И. Тухбатова, А.А. Абдельрахман, А.С. Мухаметзянова, Т.Т. Нгуен, Т.Л. Хоанг, А.Н. Фаттахова, Ф.К. Алимова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Influence of *Trichoderma asperellum* metabolites on tissue regeneration against pyrene

R.I. Tukhbatova, A.A. Abd El-Rahman, A.S. Mukhametzhanova, T.T. Nguen, T.L. Hoang, A.N. Fattahova, F.K. Alimova
Kazan (Volga region) Federal University, Kazan

В работе проведено изучение влияния культуральной жидкости грибов рода *Trichoderma* на мышей линии Swiss Webster CFW после воздействия пирена – полициклического ароматического углеводорода, способного вызывать патологические изменения в организме. Показано благоприятное влияние метаболитов *Trichoderma* на гематологические показатели, функционирование печени и почек, выявлена тенденция к восстановлению структуры кожи и печени после нарушений, вызванных введением пирена.

Ключевые слова: *Trichoderma*, пирен, регенерация тканей.

В настоящее время существует потребность в новых биологически активных веществах, которые способны обеспечивать восстановление клеток и тканей, подвергшихся воздействию вредных факторов окружающей среды [1]. Данная проблема особенно актуальна в экологически опасных районах страны, где в окружающую среду поступает большое количество загрязнителей.

Одним из таких токсичных загрязнителей, по данным National Oceanic and Atmospheric Administration USA (NOAA), является пирен [2]. Он образуется в результате различных процессов горения. Попадая в организм из окружающей среды, пирен способен накапливаться в почках и печени. Ранее проведенные исследования показали, что пирен может вызывать нефропатию, изменения в крови, а также отрицательно влиять на воспроизводство животных.

Несмотря на то, что за счет работ различных авторов накоплено большое количество данных по разным аспектам жизнедеятельности и функционирования грибов *Trichoderma*, являющихся продуцентами метаболитов широкого спектра действия, вопрос об их использовании в качестве медицинских агентов остается открытым. Исследования в этой области ведутся достаточно активно; постоянно обнаруживаются новые метаболиты с полезными свойствами, тем не менее их влияние на регенерацию тканей остается недостаточно изученным [3].

Материал и методы

Объектами исследования послужили самки аутбредных мышей линии Swiss Webster CFW, которые были получены нами из питомника лабораторных животных «Пушино». Окраска шерсти – белая. Животные содержались согласно международным этическим нормам, получали воду и корм ad libitum.

We studied the influence of the culture fluid of fungi of the genus *Trichoderma* on Swiss Webster CFW mice after exposure to pyrene – polycyclic aromatic hydrocarbons, which can cause pathological changes in the body. Beneficial effect of *Trichoderma* metabolites on haematological parameters, the functioning of liver and nephros was shown, the trend toward regeneration of the structure of skin and liver after the damages, caused by the introduction of pyrene, was identified.

Key words: *Trichoderma*, pyrene, tissue regeneration.

Исследуемые штаммы *Trichoderma asperellum* выращивали на жидкой среде Чапека в течение 7 сут. при 28°C на качалке со скоростью 128 об./мин. Методы, использовавшиеся в работе, обеспечивали полное отсутствие пропагул гриба – культуральную жидкость освобождали от мицелия фильтрацией (фильтры Millipore диаметром 0,22 мкм).

Влияние метаболитов *Trichoderma* на организм мышей изучали на фоне введения пирена по комплексу гематологических, гистологических, иммунологических и биохимических показателей. Макрогруппа из 25 мышей по принципу аналогов была разделена на 5 групп, которым вводили кондиционированную среду *Trichoderma* (1,25 мл/100 г живой массы) и пирен (5 мг/100 г живой массы). В контрольной группе мышам внутривенно в течение 14 сут. через каждые 24 ч вводили воду для инъекций. Мышам второй экспериментальной группы вначале вводили в течение 7 сут. через каждые 24 ч кондиционированную среду *Trichoderma*, затем в течение 7 сут. через каждые 24 ч – пирен. Третьей экспериментальной группе – в течение 7 сут. через каждые 24 ч вводили пирен, затем в течение следующих 7 сут. – кондиционированную среду гриба. Четвертая группа мышей была подвергнута действию пирена в течение 14 сут. Пятой группе животных инъекцировали только кондиционированную среду *Trichoderma* в течение 14 сут. До принятия пищи ежедневным взвешиванием в течение 14 сут. определяли массу мышей. После окончания эксперимента у мышей путем взвешивания определяли массу отдельных органов (печени, почек и др.), после чего вычисляли отношение массы органов к общей массе тела.

Гематологические показатели включали определение количества эритроцитов, уровня гемоглобина, гематокрита, среднего объема эритроцитов (MCV),

среднего содержания гемоглобина в эритроцитах (МСН) и средней концентрации гемоглобина в эритроцитах (МСНС).

Подсчёт эритроцитов осуществляли с помощью камеры Горяева в физиологическом растворе (0,9% NaCl) [4]. Уровень гемоглобина определяли в соответствии с рекомендациями Международного Комитета Стандартизации в Гематологии [5], используя коммерческий набор Randox Company (Великобритания). Гематокрит определяли центрифугированием клеток в гепаринизированных гематокритных пробирках в течение 5 мин при 15,000 rpm [4].

Иммунологические показатели оценивали путем подсчета лейкоцитов с помощью камеры Горяева, согласно рекомендациям Dacie и Lewis [4], используя специальный раствор Тюрка, а также дифференцировали лейкоциты и определяли их количество.

Оценка биохимических показателей включала в себя тесты на функционирование печени (активность трансаминаз и количество общего билирубина) и почек (содержание мочевины и креатинина). Активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) в сыворотке крови мышей определяли согласно методике Reitman и Frankel [6]. Сыворотка крови была получена на 14 день эксперимента. Для определения активности ферментов использовали коммерческий набор BioMerieux Chemical Company (Франция). Калибровочная кривая была построена по аланину. Активность сывороточной АсАТ измеряли аналогично аланинаминотрансферазе (АлАТ), используя коммерческий набор Randox Company (Великобритания). Концентрацию общего билирубина определяли, используя коммерческий набор BioMerieux Chemical Company (Франция). Количество общего билирубина определяли в реакции конъюгации с диазотированной сульфаниловой кислотой в присутствии кофеина [7]. Концентрацию мочевины определяли по реакции с мочевиноглутаматдегидрогеназой по методике Eisenweiner [8]. Содержание общего креатинина измеряли в реакции с пикриновой кислотой в щелочной среде с образованием окрашенного комплекса, поглощающего при длине 510 нм [9, 10].

На 15-е сутки животные выводились из эксперимента, после чего образцы кожи и внутренних органов (печень, почки) забирались для гистологического анализа. Гистологические препараты изготавливали по стандартной схеме [11], окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали при помощи световой микроскопии.

Статистическую обработку результатов осуществляли общепринятыми методами с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel. Результаты представлены как средние арифметические со стандартным отклонением. Достоверность результатов определяли с использованием t-критерия Стьюдента (уровень $p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Как средство оценки статуса здоровья животных, ВОЗ рекомендовано исследование гематологических параметров, отражающих состояние гомеостаза организма. Нами было выявлено, что введение пирена способствует достоверному уменьшению количества эритроцитов в крови мышей экспериментальных групп, по сравнению с контролем (рис. 1), что вероятно свидетельствует о разрушении эритроцитов.

Введение кондиционированной среды *Trichoderma* после пирена нивелировало действие последнего.

Гематокрит и содержание гемоглобина являются важными показателями гематологического статуса организма. На рис. 2 показано, что под влиянием пирена уровень гемоглобина у мышей достоверно увеличивался относительно контроля. У мышей, получавших только кондиционированную среду *Trichoderma*, уровень гемоглобина оставался на уровне контроля. Введение кондиционированной среды *Trichoderma* до введения пирена снижало его негативное влияние на уровень гемоглобина. Значения гематокрита у мышей всех опытных групп были ниже контрольных значений (рис. 3).

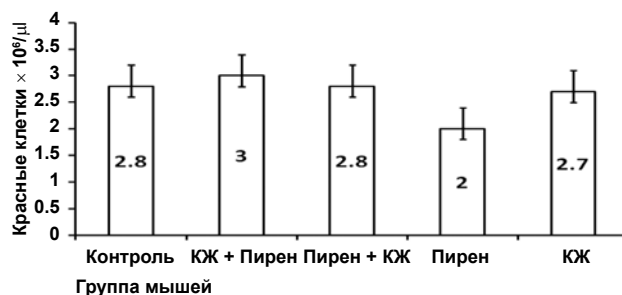


Рис. 1. Влияние пирена и культуральной жидкости *Trichoderma* на количество эритроцитов в крови мышей

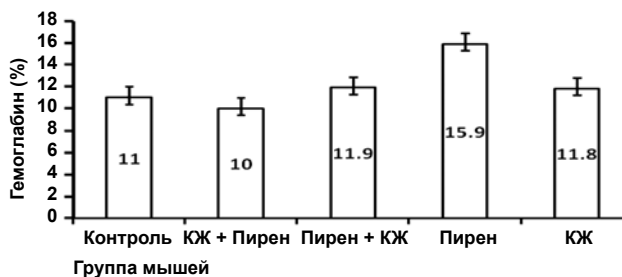


Рис. 2. Влияние пирена и культуральной жидкости *Trichoderma* на содержание гемоглобина в крови мышей

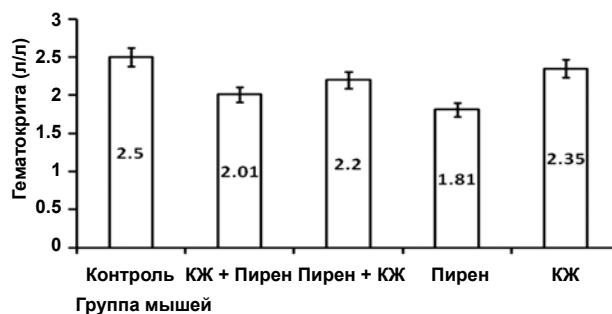


Рис. 3. Влияние пирена и культуральной жидкости *Trichoderma* на гематокрит (л/л) в крови мышей (КЖ – культуральная жидкость)

Было изучено действие пирена и метаболитов в КЖ *Trichoderma* на основные показатели функционирования печени, а именно: активность АсАТ (рис. 4А) и АлАТ (рис. 4Б), а также концентрацию билирубина (рис. 4В) в сыворотке крови. Отмечено, что введение мышам кондиционированной среды *Trichoderma*

в течении 14 сут. не приводит к достоверным изменениям по этим показателям по сравнению с контрольными животными. Введение пирена вызывает достоверное увеличение в сыворотке крови активности АсАТ и АлАТ, а также концентрации билирубина, что может свидетельствовать о токсическом действии на печень. Следует отметить, что применение кондиционированной среды *Trichoderma* до пирена оказывает более благоприятное действие на морфофункциональное состояние печени по сравнению с вариантом введения мышам метаболитов *Trichoderma* после введения пирена. Это может указывать на то, что метаболиты *Trichoderma*, содержащиеся в кондиционированной среде, обладают гепатопротекторными свойствами.

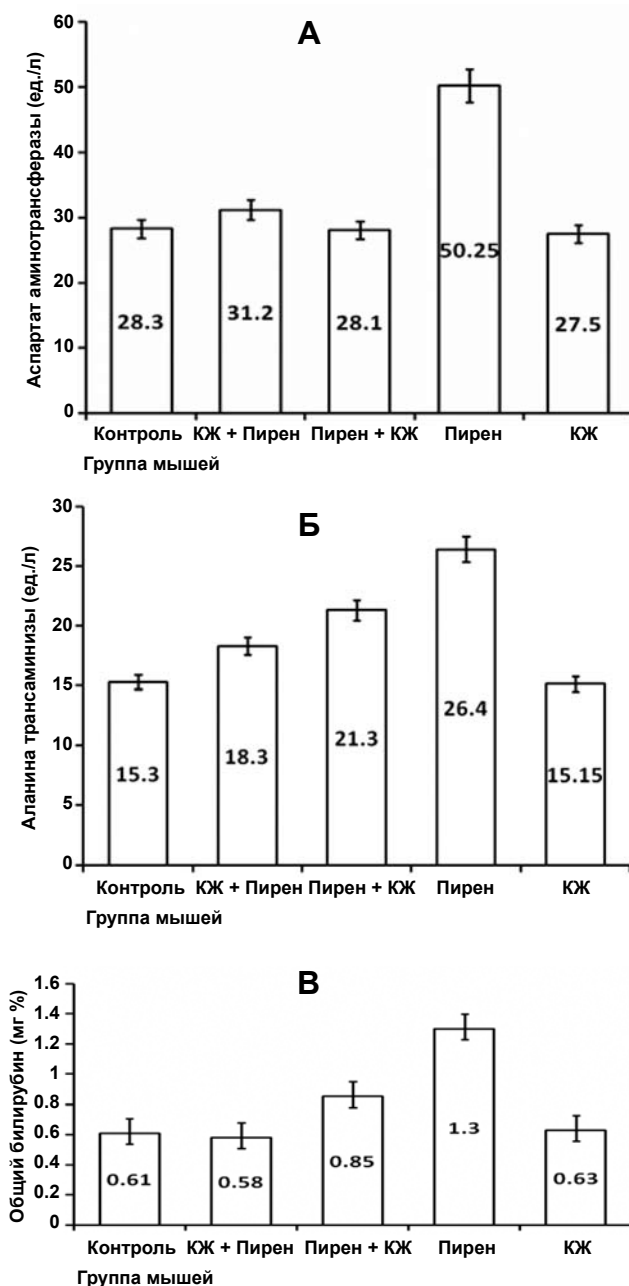


Рис. 4. Влияние пирена и культуральной жидкости *Trichoderma* на содержание аспаратаминотрансферазы (А), аланинтрансаминазы (Б) и общего билирубина (В) в сыворотке крови мышей

Уровень креатинина в сыворотке крови и мочевины помогают оценить функционирование почек [12]. На рис. 5 представлено влияние пирена и кондиционированной среды *Trichoderma* на концентрацию мочевины и креатинина в сыворотке крови. При обработке мышей пиреном отмечено достоверное увеличение концентрации мочевины, что может служить подтверждением почечной недостаточности. После введения мышам кондиционированной среды происходила нормализация функции почек. Введение пирена и метаболитов *Trichoderma* не оказывало достоверного влияния на уровень креатинина в сыворотке крови.

В доступной нам научной литературе имеется мало данных относительно иммунных механизмов, запускаемых биологическими агентами после взаимодействия их с компонентами врождённого и адаптивного иммунных ответов. Так, введение пирена по сравнению с контролем достоверно увеличивало в организме мышей содержание лейкоцитов с одновременным изменением лейкоцитарной формулы: возрастала доля лимфоцитов, базофилов, эозинофилов и уменьшалась – нейтрофилов (рис. 6).

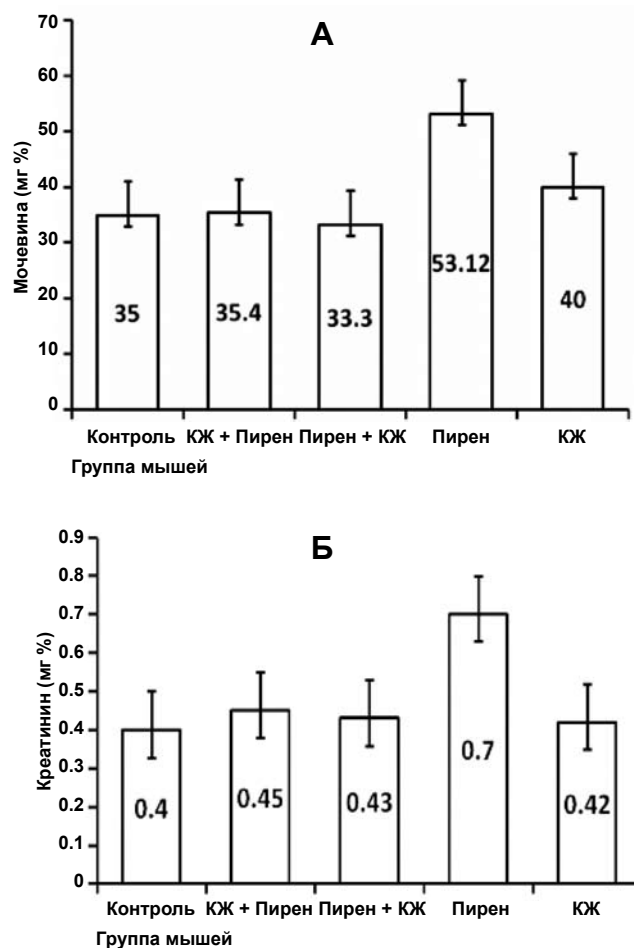


Рис. 5. Влияние пирена и культуральной жидкости *Trichoderma* на содержание мочевины (А) и креатинина (Б) в сыворотке крови мышей

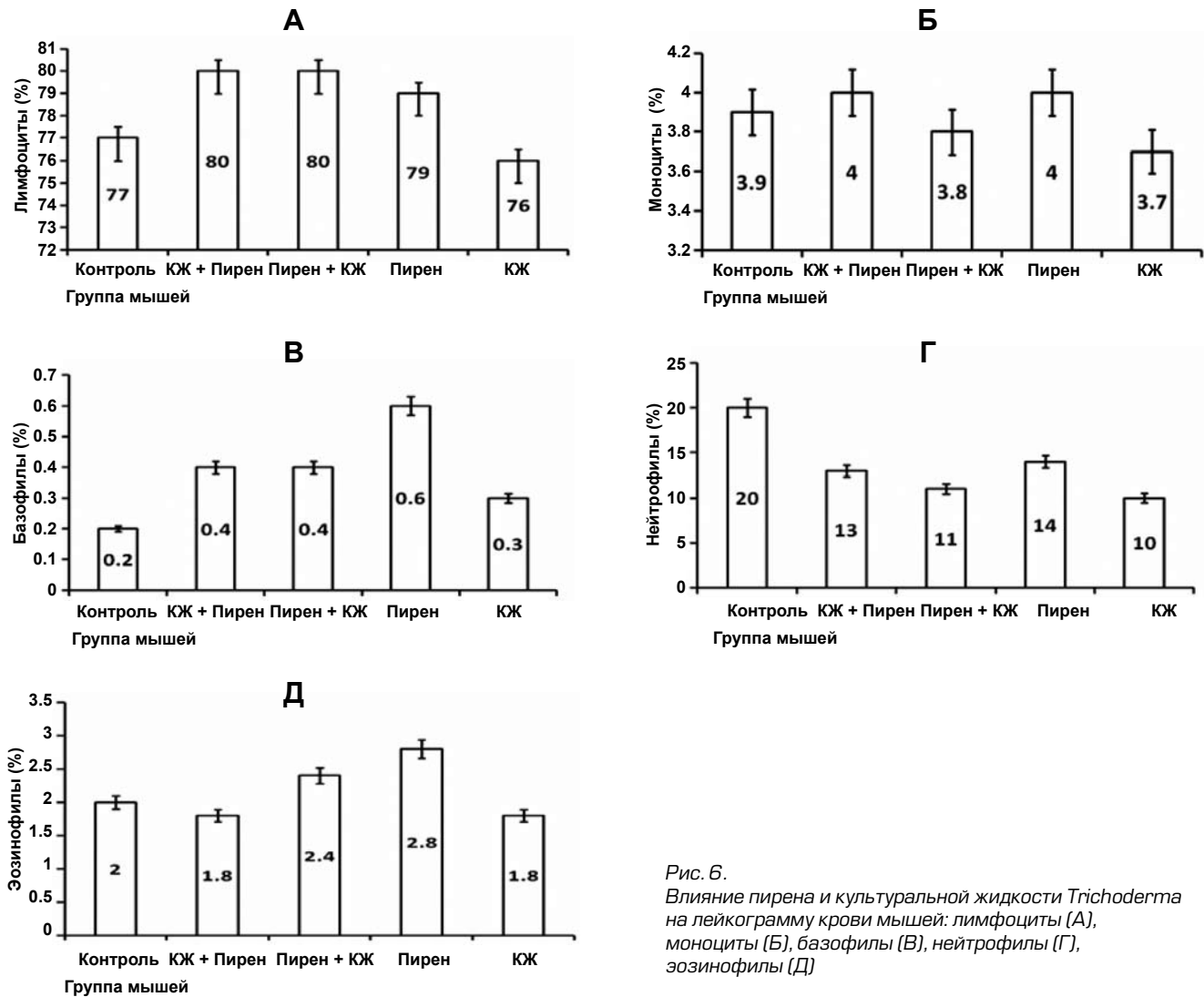


Рис. 6. Влияние пирена и культуральной жидкости *Trichoderma* на лейкограмму крови мышей: лимфоциты (А), моноциты (Б), базофилы (В), нейтрофилы (Г), эозинофилы (Д)

Безусловно, исследованных показателей недостаточно для объективной оценки воздействия пирена на иммунную систему, однако сделать вывод о наличии такого влияния они позволяют. После введения кондиционированной среды *Trichoderma* численность моноцитов и нейтрофилов в крови снижалась до уровня контрольных значений, т.е. действие пирена на организм было нивелировано.

На следующем этапе мы проводили гистологический анализ структуры кожи в области инъекций пирена, а также исследовали печень мышей. Под воздействием пирена толщина эпидермиса, по сравнению с контролем, уменьшалась примерно в 3 раза. Количество волосяных фолликулов на условную единицу площади среза также было значительно ниже (рис. 7А). У мышей, получавших кондиционированную среду *Trichoderma* до или после введения пирена, наблюдалось увеличение толщины эпидермиса, а также количества волосяных фолликулов (рис. 7Б), что может свидетельствовать о том, что происходит восстановление структуры эпидермиса кожи.

Через 7 сут. после введения пирена балочное строение долек печени было слабо выражено, на препаратах обнаруживались дольки в состоянии деструкции. Гепатоциты отличались небольшими размерами. Большая часть цитоплазмы была светло окрашена. Ядра в клетках мелкие, располагались

эксцентрично, в них выявлялись мелкие ядрышки. Среди клеточных элементов долек отмечалось небольшое содержание двухъядерных гепатоцитов (22,2%). Клетки Купфера были малочисленны и имели мелкие ядра. Также в сосудистой системе печени были выявлены признаки застойной венозной гиперемии, которая характеризуется переполнением центральных вен, а также расширением и полнокровием синусоидальных капилляров преимущественно вокруг центральных вен (рис. 8А).

В печени мышей, получавших кондиционированную среду *Trichoderma*, отмечалось сохранение балочного строения. Гепатоциты, формирующие печеночные балки, различались по объему и форме, многие из них имели более интенсивно окрашенную цитоплазму, чем у контрольных мышей. Гепатоциты имели средние размеры и ядро овальной формы с умеренным количеством хроматина, с одним, реже двумя мелкими ядрышками вблизи кариолеммы. Большинство гепатоцитов – двухъядерные метатические активированные клетки (30,22%) (рис. 8Б). Также было отмечено увеличение размеров клеток Купфера и их численности. Заметно ослабевали признаки расстройства кровообращения в виде застойного полнокровия центральных вен и отека перисинусоидального пространства в дольках печени.

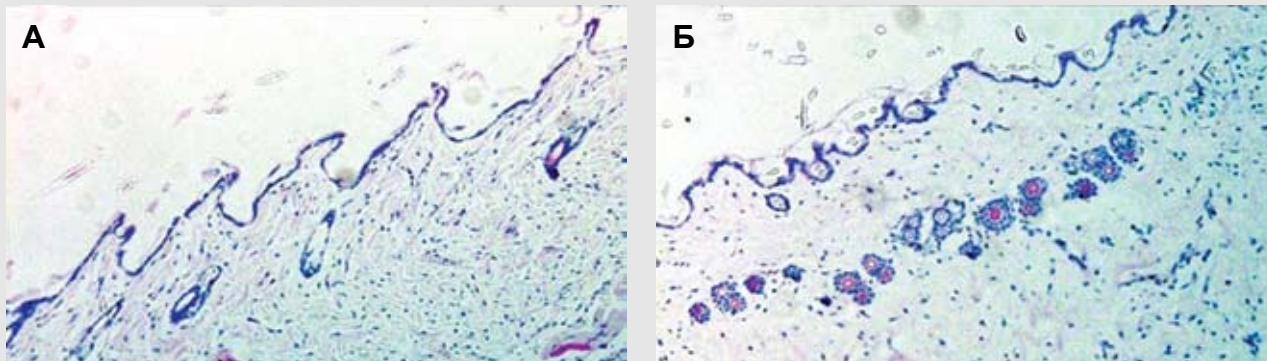


Рис. 7. Кожа мышей. Влияние пирена (А) и культуральной жидкости *Trichoderma* (Б) на структуру кожи мышей. Окраска: гематоксилин, эозин. Ув.: $\times 200$

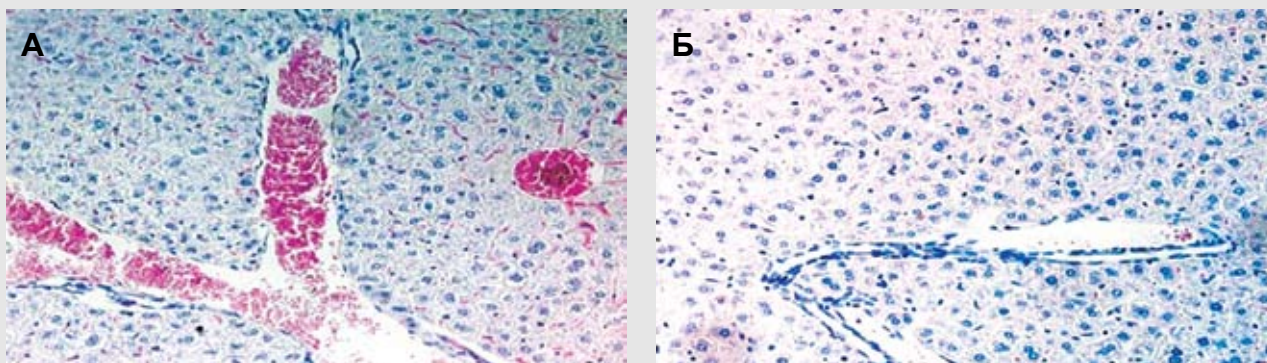


Рис. 8. Печень мышей. Влияние пирена (А) и культуральной жидкости *Trichoderma* (Б) на гистопатологию печени мышей. Окраска: гематоксилин, эозин. Ув.: $\times 200$

Таким образом, введение кондиционированной среды *Trichoderma* мышам до или после воздействия на организм пирена по ряду исследованных нами показателей способствует усилению защитных функций организма, нормализации морфофункционального состояния печени и почек, снижению выраженности патологических изменений в различных тканях организма.

Благодарности

Работа выполнена в научно-образовательном центре «Биохимия» Казанского (Приволжского) федерального университета в рамках проекта «Биохимические, молекулярно-генетические и биоинформационные аспекты взаимодействия нано- и биопрепаратов с живыми организмами», согласно тематическому плану КФУ.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Источники получения лекарственных веществ [editorial], <http://bibliofond.ru/view.aspx?id=458121>.
2. Сайт National Oceanic and Atmospheric Administration USA (NOAA) [editorial], <http://www.noaa.gov/>.
3. Шариков А.М. Изучение антибиотической активности метаболитов грибов рода *Trichoderma* в отношении бактерий рода *Vibrio*. Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук 2010; 10: 27–9.
4. Dacie S.J., Lewis S.M. Practical Haematology. 7th ed. London: Churchill Livingstone; 1991. p. 532.
5. ISCH International Committee for Standardization in Hematology [editorial]. Brit. J. Haemat. 1967; 13: 71–5.
6. Reitman S., Frankel S. Colourimetric of serum transaminases. Am. J. Clin. Pathol. 1957; 28: 56–62.
7. Tietz N.M. Textbook of clinical chemistry. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1983.
8. Eisenweine H.G. Kinetische bestimmung des harnstoffes mit dem LKB-system. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1976; 14: 261–264.
9. Bartles H., Bohmer M., Heirli C. Serum creatinine determination without protein precipitation. Clin. Chem. Acta. 1972; 37: 193–7.
10. Larsen K. Creatinine assay by a reaction-kinetic principle. Clin. Chem. Acta. 1972; 41: 209–217.
11. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. Москва: СпецПит; 2010.
12. Tambuwal F.M., Agale B.M., Bangana A. Haematological and biochemical values of apparently healthy red sokoto goats. Proceeding of the 27th Annual conference. Nigerian Society of Animal Production held at FUTA; 2002 Sept 6-10; Nigeria; 2002. p. 50–3.

Поступила 23.08.2012