

*КРАСНОВ М.С., *ЯМСКОВА В.П., *РЫБАКОВА Е.Ю., КУЛИКОВА О.Г.,
МАРГАСЮК Д.В., ЯМСКОВ И.А.

* Учреждение Российской Академии Наук Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26,
e-mail: embrmsk@mail.ru

Учреждение Российской Академии Наук Институт элементоорганических
соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 28

АКТИВНЫЕ В СВЕРХМАЛЫХ ДОЗАХ БИОРЕГУЛЯТОРЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ПОДОРОЖНИКА И АЛОЭ, ОКАЗЫВАЮТ ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ НА КОЖУ В СИСТЕМАХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Ранее в различных тканях животных нами были идентифицированы биорегуляторы (БР), проявляющие активность в сверхмалых дозах (СМД), соответствующих концентрациям 10^{-8} – 10^{-15} мг/мл. Для исследования БР данной группы был разработан экспериментальный подход, включающий получение тканевого экстракта, содержащего БР, методику очистки, а также метод биотестирования и экспериментальные модели для изучения специфической активности этих биорегуляторов [1–8]. В этих исследованиях было установлено, что БР локализованы во внеклеточном пространстве, а их активность характеризуется наличием тканевой, но отсутствием видовой специфичности. В СМД БР влияют на важнейшие биологические процессы — миграцию, адгезию, пролиферацию, дифференцировку клеток [3–8]. Результаты исследований показали, что данные БР характеризуются сходством ряда физико-химических свойств, а именно: низким значением (менее 10 кДа) молекулярной массы, устойчивостью к воздействию денатурирующих факторов, преобладанием β -структур во вторичной структуре, тенденцией к агрегации, результатом которой является образование наночастиц в водном растворе. Целью настоящей работы явилась идентификация в тканях растительного происхождения БР данной группы и изучение их специфической активности. В качестве объектов исследования были выбраны лекарственные растения, широко применяемые в медицине, подорожник большой *Plantago major* и алоэ древовидное *Aloe arborescens*.

Материалы и методы

Выделение БР из растений проводили по методике, разработанной для биорегуляторов данной группы [2–8]. Тканевые экстракты получали из свежих листьев подорожника большого и алоэ древовидного, нарезанных на небольшие фрагменты, которые экстрагировали в растворе с pH 6,0, содержащем NH_4NO_3 $2,06 \cdot 10^{-2}$ моль/л; KNO_3 $1,88 \cdot 10^{-2}$ моль/л; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $3 \cdot 10^{-3}$ моль/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1,5 \cdot 10^{-3}$ моль/л; KH_2PO_4 $1,25 \cdot 10^{-3}$ моль/л, в течение 2-х часов при 4 °С. Далее, полученные экстракты дважды высаливали, добавляя сульфат аммония до образования насыщенного раствора. Фракции супернатантов разделяли либо методом изоэлектрофокусирования в градиенте плотности сахарозы (pH 3,5–10,0), либо с помощью ионообменной

ДЭАЭ-хроматографии, а также методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (градиент ацетонитрил-вода). Исследование вторичной структуры БР проводили методом кругового дихроизма в УФ-области (195–260 нм) на КД-спектрометре “Jasco” 720 (Япония) при 20 °С в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 мм. Размеры частиц в водных растворах БР определяли методом лазерного динамического светорассеивания. Исследование проводили методом динамического светорассеяния на приборе “PhotoCor Complex” (фирма “Фотокор”, Россия). Измерения проводили при интервале величин угла рассеивания 60–120° при 23 °С. Растворы, содержащие биорегулятор, предварительно очищали от пыли фильтрованием через мембраны “Dura-pore” с диаметром пор 0,45 мкм (“Millipore”).

Роллерное органическое культивирование in vitro проводили на взрослых половозрелых тритонах *Pleurodeles waltl* обоего пола, содержащихся в аквариальной ИБР РАН. После наркоза в 2% растворе этилуретана на физиологическом растворе для амфибий (0,65% NaCl) или 0,1% растворе MS-222 (Sigma, Германия), животных декапитировали, брали фрагменты кожи размером 5·5 мм с верхней части спины, которые помещали во флаконы для культивирования ткани. Среда для культивирования ткани кожи содержала: 70 мл среды 199, 10 мл эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота, 30 мл кипячёной бидистиллированной воды, 200 мкл 4% сульфата гентамицина, проходила холодную стерилизацию через мембранные фильтры типа “CA” фирмы Nalgene, (США) с размером пор 0,2 мкм.

В опытных сериях культивирование проводили в среде (4 мл) с добавлением 40 мкл фракций растительных БР; в контрольной серии к 4 мл культуральной среды добавляли 40 мкл дистиллированной воды. Все флаконы закрывали в стерильных условиях, и далее культивировали, вращая в роллере при температуре 22 °С в течение 7 сут.

Экспериментальная модель кожной раны у мышей F1 (C57bl/CBA) in vivo. У каждого экспериментального животного под эфирным наркозом, на спине вырезали лоскут кожи, диаметром около 1 см. Обработка раны: 1) Контрольная группа мышей, которым наносили травму и не подвергали далее никакому воздействию; 2) опытная группа мышей, которым после нанесения травмы ежедневно наносили в область раны 100 мкл фракции БР алоэ; 3) опытная группа мышей, которым после нанесения травмы ежедневно наносили в область раны 100 мкл фракции БР подорожника. На 11 сутки после нанесения экспериментальной раны всех животных умерщвляли в атмосфере эфира, аккуратно вырезали ткань в области травмы и приготавливали поперечные парафиновые гистологические срезы толщиной 7 мкм. Фиксацию тканей проводили в растворе Буэна, срезы толщиной 7 мкм окрашивали гематоксилин-эозином по стандартной методике. Просмотр гистологических препаратов производили с помощью световой микроскопии на микроскопе фирмы Olympus (Япония).

Специфическую активность кислых БР, выделенных из алоэ и подорожника, изучали в концентрации 10^{-11} мг белка/мл.

Результаты и обсуждение

В процессе выделения и очистки БР растений были обнаружены во фракциях кислых белков ($\text{pH} < 3,5$), которые проявляли мембранотропную активность в сверхмалых дозах на клетках млекопитающих в условиях органного культивирования [9]. Было показано преобладание во вторичной структуре антипараллельных β -структур (30–40%) и статистического клубка (25–37%), в то время как содержание α -спиральных участков (5–9%) весьма незначительно. Данный характер вторичной структуры указывает на тенденцию БР к образованию межмолекулярных ассоциатов [9]. Методом динамического лазерного светорассеяния было установлено, что в водных растворах исследуемые растительные БР образуют наночастицы размерами 70–130 нм, причем эти значения достоверно не изменялись при уменьшении концентрации БР в растворе в 1,3 раза, в 0,9% растворе хлорида натрия и изменении pH от 5,5 до 7,0. С помощью методов иммуногистохимии было показано, что БР, выделенный из листьев подорожника, локализован в межклеточном пространстве ткани листа (рис. 1).

Таким образом, полученные данные указывают на сходство физико-химических свойств и биологической активности БР растительного происхождения со свойствами БР, идентифицированных в тканях животных [1–8].

На модели роллерного органного культивирования кожи тритона *Pleurodeles waltl* показано, что оба БР в СМД проявляют протекторное действие на ткань, которое после 7 суток культивирования выражалось в поддержании структуры кожи, сохранении покровного эпителия, сохранении функций желез по сравнению с контрольными культурами, в которых обнаруживались явные признаки протекания деструктивных процессов (рис. 2).

Наиболее выраженное протекторное действие изучаемых БР продемонстрировано на модели экспериментальной травмы кожи мыши *in vivo* (удаление на спине животного лоскута кожи площадью 1 см^2). Через 11 суток после операции у всех экспериментальных животных наблюдали практически полную реэпителизацию раневой поверхности, незначительное воспаление в субэпидермальной зоне. У мышей контрольной группы (необработанная рана) происходило образование фиброзного рубца —

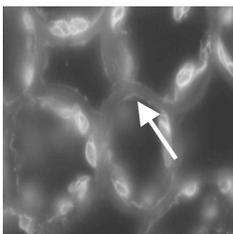


Рис. 1. Локализация биорегулятора подорожника в межклеточном пространстве листьев *Plantago major*. Показано стрелкой. Внутри клеток наблюдается неспецифическое свечение хлоропластов

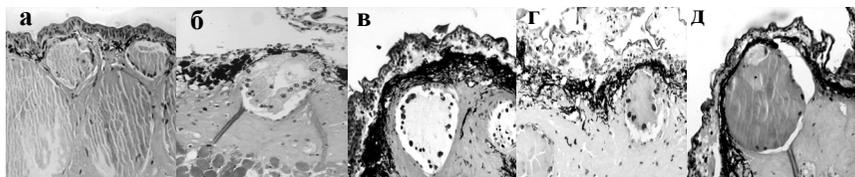


Рис. 2. Кожа тритона *Pleurodeles waltl*: а) — нативная, б) — роллерное культивирование в течение 7 суток (контроль), в) — роллерное культивирование в течение 7 суток с добавлением биорегулятора алоэ, г) — роллерное культивирование в течение 7 суток с добавлением биорегулятора подорожника, д) — роллерное культивирование в течение 7 суток с одновременным добавлением биорегуляторов алоэ и подорожника

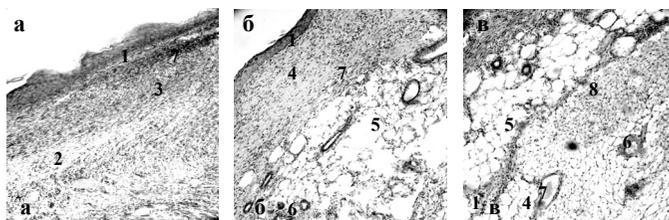


Рис. 3. Кожа мыши через 11 суток после нанесения экспериментальной травмы *in vivo*: а) — контроль; влияние БР алоэ (б) — БР подорожника (в) — на заживление экспериментальной кожной раны. 1 — эпителий, 2 — место протекания воспалительного процесса, 3 — рубцовая ткань, 4 — дерма, 5 — подкожная жировая ткань, 6 — протоки желез, 7 — кровеносный сосуд, 8 — бурый жир. (ув. x40, окрашивание гематоксилин-эозин)

отмечено параллельное эпидермису расположение коллагеновых волокон в виде плотных тяжей (рис. 3,а).

У мышей опытных серий (рану ежедневно обрабатывали, соответственно, растворами БР алоэ (рис. 3,б) и подорожника (рис. 3,в) наблюдали восстановление субэпидермальных слоев. Следует отметить комплексный характер репаративных процессов, протекающий при воздействии БР подорожника и алоэ, по сравнению с контролем. Наблюдали практически полное восстановление эпителия и дермы, в которой были отмечены кровеносные сосуды, особенно при воздействии БР подорожника. В дерме также наблюдали более рыхлое расположение волокон под воздействием растительных БР, чем в контроле, а под дермой наблюдалось интенсивное разрастание жировой ткани, причем при воздействии БР подорожника наблюдали образование мелких жировых клеток с гранулярным содержимым, напоминающих клетки бурого жира. Помимо этого, в подкожной жировой ткани под воздействием растительных БР восстанавливаются протоки желез. В контроле восстановления жировой ткани на месте повреждения не происходило, а также не было восстановления протоков желез.

Выводы

Полученные данные показывают, что БР, выделенные из подорожника и алоэ, в СМД стимулируют ранозаживление у мышей *in vivo*, способствуя восстановлению нормальной морфологии кожи, без образования рубцовой ткани, а также поддерживают нормальную морфологию ткани кожи тритона *in vitro*. В настоящем исследовании установлено, что специфическая активность БР, коррелирует с лекарственным действием растений, из которых они были выделены.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 10-04-00706-а.

Литература

1. Ямскова В.П., Резникова М.М. // Журн. общей биологии.— 1991.— Т.52, №2.— С. 181–191.
2. Ямсков И.А., Ямскова В.П., Даниленко и др. // Российский Химический Журн. (ЖРХО им. Д.И. Менделеева).— 1999.— Т.43, №5.— С. 34–39.
3. Krasnov M.S., Gurmizov E.P., Yamskova V.P. et al. (2007) // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 28–37.
4. Borisenko A.V., Yamskova V.P., Krasnov M.S. et al // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 38–48.
5. Margasyuk D.V., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V. et. al // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 49–56.
6. Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V. et al // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 57–70.
7. Yamskova V.P., Krasnov M.S., Rybakova E. Yu et al // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 71–78.
8. Nazarova P.A., Yamskova V.P., Krasnov M.S. et al // In: New Trends in Biochemical Physics Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 73–82.
9. Ross C.A., Poirier M.A. Protein aggregation and neurodegenerative disease // Nat. Med.— 2004.— 10 Suppl.— P. 10–17.

Резюме

Биорегуляторы, выделенные из подорожника и алоэ, в сверхмалых дозах стимулируют ранозаживление у мышей *in vivo*, способствуя восстановлению нормальной морфологии кожи, без образования рубцовой ткани, а также поддерживают нормальную морфологию ткани кожи тритона *in vitro*. В настоящем исследовании установлено, что специфическая активность биорегуляторов коррелирует с лекарственным действием растений, из которых они были выделены.

Биорегулятори, виділені з подорожника і алоє, в надмалих дозах стимулюють ранозаживлення у мишей *in vivo*, сприяючи відновленню нормальної морфології шкіри, без освіти рубцевої тканини, а також підтримують нормальну морфологію тканини шкіри тритона *in vitro*. У цьому дослідженні встановлено, що специфічна активність біорегуляторів корелює з лікарською дією рослин, з яких вони були виділені.

Bioregulators isolated from plantain and aloe in ultra low doses stimulate wound healing in mice *in vivo*, contributing to the restoration of normal morphology of the skin, without the formation of scar tissue, as well as maintain the normal morphology of the new skin tissue *in vitro*. In the present study found that the specific activity of bioregulators correlated with drug action of plants from which they were allocated.

КРУГЛОВА А.Е., КРУГЛОВА Н.Н.

*Институт биологии Уфимского НЦ РАН,
Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 69, e-mail: Kruglova@anrb.ru*

**МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ *IN VITRO*
РЕДКИХ И НАХОДЯЩИХСЯ ПОД УГРОЗОЙ ИСЧЕЗНОВЕНИЯ
ВИДОВ РОДА *OXYTROPIS* ИЗ ФЛОРЫ ЮЖНОГО УРАЛА
КАК БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ
ИХ СОХРАНЕНИЯ**

Сохранение редких и находящихся под угрозой исчезновения растений как составная часть сохранения биологического разнообразия — важнейшая научная проблема. Традиционными подходами к решению этой проблемы являются создание охраняемых территорий или заказников, интродукция растений в питомники ботанического сада, в том числе в целях их реинтродукции в естественные местообитания, а также создание банков семян.

Ещё один подход к решению данной проблемы, активно разрабатываемый в последние годы, — биотехнологический. При этом используются такие методы биотехнологии, как клональное микроразмножение, культура *in vitro* различных частей растений, формирование и развитие регенерантов из зародышеподобных структур — эмбриоидов [1–3, 6–9].

Биотехнологические методы культуры *in vitro* могут быть использованы и по отношению к сохранению редких и находящихся под угрозой исчезновения растений рода остролодочник *Oxytropis* (семейство бобовые Fabaceae Lindl.) из флоры Южного Урала.

Следует отметить, что такого рода исследования впервые проведены под руководством К.З. Гамбурга сотрудниками Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН, разработавшими способ клонального микроразмножения остролодочника трехлисточкового *Oxytropis triphylla* Pall., эндемика западного побережья озера Байкал [4, 10].

Материал и методы

Объектом исследования послужили редкие и находящиеся под угрозой исчезновения растения флоры Южного Урала из семейства бобовые: эндемики Южного Урала остролодочник Гмелина *Oxytropis gmelinii* Fisch. ex Boriss. и остролодочник уральский *O. uralensis* (L.) DC., а также реликтовый вид Южного Урала остролодочник сходный *O. ambigua* (Pall.) DC., включенные в “Красную книгу Республики Башкортостан” [5].

Семена *Oxytropis gmelinii* собраны во время экспедиционных выездов (коллекторы А.А. Мулдашев и А.Х. Галеева) в Кугарчинском районе (склоны горы Маякташ), семена *Oxytropis uralensis* — в Учалинском районе (берега озера Аушкуль), семена *Oxytropis ambigua* — в Ишимбайском районе (склоны горы Тратау) Башкортостана.

За основу проведения экспериментальной части работ использовали метод клонального микроразмножения *in vitro* остролодочника трехлисточкового *Oxytropis triphylla*, изложенный в работе [10]. Для индукции