

УДК 577.152.1

©Коллектив авторов

СТИМУЛЯЦИЯ ПОГЛОЩЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ КЛЕТКАМИ РС 12 И L 929 ЭКСТРАКТОМ ИЗ ЛИСТЬЕВ *ARONIA MELANOCARPA*.

Д.Л. Маслов, Т.В. Прозоровский, О.М. Ипатова, О.Ю. Абакумова, Т.А. Цветкова,
В.Н. Прозоровский.

ГУ НИИ Биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119992, Москва, ул.
Погодинская, д.10; факс (095) 245-0857.

Исследование влияния экстракта из листьев *Aronia melanocarpa*, основным компонентом которого являются лейкоантоцианидины, на поглощение глюкозы клетками РС 12 (феохромоцитомы крысы) и L 929 (фибробластоподобные клетки саркомы мышей) показало, что данный экстракт достоверно и дозозависимо стимулирует поглощение глюкозы культивируемыми клетками.

Ключевые слова: *Aronia melanocarpa*, экстракт листьев, лейкоанто-цианидины, глюкоза, феохромоцитома, фибробластоподобные клетки.

ВВЕДЕНИЕ. Исследования, направленные на выявление веществ (синтезированных или выделенных из растительного материала), обладающих гипогликемическим действием, до настоящего времени являются актуальными [1].

Еще до открытия в 1922 году инсулина нетрадиционная медицина многих стран мира для нормализации концентрации глюкозы в крови применяла всевозможные экстракты из различных растений. К настоящему времени известно более 150 экстрактов, обладающих гипогликемическим действием. Однако большинство работ, посвященных изучению экстрактов, ограничиваются лишь констатацией изменения (уменьшения) уровня глюкозы в крови опытных животных. Анализ немногочисленных работ, посвященных исследованию механизма гипогликемического действия экстракта, показал, что предполагаемые механизмы можно разделить на несколько групп:

- уменьшение поглощения глюкозы в желудочно-кишечном тракте [2,3];
- стимулирование секреции инсулина поджелудочной железой [4,5];
- увеличение поглощения глюкозы клетками посредством стимуляции процессов утилизации глюкозы [6,7].

Обычно описывают действие экстракта в целом без уточнения принципов действия отдельных веществ и соединений, входящих в его состав. Очевидно, этим можно объяснить возникающее сочетание нескольких механизмов действия одного и того же экстракта [8].

Ряд исследователей прямо указывает на способность представителей некоторых групп флавоноидов, включая сюда и лейкоантоцианидины, способствовать снижению уровня глюкозы в крови [9-12]. Косвенным подтверждением может служить рекомендация народной медицины использовать для этой цели экстракты листьев черники, черной смородины и клюквы, в которых присутствуют лейкоантоцианидины [13].

В настоящей работе исследовали влияние экстракта из листьев *Aronia melanocarpa* (ЭЛАЧ), основным компонентом которого являются лейкоантоцианидины, на стимуляцию поглощения глюкозы клетками феохромоцитомы крысы РС 12 и фибробластоподобными

клетками саркомы мышей L 929.

МЕТОДИКА. Экстракт из листьев *Aronia melanocarpa* получен в соответствии с техническими условиями ТУ 9317-009-01897373-99. ("Экстракт аронии сухой", регистрационное удостоверение N 001173.P.643.12.99.)

Основными компонентами экстракта являются лейкоантоцианидины (порядка 65%) и флавоноловые гликозиды кверцетинового ряда (порядка 12%).

Культура клеток. Клетки PC12 (феохромоцитома крысы) и L929 (фибробласто-подобные клетки саркомы мышей) культивировали в 48-ми луночных планшетах при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), гентамицина (50 мкг/мл). Через три дня после пассирования клетки промывали раствором Эрла и меняли ростовую среду на среду RPMI-1640 с 0,5% ЭТС. Подсчет количества клеток осуществляли после их окраски кристалл-виолетом на приборе Dombi Plate (Россия) при длине волны 540 нм. Для подсчета клеток использовали экспериментально полученный коэффициент - 0,1 единица поглощения при 540 нм соответствует 32,5 x 10³ клеток [14].

Изучение токсичности ЭЛАЧ на культуре клеток L929. В каждую лунку (48-ми луночная плашка, клетки L929) добавляли 50 мкл раствора, содержащего 25 мг ЭЛАЧ /мл. В контрольные лунки было добавлено по 50 мкл раствора Хенкса. После этого клетки инкубировали еще сутки. Подсчет количества клеток проводили после их окраски кристалл-виолетом на приборе Dombi Plate (Россия) при длине волны 540 нм.

Для введения флуоресцентной метки в молекулу инсулина 20 мг флуорескамина ("Sigma", США) растворяли в 100 мл предварительно обезвоженного ацетона. Следующим шагом было растворение 4,6 мг кристаллического инсулина ("Monotard", Дания) в 10 мл 0,5 М натрий-боратного буфера (рН 8.5) и добавление к нему 1.5 мл раствора флуорескамина (смесь инкубировали в течение 10 минут при постоянном перемешивании) [15]. В результате был получен инсулин, меченный флуорескаминол (длина волны возбуждения 390 нм, длина эмиссии 475 нм). Очистка от не прореагировавших компонентов осуществлена при помощи геля хроматографии (сефадекс LH-20, длина колонки 15 см, диаметр 3 см) на приборе Gilson Medical Electronics (США).

Исследование взаимодействия инсулина, меченного флуоресцентной меткой, с рецептором инсулина клеток PC12.

В часть лунок 48-ми луночной плашки, предварительно охлажденной до 4°C, вносили по 50 мкл раствора, содержащего 150 нмоль инсулина, меченного флуоресцентной меткой (флуорескамин) и 50 мкл среды Хенкса (суммарный объем 100 мкл/лунка). В оставшуюся часть лунок было одновременно внесено 50 мкл раствора, содержащего 150 нмоль инсулина и 50 мкл раствора ЭЛАЧ (25 мг/мл) (суммарный объем 100 мкл/лунка). Среднее количество клеток (PC12) на лунку составляло порядка 1x10⁵. Инкубацию проводили в течение 0,5 часа при 4°C, что позволяло избежать интернализации рецептора, связавшегося с инсулином [16]. Для удаления инсулина, неспецифически связавшегося с поверхностью клеток, клеточный монослой по окончании инкубации промывали 7 раз ледяным раствором Эрла. Затем клетки лизировали раствором Эрла, содержащем 3% тритон X-100. ("Serva", Германия). Лизаты клеток флуорометрировали при длине волны возбуждения 390 нм и длине волны эмиссии 475 нм [17, 18] на спектрофлуориметре Luminescence Spectrometer LS 50B. Для расчета количества молей инсулина, связавшихся с рецептором, использовали стандартный раствор инсулина, меченного флуоресцентной меткой.

Исследование влияния экстракта на стимуляцию поглощения глюкозы клетками PC12 и L929. Ростовую среду ДМЕМ с добавками заменяли на глюкозодефицитную среду DPBS, содержащую фосфатный буфер рН 7.4, аминокислоты, витамины, антибиотики. Через 24 часа в опытные лунки вносили по 50 мкл раствора, содержащего 0,5, 1 или 5 мг экстракта/мл. В другие лунки вносили по 50 мкл раствора инсулина (0,05 мг/мл). В контрольные лунки вносилось по 50 мкл раствора Хенкса. Инкубировали в течение 3 часов при температуре 37°C. Затем добавляли 15 мкл [¹⁴C] глюкозы ("Изотоп", Россия, 0,5 мкюри/мл) и инкубировали 10 минут. После инкубации среду удаляли, клетки несколько раз промывали холодным раствором Эрла, лизировали 0,2 мл КОН (0,6 н) при 37°C в

СТИМУЛЯЦИЯ ПОГЛОЩЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ КЛЕТКАМИ

течение ночи, лизат нейтрализовали 50 мкл HClO_4 (1 н). Радиоактивность проб измеряли стандартным методом на сцинтиляционном счетчике Rackbeta\219 (LKB, Швеция) после добавления 1 мл жидкости Брея [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты экспериментов показали, что вещества, входящие в состав экстракта (доминирующими компонентами которого являются лейкоантоцианидины), обладают способностью взаимодействовать с рецептором инсулина (хотя и в меньшей степени, чем сам инсулин). Совместное добавление к клеткам PC12 инсулина (меченного флуоресцентной меткой) и экстракта привело к уменьшению количества связавшегося с рецептором инсулина. Контролем служили результаты, полученные при добавлении в тех же условиях одного инсулина (рис. 1). Исходя из полученных результатов, можно предположить, что инсулин и лейкоантоцианидины, являющиеся основным компонентом экстракта, конкурируют между собой за взаимодействие с рецептором инсулина.

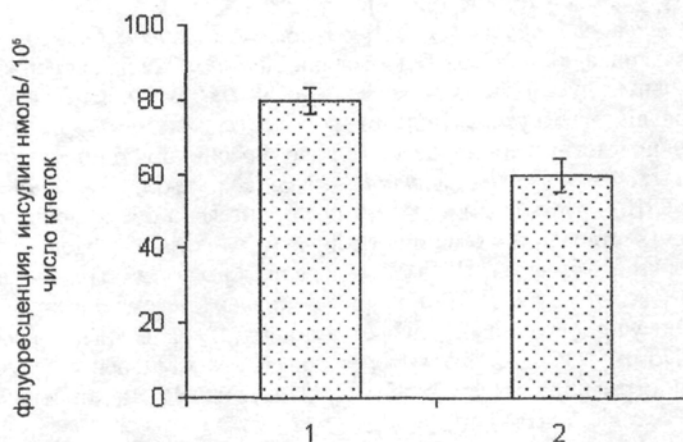


Рисунок 1.

Исследование взаимодействия инсулина, меченного флуоресцентной меткой (флуорескамин) с рецептором инсулина клеток PC12 (1), и при совместной добавлении с ЭЛАЧ (2). Флуоресценция инсулина (меченного флуорескамино), инкубированного в течении 30 минут при 4°C с клетками PC12 (1) и флуоресценция инсулина (меченного флуоресцентной меткой) инкубированного совместно с раствором ЭЛАЧ (2).

Добавление экстракта к культурам клеток L929 и PC12 достоверно и дозозависимо увеличивает поглощение [^{14}C] глюкозы клетками (рис. 2 и 3). Результаты выражены в процентах к контролю и являются средними значениями, полученными на 4-5 лунках в двух аналогичных экспериментах. Статистическая достоверность результатов, представленных на рисунках, рассчитана с использованием t-теста по Стьюденту.

Таким образом, полученный из листьев *Aronia melanocarpa* экстракт является новым средством небелковой природы, способным не только взаимодействовать с рецептором инсулина, но и стимулировать поглощение глюкозы клетками PC12 и L 929.

Анализ литературных данных позволяет выдвинуть несколько предположений о возможных механизмах действия лейкоантоцианидинов, приводящих к усилению поглощения глюкозы клетками.

Известно, что лейкоантоцианидины являются ингибиторами большого числа ферментов [20]. Возможно, они так же участвуют в ингибировании некоторых ферментов, принимающих участие в передаче сигнала или метаболизме глюкозы. Примером такого рода ферментов могут служить фосфотирозинфосфатазы, дефосфорилирующие остатки фосфотирозина в белках, играющих ключевую роль в передаче гормонального сигнала [21]. Другим примером может служить $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза, снижение активности которой приводит к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , что имитирует действие инсулина на такие процессы, как транспорт глюкозы и ее метаболизм [22].

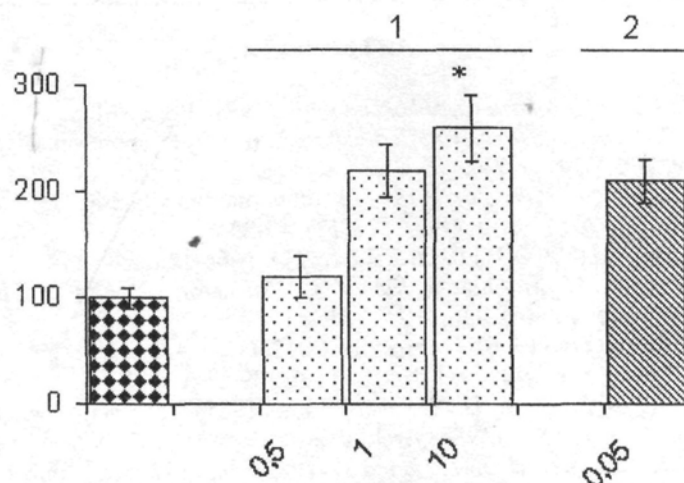


Рисунок 2.

Исследование влияния инсулина и ЭЛАЧ на стимуляцию поглощения [14 C] глюкозы клетками PC12. 1. экстракт; 2. инсулин. *) -P<0,05. Количество клеток в среднем составляло порядка 1×10^5 на лунку.

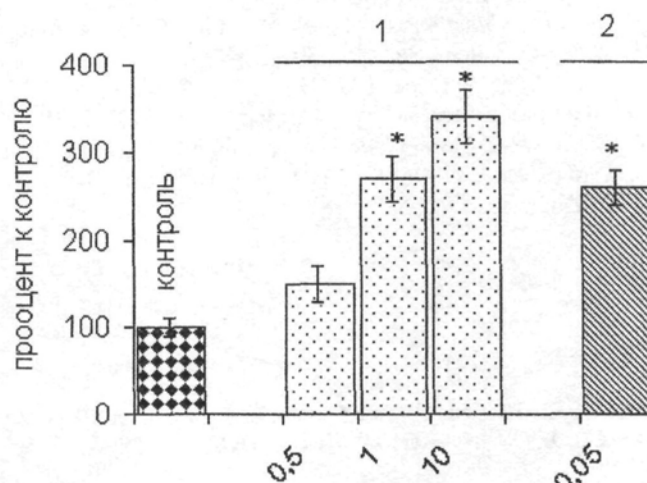


Рисунок 3.

Исследование влияния ЭЛАЧ и инсулина на поглощение [14 C] глюкозы клетками L 929. 1. экстракт; 2. инсулин. *) -P<0,05. Количество клеток в среднем составляло порядка $1,2 \times 10^5$ на лунку.

В настоящее время инсулин остается необходимым средством для больных диабетом I типа, а также для многих больных диабетом II типа.

Перспективным может оказаться применение данного экстракта или его более очищенных форм из листьев *Aronia melanocarpa* в качестве дополнительного средства при инъекциях инсулина людям, страдающим инсулин-зависимой формой диабета. Кроме уменьшения числа инъекций, увеличения временного промежутка между ними, это поможет снять побочные явления, возникающие при гормон-заместительной терапии, например, в случае возникновения аутоиммунных заболеваний, вызванных введением чужеродного белка (в данном случае нечеловеческого инсулина) в организм. Использование экстракта из листьев *Aronia melanocarpa*, возможно, снимет остроту этой проблемы, а уменьшение количества вводимого инсулина замедлит процесс атрофии эндокринных клеток, неизменно возникающий при гормон-замещающей терапии. К преимуществу использования данного экстракта можно отнести и относительно дешевый способ его получения.

ЛИТЕРАТУРА.

1. *Jae Sue Choi, Takako Yokozawa, Hikokichi Oura* (1991) *Planta Med.*, **57**(3), 208-211.
2. *Higashino H., Suzuki A., Tanaka Y., Pootakham K.* (1992) *Nippon Yakurigaku Zasshi Nov.*, **100**(5), 415-421.
3. *Perfumi M., Arnold N., Tacconi R.* (1991) *J. Ethnopharmacol.*, **34**(2-3), 135-140.
4. *Cray A.M., Flatt P.R.* (1998) *J. Nutr.*, **128**(12), 19-23.
5. *Page T., Bailey C.J.* (1997) *J. Pharmacol.*, **122**(7), 1464-1468.
6. *Sarkar S., Pranava M., Marinata R., Kumar G.P., Sudheesh S., Vijayalakshmi N.R.* (1993), *Planta Med.*, **59**(4), 330-332.
7. *Sarkar S., Marinata R.* (1996) *Pharmacol. Res.*, **33**(1), 1-4.
8. *Cray A.M., Flatt P.R.* (1998) *Br. J. Nutr.*, **80**(1), 109-114.
9. *Ковалев В.Н., Комиссаренко Н.Ф., Халеева Л.Д.* (1985) *Хим.-фарм. ж.*, **1**, 51-54.
10. *Ammar N.M., Al-Okbo S.Y.* (1988) *Arch. Pharm. Res.*, **11**, 166-168.
11. *Alb-El-Wahab S.M., Wassel G.M., Hanna T.* (1987) *Herba Hungar.*, **26**, 27-35.
12. *Mensah I.A., Munenge R.W.* (1989) *Fitoterapia, LX*, 359-362.
13. *Graham H.N.* (1992) *Prev. Med.*, **21**, 334-350.
14. *Medvedev A.E., Fuchs B.B., Rankhmilevich A.L.* (1990) *Biomedical Science*, **1**, 261-266.
15. *Lai C.Y.* (1977) *Meth. Enzymol.*, **47**, 236-243.
16. *Vertut-Doi A., Ishiwata H., Miyajima K.* (1996), *Biochim. Biophys. Acta*, **1278**(1), 19-28.
17. *Weigle M.* (1972) *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 5927.
18. *Udenfriend S., et. al.* (1972), *Science*, **178**, 871.
19. *Weitzel G.* (1971) *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, **352**, 1735-1738.
20. *Miyagi Y., Miwa K., Inoue H.* (1997), *Am. J. Cardiol.*, **80**(12), 1627-1631.
21. *Sekar N., Li J. and Shechter Y.* (1996) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **31**, 339-359.
22. *Shechter Y.* (1990) *Diabetes*, **39**, 1-5.

Поступила 17.04.01.

THE STIMULATION OF GLUCOSE UPTAKE BY CELLS PC 12 AND L 929 WITH THE EXTRACT FROM ARONIA MELANOCARPA LEAVES.

D.L. Maslov, T.V. Prozorovskiy, O.Yu. Abakumova, T.A. Tsvetkova, V.N. Prozorovskiy.

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS, 119992, Moscow, Pogodinskaya Street 10,
Fax (095)2450857

The ability of extract from *Aronia melanocarpa* leaves to increase glucose uptake was investigated. It was shown, that the extract stimulated glucose uptake by cells PC12 and L 929 at the concentration close to native insulin.

Key words: *Aronia melanocarpa*, extract, leucoanthocyanidin, glucose uptake.