



УДК 577.175.722 : 576.311.347 : 582.29

Е.В. Чуркина, Б.М. Кершенгольц, В.В. Шаройко

ЭФФЕКТ ПРЕПАРАТА «ЯГЕЛЬ» ИЗ СЛОЕВИЩ ЛИШАЙНИКА РОДА CLADONIA НА СЕКРЕЦИЮ ИНСУЛИНА

*Институт биологических проблем криолитозоны,
677891, пр. Ленина, 41, тел.: 8(4112)-33-58-12, e-mail: sharoyko@gmail.com, г. Якутск*

Лишайник рода *Cladonia* давно применяется в традиционной медицине. Известны его антиоксидантные, антимикробные и детоксикационные свойства. В состав *Cladonia* входит широкий спектр соединений, таких как аминокислоты, полисахариды, усниновые, орселиновые, леканоровые, гирофоровые и хиастовые кислоты, гидроксинафторхиноны и гидроксидантрахиноновые и другие ароматические пигменты, депсидоны, антранорины, полиненасыщенные жирные кислоты и т.д. [1]. В данной работе нами была изучена способность водно-спиртового экстракта слоевищ лишайника рода *Cladonia*, предварительно обработанных диоксидом углерода в состоянии сверхкритической жидкости — препарат «Ягель» [2], улучшать инсулин-секреторную функцию β -клеток поджелудочной железы.

С этой целью была проведена инкубация β -клеток с препаратом «Ягель» в течение 1, 2, 7, 14, 21 и 30 дн. В каждый из указанных периодов проводилось измерение глюкозостимулированной секреции инсулина. Было обнаружено, что на 21-30 дн. инкубации β -клеток с препаратом «Ягель» происходило увеличение чувствительности β -клеток к глюкозе, что сопровождалось секрецией большего количества инсулина по сравнению с β -клетками, инкубированными без препарата. Увеличение секреции инсулина β -клетками коррелировало с повышением митохондриальной продукции АТФ. Полученные результаты позволяют рекомендовать препарат «Ягель» в качестве дополнительного средства для нормализации уровня глюкозы у пациентов с сахарным диабетом второго типа (СД2).

Материалы и методы

β -клетки линии INS-1 (клон 832/13) культивировались в инкубаторе при 37°C во влажной атмосфере воздуха

95% и с концентрацией CO₂ 5%, в среде RPMI1640. Среда RPMI1640 содержала 11,1 мМ D-глюкозы, 10% эмбриональной сыворотки телят, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 10 мМ L-глутамин, 1 мМ пирувата натрия, 10 мМ HEPES и 50 мкМ β -меркаптоэтанол [3]. При достижении плотности 80-90% β -клетки трипсинизировались смесью 0,1% трипсина и 0,02% EDTA и затем высевались в 24-луночные планшеты за 48 ч до проведения эксперимента. Для измерения секреции инсулина клетки в течение 2 ч инкубировались в буфере, содержащем 114 мМ NaCl; 4,7 мМ KCl; 1,2 мМ KH₂PO₄; 1,16 мМ MgSO₄; 20 мМ HEPES; 2,5 мМ CaCl₂; 25,5 мМ NaHCO₃; 0,2% бычьего сывороточного альбумина; pH 7,2 и 2,8 мМ глюкозы. Затем добавлялся буфер того же состава, содержащий 2,8 или 16,7 мМ глюкозы, для измерения глюкозостимулированной секреции инсулина в течение 1 ч. После окончания инкубационного периода супернатанты использовались для измерения инсулина, а β -клетки лизировались для измерения содержания общего белка и АТФ. Использовался лизис-буфер следующего состава: 200 мМ NaCl; 2 мМ ЭДТА; 50 мМ трис-HCl pH 7,4; 1% Triton X-100. Концентрация инсулина в супернатантах измерялась радиоиммунным методом с использованием набора реактивов Coat-a-Count (DPC, США) [3]. Концентрация общего белка измерялась бициноновым методом с применением набора реактивов фирмы «ThermoScientific» (США). Концентрация АТФ измерялась люциферазным методом с использованием люциферазы светляков [4]. Измерения проводились в трех повторностях на планшетном люцинометре «TECAN Infinite M200» в 96-луночных планшетах.

Выделение и очистка РНК осуществлялись с использованием набора реактивов Qiagen RNeasy RNA purification

kit («Hilden», Germany). Обратная транскрипция проводилась с использованием набора Fermentas Rever-tAid™ First-Strand cDNA synthesis kit («Vilnius», Lithuania).

Для ПЦР использовалось 10 нг кДНК и TaqMan ПЦР смесь (AmpliTaq Gold DNA Polymerase, Passive Reference 1, buffer, dNTPs, AmpErase UNG). ПЦР-анализ в режиме реального времени проводился на ПЦР-машине модели на 7900HT (Applied Biosystems). Ct-значения вычислялись с помощью программного обеспечения ABI PRISM (Applied Biosystems), а относительный уровень экспрессии мРНК вычислялся как разность (ΔCt) целевого гена и референсного гена. Экспрессия мРНК количественно сравнивалась путем расчета величины $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Для измерения выживаемости β -клеток использовался реагент MTS — внутренняя соль 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбосиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2H-тетразолия, CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay («Promega», США) [5].

Для получения препарата «Ягель» слоевища лишайника *Cladonia* предварительно обрабатывали диоксидом углерода в состоянии сверхкритической жидкости (рис. 1А; давление 80 атм.; температура 36°C) в специализированной проточной установке (рис. 1Б) в течение 15 ч для гидролиза водой, содержащейся в тканях слоевищ и активированной (CO_2)^{сверхкритич.} части β -гликозидных связей в лишайниковых β -полисахаридах с образованием активного вещества БАД «Ягель» — β -полигосахаридов (рис. 2) [6, 7]. Полученную твердофазную субстанцию экстрагировали водно-спиртовой смесью (1:1) в соотношении: 2 части сухой массы к 8 частям экстрагента. Экстракция проводилась в течение 14 дн. в темном месте. Полученный экстракт фильтровался через фильтр с размером пор 20 мкм. Статистическая обработка данных проводилась с вычислением t-критерия Стьюдента и использованием пакета программ Sigma Plot для Windows (версия 7.1016 SPSS, INC), Statistica (версия 5.0, Statsoft, Inc). Результаты представлены как среднее \pm доверительный интервал среднего для указанного числа экспериментов. Достоверность полученных результатов оценивали с использованием соответствующих статистических коэффициентов при уровне значимости тестируемой гипотезы $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Нами была изучена способность препарата «Ягель» улучшать инсулинсекреторную функцию β -клеток. В эксперименте β -клетки культивировались в стандартной среде RPMI1640 в присутствии препарата (разведение

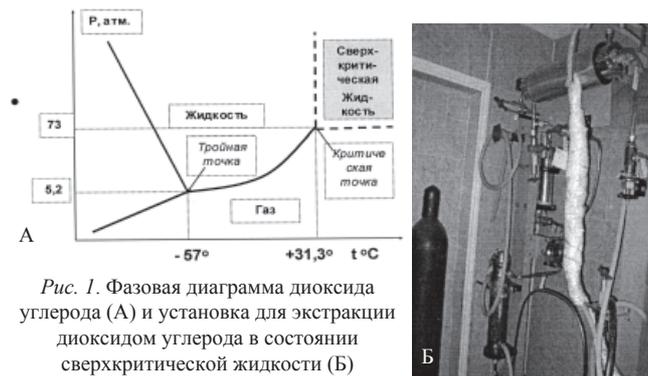


Рис. 1. Фазовая диаграмма диоксида углерода (А) и установка для экстракции диоксидом углерода в состоянии сверхкритической жидкости (Б)

Резюме

Изучено влияние введения в инкубационную среду препарата «Ягель», получаемого из слоевищ лишайника *Cladonia* по биотехнологии обработки диоксидом углерода в состоянии сверхкритической жидкости, на секрецию инсулина β -клетками. Установлено, что 21-30-дневная инкубация β -клеток с препаратом «Ягель» приводит к увеличению глюкозостимулированной секреции инсулина на 50-90%. Эффект сопровождается увеличением митохондриальной продукции АТФ. Полученные результаты позволяют рекомендовать препарат «Ягель» в качестве дополнительного средства для нормализации уровня глюкозы у пациентов с сахарным диабетом второго типа.

Ключевые слова: β -клетки, *Cladonia*, секреция инсулина, АТФ.

E.V. Churkina, B.M. Kershengoltz V.V. Sharoyko

EFFECT OF THE SPECIMEN «JAGEL» FROM THE LICHEN GENUS THALLI OF CLADONIA ON THE INSULIN SECRETION

The Institute of biological problems of cryolithozone, Yakutsk

Summary

We have studied the effect of the presence in the incubation medium of specimen «Jagel» on the insulin secretion in β -cells. The specimen «Jagel» was obtained from thalli of the lichen *Cladonia* by biotechnological processing using carbon dioxide in a supercritical fluid state. We have shown that 21-30-day incubation of p-cells with «Jagel» leads to 50-90% increase in glucose-stimulated insulin secretion. Effect is accompanied by an increase in mitochondrial ATP production. The results obtained allow us to recommend the specimen «Jagel» as an additional measure to normalize glucose level in the patients with type two diabetes.

Key words: β -cells, *Cladonia*, insulin secretion, ATP.

1:100) в течение 1; 2; 7; 14; 21 и 30 дн. После указанных сроков инкубации β -клеток измерялась их инсулинсекреторная активность в присутствии 2,8 и 16,7 мМ глюкозы (рис. 3). Следует отметить, что в условиях *in vitro* для β -клеток 2,8 мМ концентрация глюкозы считается оптимальной для поддержания базального уровня секреции инсулина, а 16,7 мМ — оптимальной для стимуляции секреции инсулина.

Как видно из рис. 3Б, на 21 и 30 дн. инкубации с экстрактом наблюдается статистически достоверное

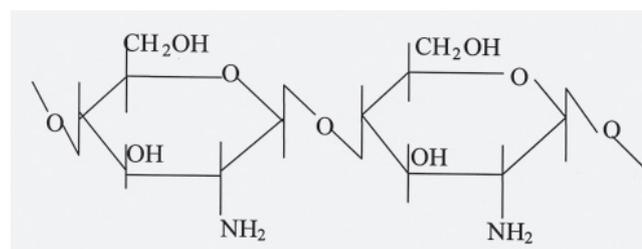


Рис. 2. Фрагмент структуры лишайниковых аминок- β -олигосахаридов — активного вещества препарата «Ягель»

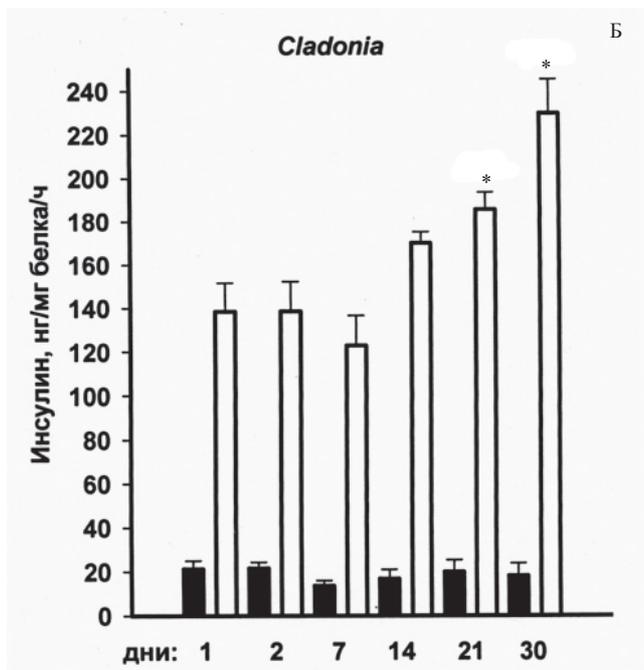
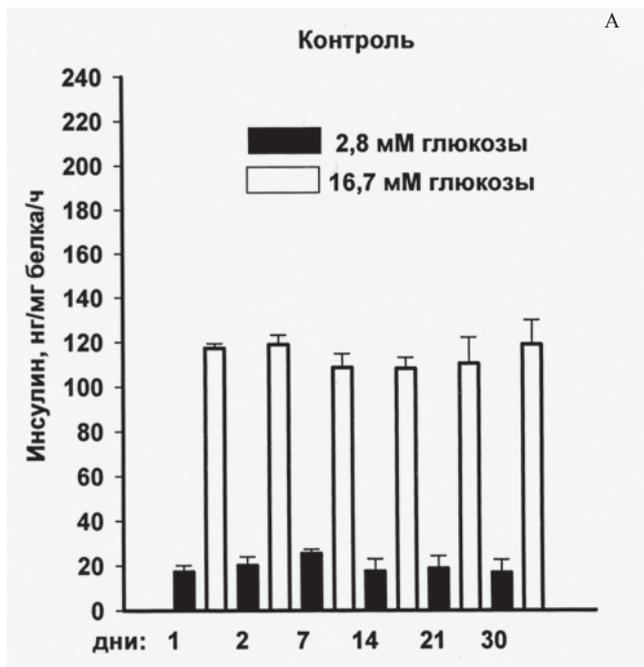


Рис. 3. Секреция инсулина β-клетками 832/13 в разные периоды инкубации с препаратом «Ягель». Клетки стимулировали глюкозой в концентрации 2,8 и 16,7 мМ в течение 1 ч, n=3; * — p<0,01 по сравнению с клетками, культивируемыми без экстракта

увеличение секреции инсулина с 118 ± 4 до 230 ± 10 нг инсулина/ч/мг белка по сравнению с контрольными клетками ($p < 0,01$). При этом секреция инсулина при действии 2,8 мМ глюкозы остается практически одинаковой, что свидетельствует о нетоксичности компонентов препарата «Ягель». Для Р-клеток характерным признаком токсического воздействия является нарушение целостности мембраны и «утечка» инсулина в инкубационную среду даже при базальной концентрации глюкозы. Необходимо отметить, что компоненты препарата не вызвали гибели β-клеток, что было подтверждено MTS-тестом на выживаемость (рис. 4).

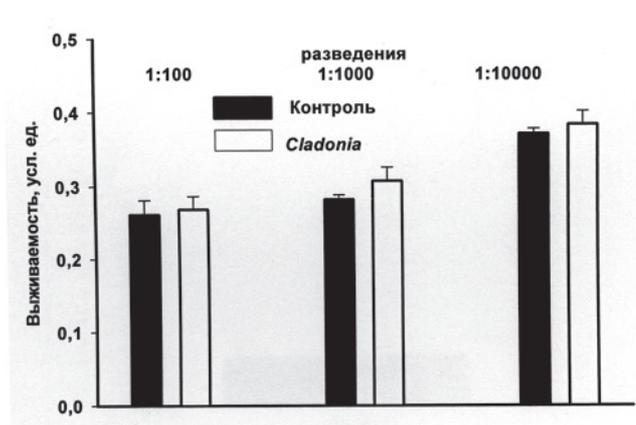


Рис. 4. Выживаемость β-клеток крыс «инсулома INS-1 832/13 PD64». Клетки культивированы 48 ч в комплексной среде RPMI1640

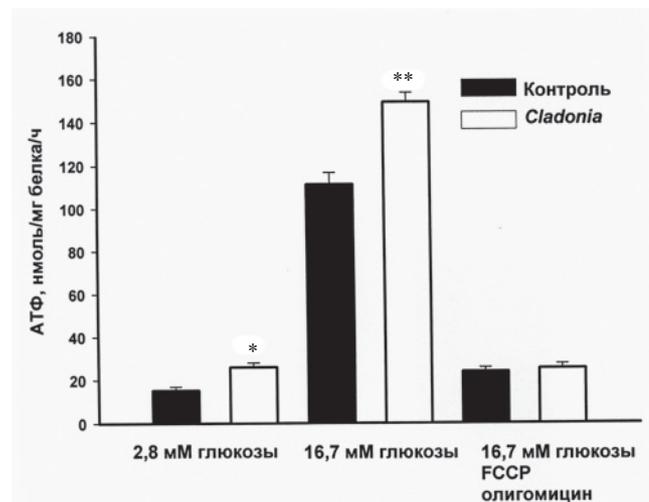


Рис. 5. Накопление АТФ в β-клетках 832/13 через 30 дн. после инкубации с препаратом «Ягель». Клетки стимулировали глюкозой в концентрации 2,8 и 16,7 мМ в течение 1 ч, n=3; * — p<0,05 по сравнению с клетками, культивируемыми без препарата, стимуляция 2,8 мМ глюкозы; ** — p<0,01 по сравнению с клетками, культивируемыми без препарата, стимуляция 16,7 мМ глюкозы

Для выяснения возможного механизма действия экстракта Cladonia нами было измерено накопление АТФ в β-клетках. Как видно из рис. 5, при этом отмечалось повышение общего уровня АТФ в β-клетках, инкубированных с препаратом «Ягель» в течение 30 дн., в ходе 1 ч стимуляции с 16,7 мМ глюкозы ($111,3 \pm 5,4$ и $149,3 \pm 7,5$ нмоль/ч/мг белка соответственно; $p < 0,01$). Общее содержание АТФ в присутствии разобщителя окислительного фосфорилирования — 40 мкМ карбонилцианидтрифторметоксифенилгидразона (FCCP) и ингибитора АТФ-синтазы — 4 мкг/мл олигомицина было сравнимым в контрольных β-клетках и β-клетках, культивируемых с экстрактом ($25,9 \pm 2,0$ и $23,8 \pm 1,9$ нмоль/ч/мг белка соответственно). Это свидетельствует о том, что разница в содержании АТФ обусловлена именно повышением митохондриальной продукции АТФ в β-клетках. Таким образом, одним из возможных механизмов инсулиотропного действия экстракта из слоевищ лишайника Cladonia является активация метаболизма в митохондриях, приводящая к повышению уровня АТФ — ключевой молекулы в процессе биосинтеза и секреции инсулина.

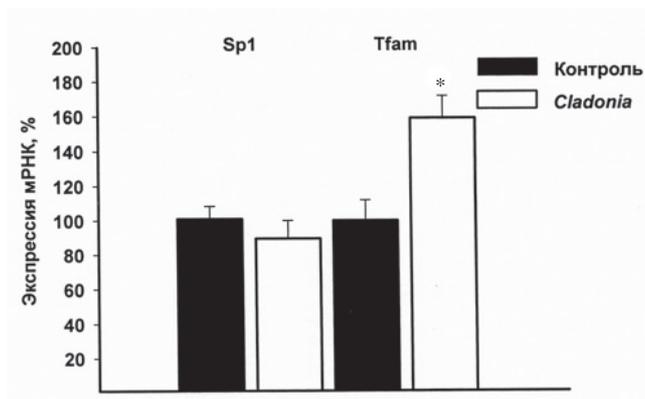


Рис. 6. Уровень факторов транскрипции митохондрий Sp1 и Tfam после 30-дневного инкубирования β-клеток в присутствии препарата «Ягель»

Показано также, что после 30-дневного инкубирования β-клеток в присутствии препарата «Ягель» повышается экспрессия фактора транскрипции митохондрии Tfam (рис. 6). Tfam является ключевым активатором процесса транскрипции в митохондрии и также участвует в процессе репликации митохондриального генома [8].

Полученные *in vitro* результаты хорошо согласуются с результатами клинических испытаний. Предварительные испытания у больных, страдающих СД2 (n=98), показали, что в результате 3-4-недельного приема препарата «Ягель» уровень глюкозы крови снижался с 12,4±14,6 до 6,4±8,3 мМ. Наиболее значимым показателем в отношении снижения уровня сосудистых осложнений СД2 явилось уменьшение на 17,5±37,4% содержания гликозилированного гемоглобина при одновременном снижении уровня липопротеидов низкой плотности на 18±37%. При этом доля больных, находящихся в негативных неспецифических адаптивных реакциях (НАР), уменьшилась с 19,5% до 0, а находящихся в позитивных НАР увеличилась с 47,2 до 71,7% (неопубликованные данные).

По-видимому, выявленный механизм — причина достоверно регистрируемого повышения качества жизни (уровня физической и умственной работоспособности, уменьшения утомляемости и т.д.) больных СД2 после 3-4-недельного приема препарата «Ягель».

Л и т е р а т у р а

1. Телятьев В.В. Полезные растения Центральной Сибири. - Иркутск: Восточно-Сибирское кн. изд-во, 1987. - 400 с.
 2. Свидетельство о государственной регистрации БАД «Ягель» Роспотребнадзором РФ №77.99.23.3.У.3522.5.08 от 04.05.2008.
 3. Шаройко В.В., Чуркин В.А., Кершенгольц Б.М. Усиление гликолиза и подавление митохондриального метаболизма приводит к утрате глюкозостимулированной секреции инсулина в β-клетках // Сибирский мед. журнал. - 2010. - №5. - С. 90-92.
 4. Wibom R., Hagenfeldt L., von Döbeln U. Measurement of ATP production and respiratory chain enzyme activities in mitochondria isolated from small muscle biopsy samples // Analytical biochemistry. - 2002. - Vol. 311. - P. 139-151.
 5. Zaitseva I.I., Sharoyko V., Sterling J. et al. RX871024 reduces NO production but does not protect against pancreatic beta-cell death induced by proinflammatory cytokines // Biochemical and biophysical research communications. - 2006. - Vol. 347. - P. 1121-1128.
 6. Кершенгольц Б.М., Журавская А.Н., Ремигайло П.А. и др. Патент РФ №2318407 от 10.03.2008 (приоритет от 10.01.2006).
 7. Кершенгольц Б.М., Журавская А.Н., Хлебный Е.С. и др. Биопрепараты из природного арктического биосырья в сохранении здоровья населения в условиях изменений климата // Экология человека. - 2010. - №3. - С. 8-15.
 8. Tiranti V., Rossi E., Ruiz-Carrillo A., Rossi G. et al. Chromosomal localization of mitochondrial transcription factor A (TCF6), single-stranded DNA-binding protein (SSBP), and endonuclease G (ENDOG), three human housekeeping genes involved in mitochondrial biogenesis // Genomics. - 1995. - Vol. 25(2). - P. 559-64.
- Координаты для связи с авторами:** Чуркина Елена Владимировна — канд. мед. наук, Медицинский институт Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова, тел.: 8(4112)-34-04-29, e-mail: alena341426@yandex.ru; Кершенгольц Борис Моисеевич — доктор биол. наук, профессор, зав. лабораторией экологической и мед. биохимии, биотехнологии и радиобиологии, зам. директора по науке ИБПК СО РАН, тел.: 8(4112)-33-58-12, e-mail: kerschen@mail.ru; Шаройко Владимир Владимирович — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории экологической и мед. биохимии, биотехнологии и радиобиологии ИБПК СО РАН, тел.: 8(4112)-33-58-12, e-mail: sharoyko@gmail.com.

