

УДК 543.5;547.96;577.112

ИЗУЧЕНИЕ НОВОЙ ГРУППЫ БИОРЕГУЛЯТОРОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОДОРОЖНИКА БОЛЬШОГО (*Plantago major* L.)

© 2011 г. М. С. Краснов*, В. П. Ямскова*, Д. В. Маргасюк**, О. Г. Куликова**, А. П. Ильина**, Е. Ю. Рыбакова*, И. А. Ямсков**

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва 119334
e-mail: embrmsk@mail.ru

**Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, 119991
e-mail: yamskov@mail.ru

Поступила в редакцию 12.05.2010 г.

В листьях подорожника большого (*Plantago major* L.) были обнаружены биорегуляторы, проявляющие физико-химические свойства и биологическую активность, сходные с мембранотропными гомеостатическими тканеспецифическими биорегуляторами, ранее найденными в различных тканях животных. Для изучения специфической активности данных растительных биорегуляторов впервые разработана экспериментальная модель роллерного органотипического культивирования ткани кожи тритона (*Pleurodeles waltli*) *in vitro*. Показано, что изучаемые растительные белки оказывают свойственное данному лекарственному растению ранозаживляющее действие на кожу позвоночных животных *in vitro* и *in vivo*.

Проблема поиска и исследования биологически активных веществ, ответственных за лекарственные свойства растений, до сих пор остается весьма актуальной. Несмотря на то, что в лекарственных растениях обнаружены такие группы биологически активных веществ, как витамины, флавоноиды, терпены, фитонциды, гликозиды и др., вопрос о том, какие вещества обуславливают эффективность применения ряда растений для профилактики и лечения определенных патологий, в настоящее время не находит четкого ответа. В этом аспекте нами был изучен подорожник большой (*Plantago major* L.) как растение, проявляющее выраженное ранозаживляющее действие [1]. В настоящем исследовании была предпринята попытка идентификации в этом растении новой группы биорегуляторов, которые могут влиять на репаративные свойства кожи у позвоночных животных.

Ранее в различных тканях животных нами были обнаружены биорегуляторы, которые в сверхмалых дозах (СМД), соответствующих концентрациям 10^{-8} – 10^{-15} мг/мл, влияют на важнейшие биологические процессы – миграцию, адгезию, пролиферацию, дифференцировку клеток [2–8]. Было установлено, что биорегуляторы локализованы во внеклеточном пространстве, а их активность характеризуется наличием тканевой, но отсутствием видовой специфичности. Биорегуляторы данной группы стимулируют репаративные процессы в патологически измененных тканях, способствуя восстановлению их нарушенной структуры [9]. По сути, их можно отнести к группе регуляторных молекул, которые функционируют как “настройщики” органо-тканевого гомеостаза.

На основании сходства физико-химических свойств и биологического действия биорегуляторы,

выделенные из различных тканей и секретов животных, получили название мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ). МГТБ животного происхождения имеют сложный состав, в них обнаружены углеводы, липиды, белки [10]. Белковая компонента ответственна за проявление биологического действия МГТБ. Показано, что мембранотропное действие проявляли небольшие пептиды (значения их молекулярной массы не превышает 6 кДа), а связанные с ними высокомолекулярные белки модулировали их активность. Комплекс между пептидами и белками-модуляторами образуется по механизму углевод-белкового взаимодействия в присутствии ионов кальция [11]. МГТБ, выделенные из тканей животных, проявляли устойчивость к воздействию денатурирующих факторов, их вторичная структура характеризовалась преобладанием β -структур. Показано, что в водном растворе МГТБ присутствовали в виде частиц размером 50–150 нм [5–8, 12].

Цель работы – идентификация в листьях подорожника большого биорегуляторов данной группы и изучение их специфической активности с использованием экспериментального подхода, разработанного ранее для выделения и очистки МГТБ животного происхождения, включающий в себя получение тканевого экстракта, методику очистки, а также метод биотестирования и экспериментальные модели для изучения их специфической активности.

МЕТОДИКА

Подорожник большой (*Plantago major* L.) был получен из питомника главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН. В работе использовали сернокислый аммоний, нитрат аммония, нитрат калия,

гидрат сульфата магния, фосфат калия, гидрат хлорида кальция, азид натрия марки “х.ч.”. Была использована очищенная вода (16 МОм). Органотипическое культивирование проводили в питательной среде 199. Исследование биологической активности растительных биорегуляторов проводили на мышах-гибридах F1 линии C57BL/СВА (самцы весом 18–20 г), а также на взрослых половозрелых тритонах (*Pleurodeles waltl*) обоего пола, содержащихся, соответственно, в стандартных условиях вивария и аквариальной Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. В работе был использован роллер марки “Assistant RM5” (Германия). Центрифугирование проводили на центрифуге Т 32А (“Janetzki”, Германия).

Выделение и очистка биорегулятора. Для экстракции использовали свежие листья подорожника, нарезанные на небольшие фрагменты, размером 1–1.5 см, которые помещали в экстрагирующий раствор (2.06×10^{-2} М NH_4NO_3 , 1.88×10^{-2} М KNO_3 , 3×10^{-3} М $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.5×10^{-3} М $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.25×10^{-3} М KH_2PO_4) на 5–6 ч при температуре 8–10°C. Полученный экстракт фильтровали через несколько слоев марли, центрифугировали (3000 г, 30 мин), осадок отбрасывали и далее не использовали. К раствору растительного экстракта добавляли сухой сернистый аммоний при постоянном перемешивании до образования насыщенного раствора соли (780 г/л), поддерживая рН раствора 7.5–8.0 путем добавления раствора гидроксида аммония. Полученную белковую смесь оставляли на 95–100 ч при 4°C. Осадок белков отделяли центрифугированием (25000 г, 30 мин при 4–8°C). Полученную таким образом фракцию супернатанта и осадка диализовали против воды до полного удаления сернистого аммония и затем концентрировали при 37–40°C при помощи роторного вакуумного испарителя.

Изоэлектрофокусирование (ИЭФ). Использовали градиент плотности сахарозы на колонке LKB-440 (Швеция) при 4°C в течение 96 ч и напряжении 500–2000 В. Детекцию белковых фракций осуществляли спектрофотометрически при 280 нм.

Концентрацию белка в растительном экстракте и его фракциях определяли спектрофотометрическим [13] и колориметрическим методами [14].

На каждой стадии очистки присутствие биорегулятора во фракциях определяли адгезиометрическим методом, разработанным ранее для идентификации МГТБ [2]. Для подсчета количества выделившихся клеточных ядер адгезиометрическим методом использовали камеру Горяева. Фрагменты ткани печени подвергали деформационному стандартному воздействию при помощи стеклянного дезинтегратора.

Метод динамического лазерного светорассеяния. Исследование проводили методом динамического светорассеяния на приборе “PhotoCorr Complex” (Россия), снабженном автоматическим гониомет-

ром, псевдкорреляционной системой счета фотонов PhotoCorr-PC2, характеризующейся отсутствием послеимпульсов, что позволяет измерять размеры наночастиц порядка 1 нм и выше, одноплатным мультитиммерным коррелятором реального времени “PhotoCorr-FC” (Россия), использованном в логарифмической конфигурации (интервал времен задержки $0.01\text{--}5 \times 10^5$ мс), и гелий-неоновым лазером “Uniphase 1135P” (Россия) мощностью 20 мВт с длиной волны 633 нм [4–7, 14]. Измерения проводили при интервале величин угла рассеивания 60–120° при 23°C. Растворы, содержащие биорегулятор, предварительно очищали от пыли фильтрованием через мембраны с диаметром пор 0.45 мкм “Millipore” (США).

Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ). Электрофорез проводили по методу Леммли [15]. Применяли маркерные белки 14.4–94 кДа “Хеликон” (Россия), для идентификации пептидов в данную смесь была добавлена окисленная В-цепь инсулина из поджелудочной железы быка 3.5 кДа “Sigma” (Германия) из расчета конечного разведения 1 мг/мл. Электрофорез белковых фракций проводили также в неденатурирующих условиях в 7.5%-ном ПААГ [16].

Масс-спектрометрический анализ. Анализ молекулярной массы пептидов проводили методом лазерной десорбционной ионизации (MALDI-TOF) на времяпролетном масс-спектрометре “UltraFlex 2” (Германия). Времяпролетные масс-спектры фиксировали в линейном режиме и режиме рефлектора. Образцы для масс-спектрометрического анализа получали упариванием досуха, с последующим разведением в 70%-ном ацетонитриле, содержащем 0.1%-ную трифторуксусную кислоту. В качестве матрицы использовали α -циано-4-гидроксицианомовую кислоту.

Роллерное органное культивирование *in vitro*. Тритоны были наркотизированы в 2%-ном растворе этилуретана на физиологическом растворе для амфибий (0.65% NaCl) или 0.1%-ном растворе MS-222 “Sigma” (Германия). Далее животных ополаскивали в спирте, декапитировали, брали кожу с верхней части спины животного, с помощью скальпеля кожу нарезали на фрагменты размером 5 × 5 мм, 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 кипяченой бидистиллированной воды, 200 мкл 4%-ного сульфата гентамицина. Среда для культивирования перед внесением в пузырьки 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, выделенных из подорожника большого; 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 22°C в течение 7 сут.

Изучение ранозаживляющего действия биорегулятора, выделенного из подорожника, на экспериментальной модели кожной раны у мыши *in vivo*. Животных разделяли на три группы по 5 шт. в каждой. У каждого экспериментального животного под эфирным наркозом на спине вырезали лоскут кожи диаметром около 1 см. Контрольную группу мышей, которым наносили травму, не подвергали никакому воздействию. Другой контрольной группе мышей после нанесения травмы ежедневно вносили в область раны 100 мкл физиологического раствора. Опытной группе мышей после нанесения травмы ежедневно вносили в область раны 100 мкл фракции, выделенной из подорожника.

На 11 сут после нанесения экспериментальной раны всех животных выводили из эксперимента 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).

Получение антисыворотки. Эксперимент проводили на кролике породы Шиншилла, самец, возраст — 2 мес, масса — 1 кг. Раствор антигена вводили инъекционно подкожно в спину 0.5 мл и внутримышечно в бедро 0.5 мл. Первую инъекцию проводили смесью (1 мл), содержащей полный адъювант Фрейнда и водный раствор слабодиссоциированной фракции белка (рН 3.9–4.8), выделенной из подорожника (0.3 мг/мл) в соотношении 1 : 1. Последующие инъекции антигеном кролика проводили с интервалом в 7 сут смесью (1 мл), содержащей неполный адъювант Фрейнда и водный раствор белка (0.3 мг/мл) в соотношении 1 : 1. Забор проб крови производили, начиная со 2 нед после первой иммунизации путем надреза ушных сосудов, и исследовали на наличие антител методом твердофазного иммуноферментного анализа ELISA с интервалом в 7 сут.

Иммуноферментный анализ антител (ELISA). Метод основан на определении количества антител, присоединившихся к сорбированному на плашке антигену, с помощью конъюгата антивидовых антител пероксидазы. Измеряемая ферментативная активность пероксидазы пропорциональна количеству присоединившихся антител.

В лунки 96-луночного планшета для иммуноферментного анализа вносили по 100 мкл белка, 5 мкг белка/мл фосфатного буферного раствора (на 1 л: 0.2 г/л KCl, 1.44 г/л Na₂HPO₄, 0.24 г/л KH₂PO₄, 2 мл 5 M NaCl; рН 7.4), и инкубировали ночь при 4°C или 1 ч при 37°C. Избыток антигена отмывали 3 раза

фосфатным буфером, содержащим 0.05%-ный Твин-20, и вносили по 100 мкл антисыворотки в концентрации от 2–3 нг/мл до 1–2 мкг/мл в растворе фосфатного буфера, содержащего 2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и 0.1%-ный Твин-20. Титрование проводили с разведением антисыворотки 1 : 3. После инкубации при 37°C в течение 1 ч, несвязавшиеся антитела отмывали 5 раз (после третьего — встряхивание) по 100–200 мкл фосфатным буфером, содержащим 0.05%-ный Твин-20. Для выявления антител, присоединившихся к антигену (белку), в лунки вносили по 100 мкл конъюгата антивидовых антител с пероксидазой из листьев хрена в растворе фосфатного буфера, содержащего 0.1%-ный Твин-20, инкубировали 1 ч при 37°C и отмывали 5 раз фосфатным буфером, содержащим 0.05%-ный Твин-20 (после третьего — встряхивание).

Для измерения каталитической активности пероксидазы в лунки вносили по 100 мкл свежеприготовленной субстратной смеси следующего состава: 1 таблетка орто-фенилендиамина, 10 мл буферного раствора (цитратно-фосфатный — 92 мл 0.1 M лимонной кислоты; 102 мл 0.2 M Na₂HPO₄ · 2H₂O; рН 4.5–5.0), 20 мкл 30%-ного пероксида водорода. Развитие окраски происходило в течение 15–30 мин при легком перемешивании субстратной смеси при комнатной температуре. Остановку окрашивания производили путем добавления к содержимому каждой лунки по 20 мкл 3 M соляной кислоты. Спектрофотометрически при 492 нм определяли величину оптического поглощения для всех приготовленных растворов, в качестве контроля исследовали раствор, к которому не добавляли антитела.

Иммуногистохимическое окрашивание с использованием FITC-меченых вторичных антител. Для изучения экспрессии слабодиссоциированного белка, выделенного из подорожника, предварительно получали кроличью антисыворотку, которую использовали в качестве первых антител к данному белку в разведении 1 : 10. Применяли метод непрямого иммуноокрашивания с применением вторых, меченых FITC-антител (fluorescein isothiocyanate) (IgG, полная молекула, "Sigma"), антикроличьими антителами в разведении 1 : 35 [17]. Для контроля использовали срезы, окрашенные только вторыми антителами, а также окрашенные антисывороткой от неиммунизированного кролика. Изучение локализации и приготовление изображений проводили с помощью микроскопа фирмы "Olympus" (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе очистки было проведено фракционирование экстракта подорожника путем высадки белков сернокислым аммонием. При создании насыщенного раствора соли в растительном экстракте примесные белки переходили в осадок, а в супернатанте оставались изучаемые биорегуляторы (таблица). На рис. 1 приведена диаграмма, отражаю-

Характеристика фракций подорожника большого

Фракция	Объем, мл и масса, г	Исходная концентрация, мг/мл	Интервалы разбавлений, при которых наблюдался биологический эффект
Экстракт*	3000 мл	0.2	10^{11} , 10^{10} , 10^7 , 10^5 , 10^4
Супернатант	65 мл	0.4	10^2 – 10^8 , 10^{15}
Осадок	0.4 г	0.1	Не активен

* Получен из 800 г веса свежих листьев подорожника.

щая мембранотропную активность супернатанта подорожника, которая характеризовалась полимодальной дозовой зависимостью. Следует отметить, что экстракт подорожника также проявлял активность данного типа. Фракцию осадка далее не исследовали, поскольку она не была биологически активной (таблица).

Фракция супернатанта, выделенная из подорожника, была исследована несколькими методами. Методом динамического лазерного светорассеяния было показано, что в растворе этой фракции содержатся частицы размером от 100 ± 5 до 120 ± 6 нм. Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии в супернатанте подорожника были обнаружены сигналы со значениями m/z , равными 2374, 2591, 2963, 3403. Проведя идентификацию полученных масс-спектрометрических сигналов путем поиска совпадений значений экспериментальных масс с массами пептидов, аннотированных в соответствующих базах данных (SwissProt/TrEMBL) с использованием ресурсов ExPASy-сервера (<http://ca.exPASy.org/srs5/>) не было найдено соответствия с уже известными пептидами.

После разделения фракции супернатанта методом ИЭФ были собраны три рН-фракции: 1–1.8–

3.0; 2–3.9–4.8; 3–8.5–9.5. Методом биотестирования было установлено, что все полученные фракции обладали биологической активностью. Мембранотропная активность, проявляемая данными ИЭФ-фракциями, характеризовалась полимодальной дозовой зависимостью и проявлялась в СМД (10^{-15} – 10^{-11} мг белка/мл). При помощи электрофореза в ПААГ были изучены биологически активные ИЭФ-фракции. Было показано наличие трех белковых компонент в области молекулярных масс менее 6 кДа, 10–15 кДа и 67–80 кДа (рис. 2б). Следует отметить, что при электрофорезе в нативных условиях наиболее четко проявлялись белки с высокой подвижностью (рис. 2а). Возможно, что белки, входящие в ИЭФ-фракции, способны образовывать межмолекулярные ассоциаты, которые при воздействии ДДС-Na и других денатурирующих агентов распались на отдельные компоненты, обладающие различной электрофоретической подвижностью. Поэтому мы наблюдали различное распределение белковых компонент в нативных и денатурирующих условиях. Такая картина разделения компонентов по электрофоретической подвижности наблюдалась во всех исследуемых фракциях подорожника. Следует отметить, что в случае МГТБ животного проис-

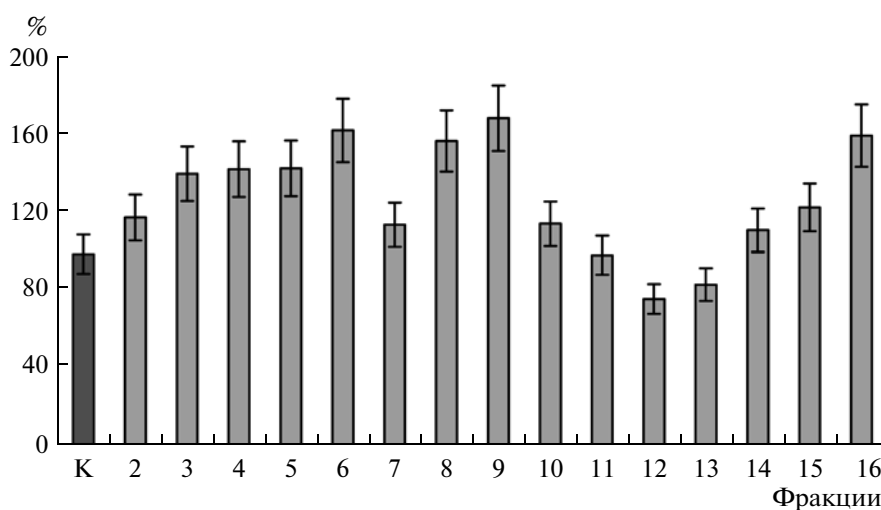


Рис. 1. Дозовая зависимость мембранотропной активности (%) фракции супернатанта экстракта подорожника. По оси абсцисс: степень 10-кратного последовательного разбавления фракции (исходная концентрация 0.4 мг/мл), К – контроль.

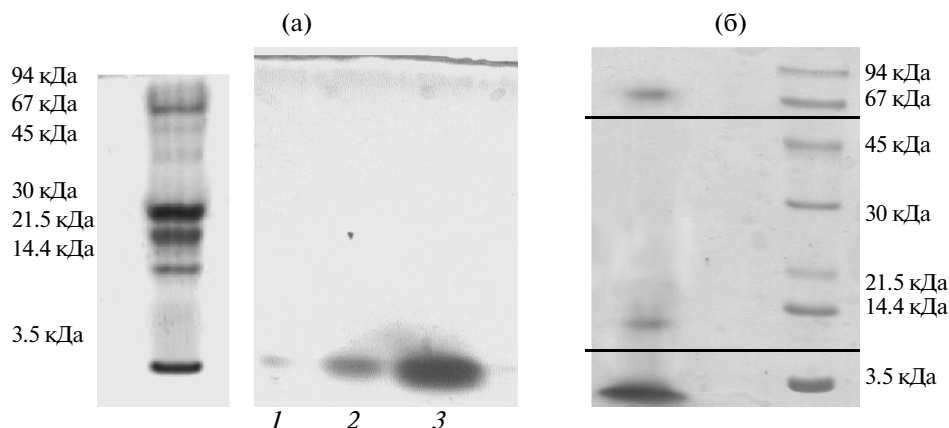


Рис. 2. Электрофорез в 7.5%-ном ПААГ фракций белков подорожника в нативных условиях (а) фракций, содержащих биорегулятор, выделенный из подорожника: 1 – (рН 1.8–3.0); 2 – ИЭФ-фракция белков (рН 3.9–4.8); 3 – ИЭФ-фракция белков (рН 8.5–9.5) и электрофорез ИЭФ-фракции белков (рН 1.8–3.0) в присутствии ДДС-Na (б). Окрашивание Кумаси G-250.

хождения также удалось идентифицировать пептиды, входящие в состав биорегуляторов данной группы и показать, что они взаимодействуют с другими белками, образуя межмолекулярные ассоциаты с различным значением молекулярных масс [6, 12]. Поскольку картина разделения фракций 1–3 в случае электрофореза в нативных условиях была схожей, для дальнейших исследований нами была выбрана наиболее количественно представленная фракция 2 (рН 3.9–4.8). В связи с этим она была использована в качестве антигена для получения поликлональной антисыворотки у кролика с целью изучения локализации биорегулятора в листе подорожника. Было установлено, что биорегулятор локализован в межклеточном пространстве между плазматической мембраной клетки и клеточной стенкой (рис. 3). Данные по локализации биорегулятора подорожника на поверхности клеток согласо-

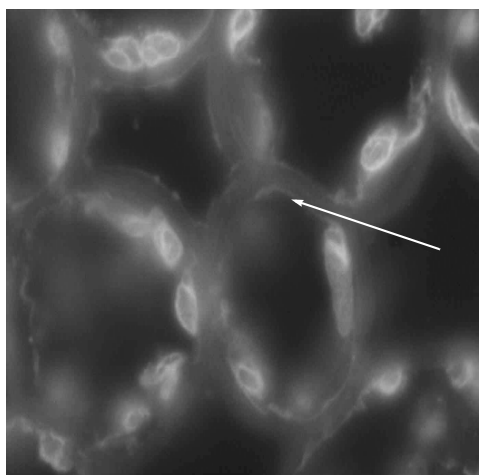


Рис. 3. Локализация биорегулятора подорожника в межклеточном пространстве листьев (см. стрелку).

ются с данными по локализации МГТБ животного происхождения, которые также были обнаружены на поверхности клеток соответствующих тканей [5–7]. Локализация биорегуляторов на поверхности клеток ткани объясняет то, что они в процессе экстракции при условии отсутствия механической и ферментативной обработки легко переходят в раствор.

Таким образом, полученные данные показывают, что, применив экспериментальный подход, разработанный для МГТБ животного происхождения, в подорожнике большом были обнаружены биорегуляторы, проявляющие в СМД мембранотропную активность, которая характеризуется полимодальной дозовой зависимостью. В водном растворе биорегулятора обнаруживаются наноразмерные частицы. В составе фракции растительного биорегулятора были обнаружены пептиды с молекулярными массами не более 4 кДа. Методом ИЭФ было показано, что растительные биорегуляторы, так же, как и МГТБ животного происхождения, представляют собой, в основном, кислые белки. Результаты исследования биорегулятора, выделенного из подорожника, предполагают, что растительные биорегуляторы так же, как и МГТБ животного происхождения, имеют внеклеточную локализацию. Результаты данного исследования позволяют предположить, что в подорожнике большом присутствуют биорегуляторы, проявляющие сходные свойства с МГТБ, выделенными из тканей животных.

Далее было проведено исследование специфической активности ИЭФ-фракций на модели роллерного органного культивирования кожи тритона *in vitro* и на модели экспериментальной раны у мыши *in vivo*. Фракции, выделенные из подорожника, изучали в концентрации 10^{-11} мг белка/мл.

Модель роллерного органотипического культивирования кожи тритона (*Pleurodeles waltli*) была

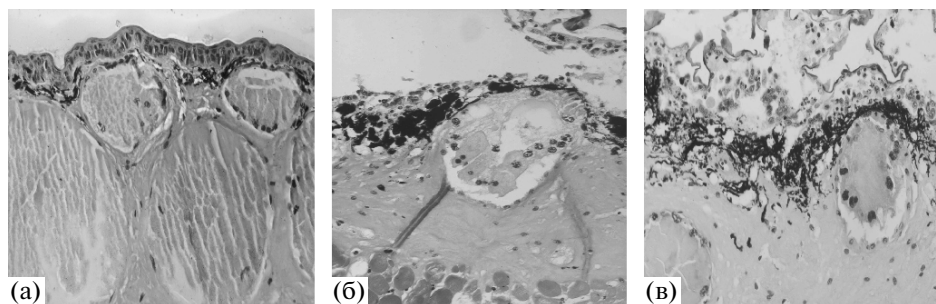


Рис. 4. Гистологические срезы кожи тритона: нативная кожа (а), роллерная органная культура на 7 сут, контроль (б), роллерная органная культура на 7 сут с добавлением биорегулятора подорожника (в).

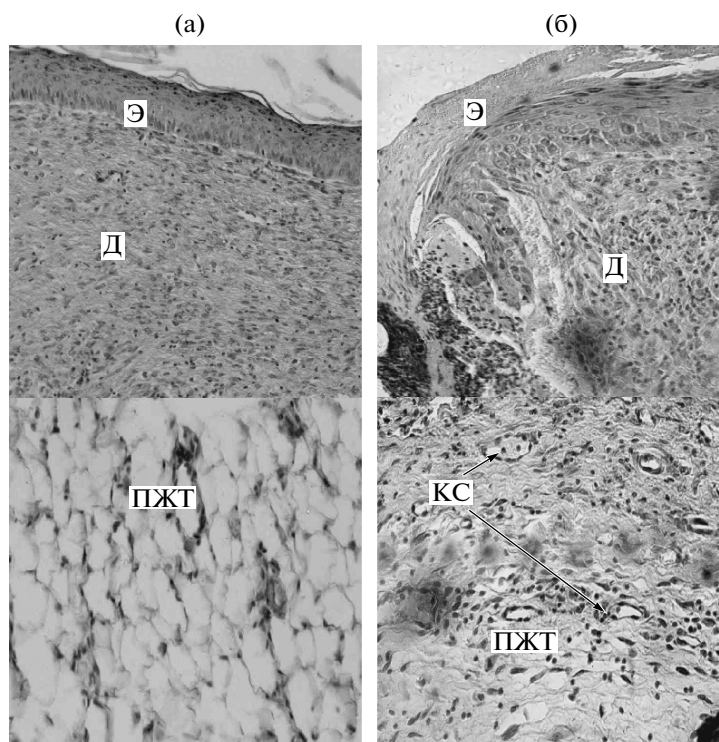


Рис. 5. Ранозаживление кожи мыши на 11 сут после нанесения раны: без обработки раны, контроль (а) и действие физиологического раствора (б). Э – эпидермис, Д – дерма, ПЖТ – подкожная жировая ткань, КС – кровеносные сосуды.

впервые использована нами в данной работе на основании ранее полученных результатов, которые показали, что протекторное действие МГТБ обусловлено их способностью дополнительно стимулировать клеточные источники регенерации в ткани, которые активировались в условиях отсутствия адгезионного сигнала на культуру со стороны подложки [5, 9, 18].

На модели роллерного органного культивирования кожи тритона показано, что фракция с рН 1.8–3.0 в СМД оказывает протекторное действие на ткань, которое после 7-суточного культивирования выражалось в поддержании структуры кожи, сохранении покровного эпителия, жизнеспособности и функций клеток желез. На данном сроке культиви-

рования в культурах контрольной серии (без добавления фракций подорожника) обнаруживались явные признаки протекания деструктивных процессов: наблюдали деградацию клеток эпидермиса (рис. 4б). В культурах опытной серий (при добавлении изучаемой фракции супернатанта подорожника) было обнаружено, что многослойный эпителий в составе активно секретируемой слизи покрывал поверхность фрагмента кожи (рис. 4в). На границе эпителия и кориума отмечалось большое количество пигментированных клеток, число которых увеличивалось при неблагоприятных условиях в качестве защитной реакции организма [19]. В кориуме идентифицировали фибробласты, развитую сеть пигментных клеток, недеструктурирующие железы;

состояние было приближено к нативному (рис. 4а, 4в). Фракция подорожника способствовала усиленному процессу образования слизи, и следовательно слушиванию эпителия (рис. 4в). В опытной группе распределение пигмента было равномерным в отличие от контроля, где пигмент был представлен в виде глыбок и плотных скоплений под эпидермисом, что свидетельствует о более неблагоприятных условиях в контрольной среде и нарушении распределения меланофоров в кориуме.

Таким образом, на модели роллерного органотипического культивирования кожи тритона было продемонстрировано выраженное протекторное действие фракции, выделенной из подорожника. Оно заключалось в поддержании структуры ткани кожи, функции желез, а также адгезионных взаимодействий и жизнеспособности клеток. Характер специфической активности, проявляемый фракцией подорожника, аналогичен активности МГТБ животного происхождения. Следует также отметить, что протекторное действие изучаемая фракция проявляла в СМД. Полученные данные свидетельствуют в пользу высказанного предположения о присутствии группы МГТБ в растениях.

Наиболее выраженное протекторное действие изучаемой фракции подорожника продемонстрировано на модели экспериментальной травмы кожи мыши *in vivo*. Через 11 сут 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 — отмечено параллельное эпидермису расположение коллагеновых волокон в виде плотных тяжей (рис. 5а). При обработке раны физиологическим раствором также наблюдали образование соединительно-тканного рубца, однако в центральной части раны отсутствовало полное заживление и реэпителизация, поскольку образовался очаг хронического воспаления. В подкожной ткани практически не наблюдали жировых клеток; волокна коллагена были более рыхлые, чем в дерме (рис. 5б). У мышей опытной группы наблюдали восстановление субэпидермальных слоев (рис. 6). Следует отметить комплексный характер репаративных процессов, протекающий при воздействии изучаемых фракций подорожника, по сравнению с контролем: наблюдали практически полное восстановление эпителия и дермы, в которой были отмечены кровеносные сосуды, а расположение волокон в дерме было более рыхлым, чем в контроле. Помимо этого, при воздействии фракций подорожника в подкожной жировой ткани отмечали интенсивное разрастание жировой ткани и восстановление протоков желез; в контроле на месте повреждения не происходило восстановления жировой ткани, а также не было восстановления протоков потовых желез говорит о возобновлении их активности в дан-

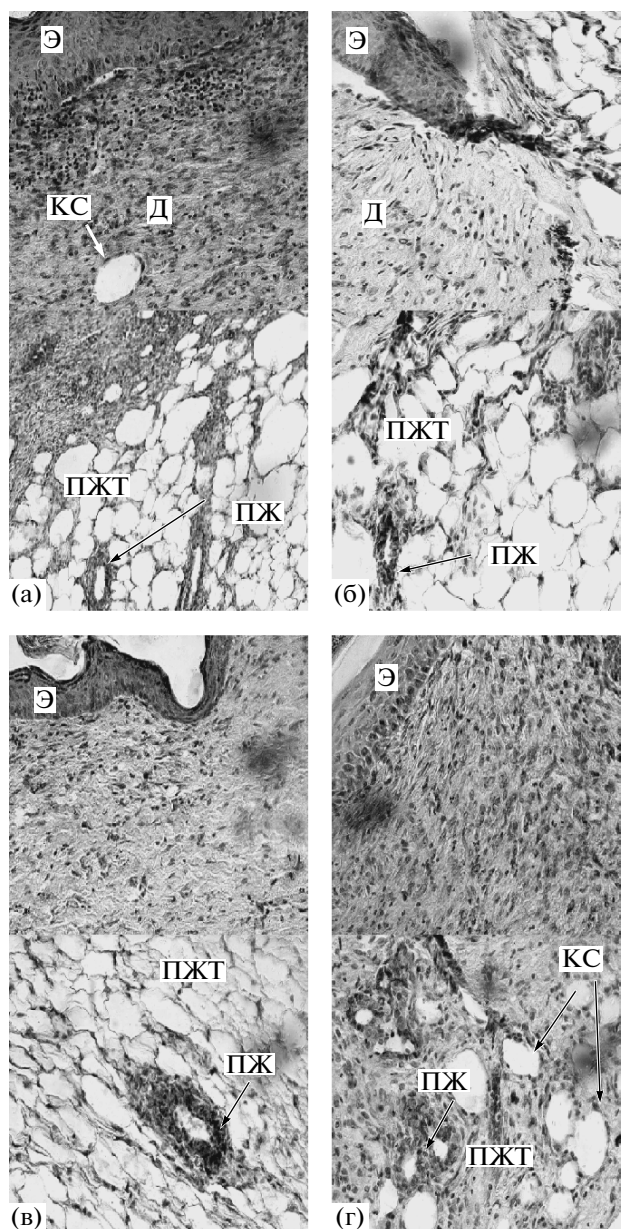


Рис. 6. Влияние различных фракций биорегулятора, выделенных из экстракта подорожника, на ранозаживление кожи мыши через 11 сут после нанесения раны: ИЭФ-фракция с рН 1.8–3.0 (а), ИЭФ-фракция с рН 3.9–4.8 (б), ИЭФ-фракция с рН 8.5–9.5 (в), фракция супернатанта (г). Э – эпидермис, Д – дерма, ПЖТ – подкожная жировая ткань, КС – кровеносные сосуды, ПЖ – протоки желез.

ном участке кожи, а восстановление рыхлой структуры коллагеновых волокон в дерме свидетельствует о появлении эластичности кожи.

Полученные данные показывают, что фракции, выделенные из подорожника, в СМД стимулируют ранозаживление у мышей *in vivo*, способствуя восстановлению нормальной морфологии кожи без образования рубцовой ткани (рис. 6).

В проведенном исследовании впервые было показано, что в тканях подорожника большого присутствуют вещества белковой природы, проявляющие физико-химические свойства, а также биологическую активность *in vitro* и *in vivo*, сходные с МГТБ, выделенными из тканей животных. Следует отметить, что белки, обнаруженные нами в подорожнике большом, проявляли свойственное данному лекарственному растению ранозаживляющее действие. Это обстоятельство позволяет сделать вывод о том, что вещества, входящие в состав изучаемой растительной фракции, ответственны за проявление данным растением лекарственного действия.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мазнев Н.И. Большая энциклопедия здоровья. М.: АСТ, 2008. 896 с.
2. Ямскова В.П., Резникова М.М. // Журн. общей биологии. 1991. Т. 52. № 2. С. 181–191.
3. Ямсков И.А., Ямскова В.П., Даниленко А.Н., Клеменкова З.С., Антипов Б.Г., Черников Ф.Р., Гусынина М.М., Рыбакова Е.Ю. // Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева). 1999. Т. 43. № 5. С. 34–39.
4. Краснов М.С., Григорян Э.Н., Ямскова В.П. // Изв. РАН. Сер. биол. 2003. № 1. С. 22–36.
5. Margasyuk D.V., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Grigoryan E.N., Yamskova V.P., Yamskov I.A. // Biochemical Physics: Frontal Research / Eds. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Nauppauge-N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 49–56.
6. Krasnov M.S., Gurmizov E.P., Yamskova V.P., Yamskov I.A. // Biochemical Physics: Frontal Research / Eds. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Nauppauge-N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 28–37.
7. Borisenko A.V., Yamskova V.P., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Vecherkin V.V., Yamskov I.A. // Biochemical Physics: Frontal Research / Eds. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Nauppauge-N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 38–48.
8. Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., Berezin B.B., Filatova A.G., Blagodatskikh I.V., Yamskov I.A. // Biochemical Physics: Frontal Research / Eds. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Nauppauge-N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 57–67.
9. Маргасюк Д.В., Краснов М.С., Ямсков И.А., Ямскова В.П. // Изв. РАН. Сер. биол. 2008. № 6. P. 736–745.
10. Назарова П.А., Краснов М.С., Ямскова В.П., Ямсков И.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 5. P. 529–533.
11. Ямскова В.П., Рыбакова Е.Ю., Виноградов А.А., Вечеркин В.В., Ямсков И.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 4. С. 407–413.
12. Ямскова В.П., Скрипникова В.С., Молявка А.А., Ильина А.П., Краснов М.С., Маргасюк Д.В., Борисенко А.В., Березин Б.Б., Кузнецова Е.С., Буряк А.К., Ямсков И.А. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 9. P. 1195–1203.
13. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 544 с.
14. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. // Anal. Biochem. 1985. Т. 150. № 5. С. 76–85.
15. Laemmli U.K. // Nature. 1970. Т. 227. № 6. P. 680–685.
16. Hames B.D. Gel Electrophoresis of Proteins. A Practical Approach / Eds. B.D. Hames, D. Rickwood. Oxford: University Press, 1990. 106 p.
17. Энгельгардт Н.В. Иммунохимический анализ. М.: Медицина, 1968. 188 с.
18. Ямскова В.П., Краснов М.С., Маргасюк Д.В., Ямсков И.А. // Изв. РАН. Сер. биол. 2009. № 1. С. 11–17.
19. Frangioni G., Borgioli G., Bianchi S. // Experim. Zool. 2003. Т. 296A. № 4. P. 125–136.

Study of a New Group of Bioregulators Isolated from the Greater Plantain (*Plantago major* L.)

M. S. Krasnov^a, V. P. Yamskova^a, D. V. Margasyuk^b, O. G. Kulikova^b,
A. P. Il'ina^b, E. Yu. Rybakova^a, and I. A. Yamskov^b

^a Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia
e-mail: embrmsk@mail.ru

^b Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 28, Moscow, 119991 Russia
e-mail: yamskov@mail.ru

Received May 12, 2010

Abstract—Proteins with physicochemical properties and biological activity similar to those of membrano-tropic homeostatic tissue-specific bioregulators that had been found earlier in various animal tissues were discovered in leaves of the common plantain (*Plantago major* L.). To study the specific activity of these plant proteins, we developed an experimental model for organotypic roller cultivation of newt (*Pleurodeles waltli*) skin tissue *in vitro*. We showed that the plant proteins of interest exert the wound-healing effect, which is characteristic of this plant, on the skin of vertebrates both *in vitro* and *in vivo*.