

Литература

1. Smithies O. Zone electrophoresis in starch gels/O. Smithies // Biochemistry Journal. –1955. – V. 61. – P. 629–641.
2. Gahne B. Studies on the inheritance of transferrins, albumins, prealbumins and plasma esterases of horse / B. Gahne // Genetics. – 1966. – V. 53, №4. – P. 680–694.
3. Дубровская Р.М. Методические рекомендации по использованию полиморфных систем белков и групп крови при контроле достоверности происхождения лошадей / Р.М. Дубровская, И.М. Стародумов. – М.: ВНИИК, 1986. – 39 с.
4. Вейр Б.С. Анализ генетических данных / Б.С. Вейр. – М., 1995. – 400 с.
5. Меркурьева Е.К. Генетические основы селекции в скотоводстве / Е.К. Меркурьева. – М.: Колос, 1977. – 240 с.
6. Гурьев И.П. Зоотехнические и иммуногенетические особенности популяции якутской лошади: автореф. дис. ... к.с.-х.н. – М.: ВНИИК, 1992. – 24 с.
7. Алексеев Н.Д. Лошадь якутской породы: внутрипородные типы, хозяйственные и биологические особенности / Н.Д. Алексеев, Н.П. Степанов. – Достижения науки и техники АПК [Текст] : теор. и науч.-практ. журн / М-во с.-х. Рос. Федерации. – М.: ООО «Ред. журн. «Достижения науки и техники АПК», 2006. – С.8–10.

Поступила в редакцию 04.06.2014

УДК 616.44:582.29

Лишайниковые β-олигосахариды в коррекции метаболических нарушений при сахарном диабете 2-го типа

Б.М. Кершенгольц, Л.А. Сыдыкова, В.В. Шаройко

Показано, что пролонгированная инкубация (3–4 недели) клональных β-клеток инсулиномы крысы в среде RPMI1640, содержащей биологически активную добавку (БАД) «Ягель», получаемую из слоевищ лишайников рода *Cladonia* по биотехнологии обработки диоксидом углерода в состоянии сверхкритического флюида (активное вещество – лишайниковые β-олигосахариды), приводит к увеличению глюкозостимулированной секреции инсулина на 50–90%. Механизмы – увеличение митохондриальной продукции АТФ и, вероятно, модификация лишайниковыми β-олигосахаридами гликокаликса плазмалеммы β-клеток, которая способствует увеличению экзоцитоза инсулина. Результаты клинических испытаний показали, что 4-недельный прием БАД «Ягель» пациентами с сахарным диабетом 2-го типа (СД2) приводит к снижению концентрации глюкозы крови в 1,4÷2,3 раза (в контрольной группе – в 1,1÷1,2 раза), содержания гликозилированного гемоглобина – с 9,5÷10,8% до 7,4÷8,5% (в контрольной группе – на 0,5÷0,7%) при одновременном снижении доли липопротеидов низкой плотности на 18÷37%. Пациенты экспериментальной и контрольной (вместо БАД «Ягель» получали плацебо) групп находились на схожей таблетированной сахароснижающей терапии (рандомизировались по лечению), которая не корректировалась. Полученные результаты позволяют рекомендовать БАД «Ягель» в качестве дополнительного средства для нормализации концентрации глюкозы крови у пациентов с СД2. В Гематологическом научном центре РАМН (г. Москва) была показана антитромбинная активность БАД «Ягель», поэтому, основываясь на полученных результатах, можно рекомендовать БАД «Ягель» для профилактики и купирования последствий сосудистых патологий, включая инсульты и инфаркт миокарда.

Ключевые слова: лишайники, β-олигосахариды, сахарный диабет 2-го типа.

It has been shown that prolonged incubation (3-4 weeks) of rat insulinoma clonal β-cells in the RPMI1640 medium containing the biologically active supplement (BAS) «Yagel» produced from the lichen thalli of genus Cladonia with biotechnology of carbon dioxide treatment in the state of supercritical fluid (active substance – lichen's β-oligosaccharides), leads to an increase of glucose-stimulated insulin secretion by 50-90%. Mechanisms – an increase in mitochondrial ATP production and, likely, the modification of β-cell plasma membrane glycocalyx with lichen's β-oligosaccharides, which enhance the exocytosis of insulin. The results of clinical trials have shown that 4-week intake of BAS «Jagel» by patients with type 2 diabetes mellitus (T2D) results in a decrease in blood glucose concentration by 1,4÷2,3 times (in the control group – by 1,1 ÷ 1, 2 times), glycosylated hemoglobin – from 9,5 ÷10,8% to 7,4 ÷8,5% (control group – by 0,5 ÷ 0,7%),

КЕРШЕНГОЛЬЦ Борис Моисеевич – д.б.н., проф., акад. АН РС(Я), зам. директора. ИБПК СО РАН; СЫДЫКОВА Любовь Ахметовна – к.м.н., зав. каф. МИ СВФУ; ШАРОЙКО Владимир Владимирович – д.б.н., проф., Института химии СПбГУ.

while reducing the proportion of low-density lipoproteins by $18 \pm 37\%$. Patients in experimental and control (they intake placebo instead of BAS «Jagel») groups have been on a similar tablet antidiabetic therapy (randomized treatment), which had not been adjusted. The obtained results let us to recommend the BAS «Jagel» as an additional mean to normalize blood glucose concentration in patients with T2D. In Hematology Research Center (Moscow) an antithrombin activity of BAS «Jagel» has been shown therefore, based on these results, we can recommend the BAS «Jagel» for the prevention and relief of the effects of vascular pathologies, including stroke and myocardial infarction.

Key words: lichens, β -oligosaccharides, type 2 diabetes.

Лишайники рода *Cladonia* давно применяются в традиционной медицине. Известны их антиоксидантные, антимикробные и детоксикационные свойства. В состав слоевищ лишайников рода *Cladonia* входит широкий спектр соединений, включающий β -полисахариды, усниновые, орселиновые, леканоровые, гирофоровые и хиастовые кислоты, гидроксинафторхиноны и гидроксиантрахиноновые и другие ароматические пигменты, депсидоны, антранорины, полиненасыщенные жирные кислоты и т.д. [1]. Ранее была изучена способность водно-спиртового экстракта слоевищ лишайника рода *Cladonia*, предварительно обработанного диоксидом углерода в состоянии сверхкритического флюида – препарат «Ягель» [2], улучшать инсулин-секреторную функцию клональных β -клеток инсулиномы крысы INS-1 (клон 832/13) [3]. Полученные в этих экспериментах результаты доклинических исследований позволили провести клинические испытания БАД «Ягель» в целях снижения уровня глюкозы в крови пациентов с сахарным диабетом 2-го типа (СД2). Согласно классификации, предложенной Национальным институтом здоровья США, эти клинические испытания относятся к категории «исследование качества жизни» (quality of life trials), которые проводятся для изучения способов повышения качества жизни пациентов, страдающих хроническими заболеваниями [4].

Материал и методы

Условия культивирования β -клеток линии INS-1 (клон 832/13) и их инкубации в стандартной среде RPMI1640 в присутствии БАД «Ягель» (разведение 1:100) в течение 1–30 дней, методики измерения секреции инсулина в присутствии 2,8 мМ и 16,7 мМ глюкозы, а также концентраций АТФ, общего белка, выделения, очистки РНК и обратной транскрипции, выживаемости клеток при проведении доклинической части исследования подробно описаны в работе [3]. Взаимодействие лишайниковых β -олигосахаридов с мембранами β -клеток изучалось методом «Мультипараметрического поверхностного плазмонного резонанса» («Multi-Parametric Surface Plasmon Resonance») [5].

В клинических исследованиях приняли участие 76 добровольцев, в возрасте от 29 до 65 лет, в том числе 35 мужчин и 41 женщина с СД2. Основные критерии включения в группу: подтвержденный диагноз СД2 (уровень глюкозы крови $> 6,1$ мМ) и письменное согласие добровольцев. Из обследуемой группы исключались лица с онкологическими заболеваниями. В ходе эксперимента нежелательных явлений или побочных эффектов не наблюдалось. Добровольцы в течение 4 недель принимали БАД «Ягель» за 40–60 мин до еды или через 40–60 мин после еды, два раза в день по 20–25 капель. Взятие крови для анализа на содержание глюкозы в капиллярной крови и гликозилированного гемоглобина в цельной крови с антикоагулянтом ЭДТА (гемоглобин A1c, Hb_{A1c}; биохимический показатель крови, отражающий среднее содержание глюкозы в крови за длительный период – до трёх месяцев; норма от 4 до 5,9%, для пациентов с СД2 $< 6,5\%$) проводили утром натощак до начала приема БАД «Ягель» и на 28–30-й день его приема. Определение показателей липидного обмена проводили по стандартным методикам [6]. Фазы неспецифической адаптивной реакции (НАР) организма человека рассчитывали, определяя лейкоцитарную формулу крови [7]. Статистическая обработка данных проводилась с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости тестируемой гипотезы $p < 0,05$. Результаты представлены как среднее $\pm$ доверительный интервал среднего для указанного числа экспериментов.

Результаты

1. Изучена способность водно-спиртового экстракта (этанол: вода = 1:1, об/об) слоевищ лишайника *Cladonia* (активное вещество – лишайниковые β -олигосахариды), предварительно обработанных диоксидом углерода в состоянии сверхкритического флюида – БАД «Ягель», улучшать инсулинсекреторную функцию β -клеток. После инкубации β -клеток измерялось количество секретированного инсулина в присутствии 2,8 мМ и 16,7 мМ глюкозы соответственно (рис. 1).

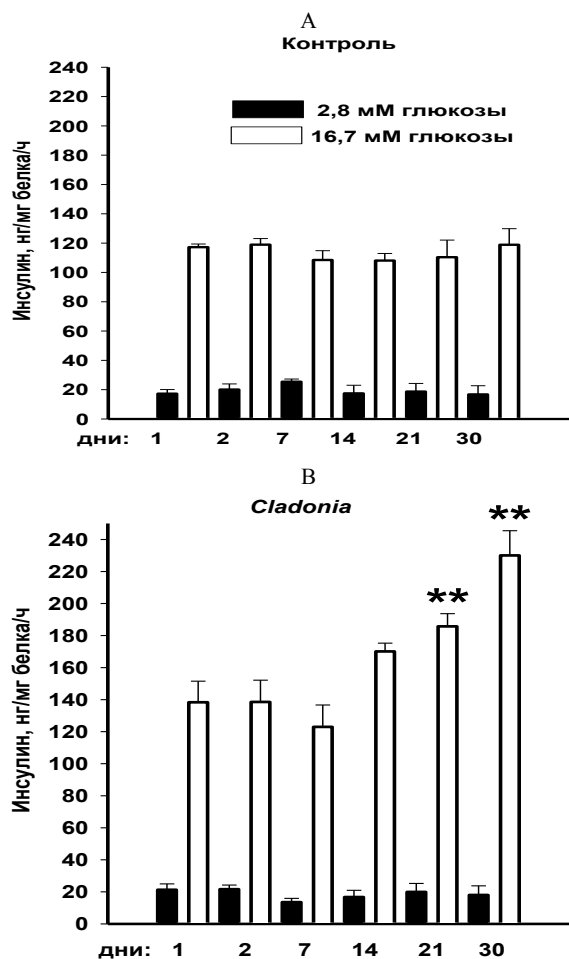


Рис. 1. Глюкозостимулированная секреция инсулина β -клетками после пролонгированной инкубации с БАД «Ягель» (разведение 1:100); $p < 0,01$ относительно контрольных β -клеток (инкубация без экстракта), $n=3$

Показано, что на 21–30-й день инкубации β -клеток с БАД «Ягель» происходило статистически достоверное увеличение чувствительности β -клеток к глюкозе, что сопровождалось увеличением секрецией инсулина на 50–90% по сравнению с β -клетками, инкубированными без БАД «Ягель».

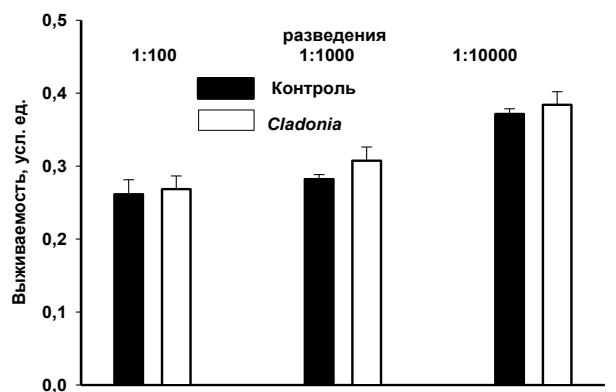


Рис. 2. Выживаемость β -клеток при действии БАД «Ягель» в различных концентрациях

При этом было установлено, что компоненты экстракта не вызывали гибели β -клеток (по сравнению с контролем), что было подтверждено путем измерения выживаемости клеток MTS-регентом (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбосиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2H-тетразолий) (рис. 2).

Изучено влияние БАД «Ягель» на биоэнергетические процессы в β -клетках инсулиномы крысы. Из рис. 3 видно, что в β -клетках после инкубации с БАД «Ягель» синтезируется больше АТФ при их стимуляции глюкозой. Причем при добавлении 2,4-динитрофенола (разобщитель окислительного фосфорилирования) и олигомицина (ингибитор АТФ-синтазы) не наблюдалось достоверных различий в количестве синтезированной АТФ между контрольными клетками и клетками, инкубированными с БАД «Ягель». Это указывает на то, что данный ягельвый биопрепарат влияет именно на синтез АТФ в митохондриях, т.е. увеличение секреции инсулина β -клетками коррелирует с повышением продукции АТФ митохондриями.

О механизме этого влияния, по-видимому, можно судить, во-первых, по результатам эксперимента, в котором продолжительная инкубация β -клеток в присутствии БАД «Ягель» стимулировала повышение экспрессии одного из ключевых факторов транскрипции митохондриального генома – *Tfam* (рис. 4).

Во-вторых, по результатам предварительного эксперимента, в котором методом «Мультипараметрического поверхностно-плазмонного ре-

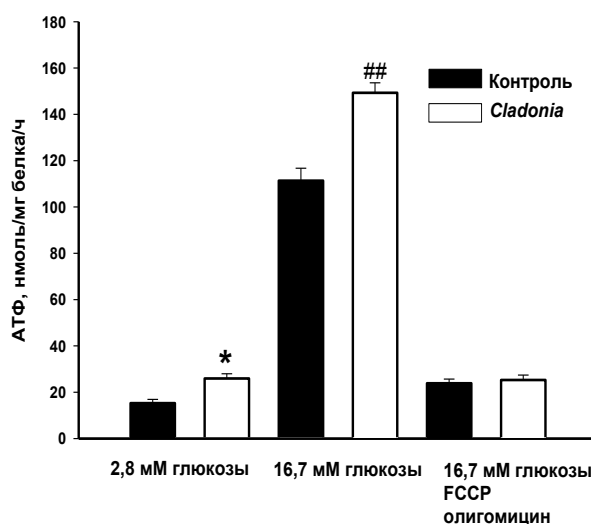


Рис. 3. Продукция АТФ в β -клетках через 30 дней после инкубации с БАД «Ягель». Клетки стимулировали глюкозой в концентрации 2,8 и 16,7 мМ в течение 1 ч; $n=3$: * $p < 0,05$ по сравнению с клетками, культивированными без БАД «Ягель», стимуляция 2,8 мМ глюкозы; ## $p < 0,01$ по сравнению с клетками, культивированными без БАД «Ягель», стимуляция 16,7 мМ глюкозы

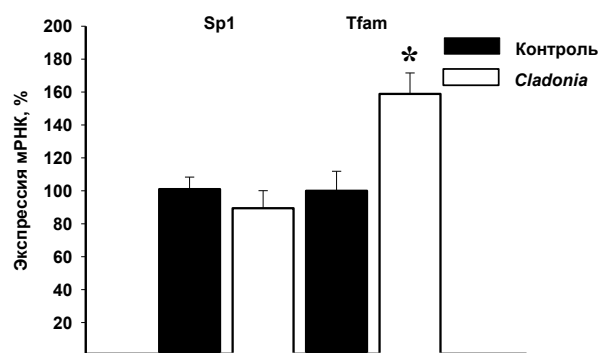


Рис. 4. Изменение уровня экспрессии фактора транскрипции митохондрии *Tfam* после 30-дневной инкубации β -клеток с БАД «Ягель»

зонанса» [5] было изучено взаимодействие лишайниковых β -олигосахаридов (в качестве лигандов) с мембранами β -клеток и показано, что лишайниковые β -олигосахариды действительно встраиваются в структуру гликокаликса клеточных мембран, меняя его конформацию (рис. 5). По-видимому, это способствует высвобождению инсулина за счет адапторных функций олигосахаридов и индуцированных ими конформационных перестроек гликокаликса при слиянии инсулиновых везикул с мембраной клетки, в конечном итоге секреции инсулина путем экзоцитоза [8, 9].

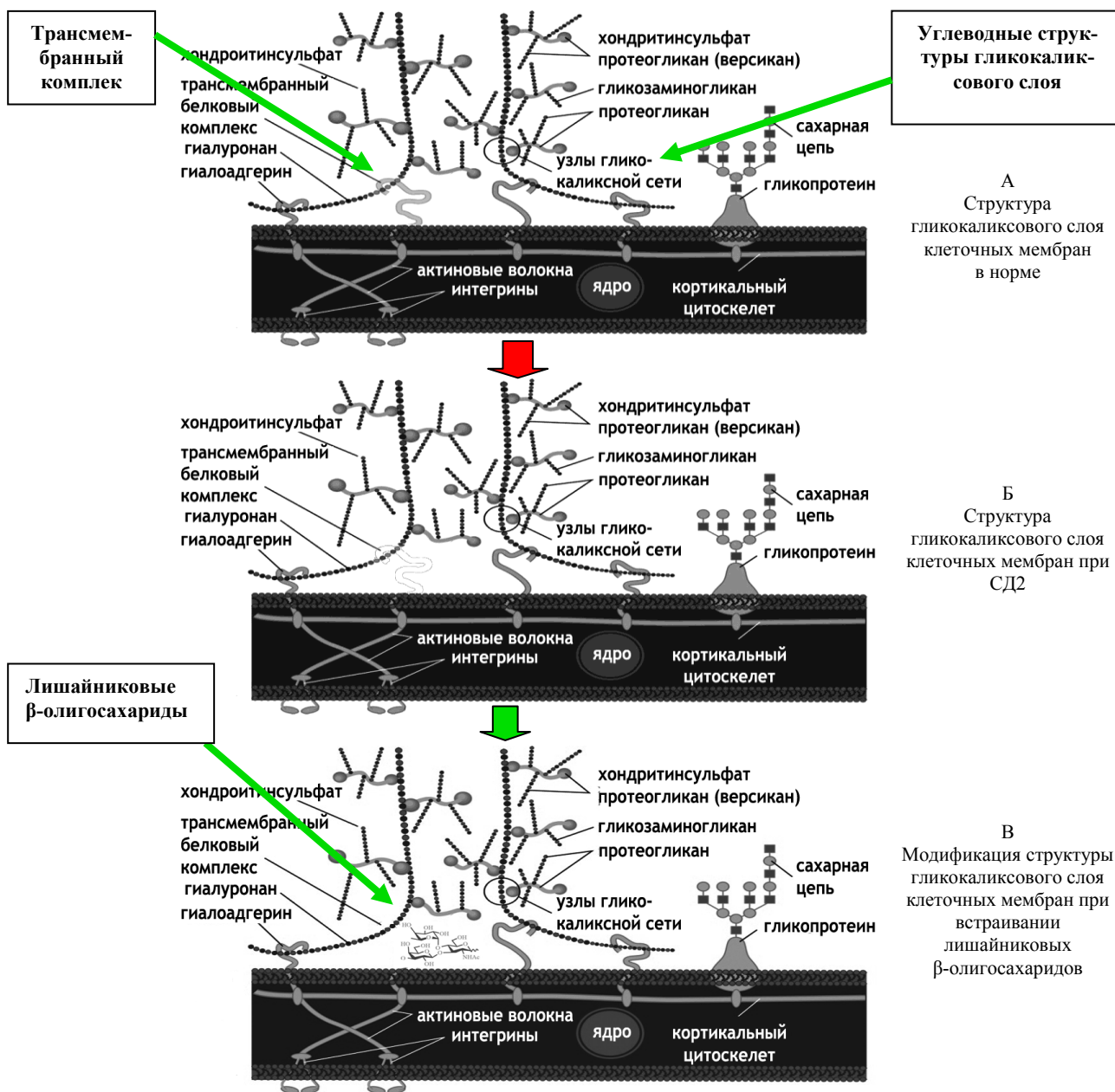


Рис. 5. Схематическое изображение трансформации гликокаликса клеточных мембран при СД2 и при модификации лишайниковыми β -олигосахаридами, приводящей к восстановлению инсулинсекреторных каналов

Известно, что инсулиновые рецепторы периферических тканей-мишеней (мышечная и жировая ткань) содержат на своей поверхности гликокаликс [10], поэтому можно предположить, что лишайниковые β -олигосахариды могут способствовать увеличению рецепции (аффинности) инсулина к инсулиновым рецепторам тканей-мишеней и защищать инсулинорецепторный комплекс от действия протеаз [8], увеличивая тем самым время действия инсулина и инсулиночувствительность этих тканей, что приводит к повышению активности инсулинозависимого транспорта глюкозы и, следовательно, к нормализации концентрации глюкозы крови.

Таким образом, результаты первой части работы показывают, что лишайниковые β -олигосахариды, модифицируя структуры гликокаликса клеточных мембран, активируют системы секреции инсулина β -клетками в 1,5–1,9 раза при инкубации β -клеток при повышенных уровнях глюкозы в течение 3–4 недель, далее трансмембранного переноса глюкозы в клетку, увеличивая при этом интенсивность клеточного дыхания и респираторную активность митохондрий.

2. Ранее было показано, что 3-недельный прием БАД «Ягель» 28 добровольцами якутской национальности (8 мужчин, 20 женщин; возраст 31–60 лет), не страдающими СД2, но с исходно повышенным уровнем глюкозы и общего холестерина (ХС) приводит: к статистически значимому снижению уровня глюкозы (с 5,6 до 4,7 мМ) и общего холестерина (с 6,8 до 6,1 мМ). При повышении ХС, содержащегося в липопротеидах высокой плотности (ЛПВП) с 1,5 до 1,8 мМ (при содержании ХС в ЛПВП $>1,6$ формируется протективный эффект в отношении сердечно-сосудистых заболеваний), коэффициента атерогенности (с 3,5 до 2,7; $N < 3,0$), активности аланинаминотрансферазы (с 41 до 26 МЕ; $N < ME$) и к увеличению количества корреляционных связей между ними [11]. Повышается также коэффициент де Ритиса (АсАТ/АлАТ) с 0,9 до 1,4 ($N - 0,91 \div 1,75$), что указывает на нормализацию функции печени [11]. Это позволило рекомендовать БАД «Ягель» для профилактики развития сердечно-сосудистых заболеваний, нормализации функции печени и метаболических нарушений, связанных с гипергликемией и нарушением липидного обмена.

В модельных экспериментах было также показано, что лишайниковые β -олигосахариды способны снимать с поверхности биосовместимых полимеров сорбированный на них холестерин. Далее этот эффект был подтвержден в экспериментах *in vitro* и *in vivo* в отношении эндотелия сосудов. Происходит также снижение

уровня атерогенного β -холестерина в крови у людей, страдающих атеросклерозом.

В группе пациентов с гипертонической болезнью и повышенным уровнем холестерина ($n=115$) 4-недельный прием БАД «Ягель» привел к снижению уровня холестерина в среднем на 10,5% при достоверной положительной динамике у 92,5% пациентов (в контрольной группе за тот же период уровень холестерина в среднем повысился на 6,2%). Более 80% из них даже уже после двух первых недель приема препарата отмечали достоверное улучшение самочувствия. Уровень глюкозы крови, обычно также повышенный у больных атеросклерозом, в экспериментальной группе снизился на 16,5%.

Приведенные выше результаты позволили провести клиническую апробацию БАД «Ягель» в качестве дополнительного средства для нормализации уровня глюкозы крови у пациентов с СД2.

3. Были сформированы экспериментальная группа, включающая 76 добровольцев с СД2, и контрольная группа ($n=27$). Пациенты обеих групп находились на схожей таблетированной сахароснижающей терапии (рандомизировались по лечению), которая не корректировалась. Пациенты, входящие в экспериментальную группу, получали БАД «Ягель» два раза в день по 20–25 капель в течение 4 недель. Пациенты контрольной группы получали вместо БАД «Ягель» плацебо (два раза в день по 20–25 капель 50%-го водно-спиртового раствора в 100 мл воды).

Были получены следующие результаты. Активировались системы антиоксидантной защиты (содержание низкомолекулярных антиоксидантов в крови, изначально сниженное в 1,5–2,0 раза, повысилось в 1,5 раза), а активность процессов перекисного окисления липидов, исходно повышенная по сравнению с нормой в 2–3 раза, снизилась в 1,5–2,0 раза. Все это приводит к улучшению проницаемости клеточных мембран для глюкозы крови.

По-видимому, благодаря вышеуказанным процессам в совокупности, уровень глюкозы крови снизился в $1,4 \div 2,3$ раза (с $12,4 \div 14,6$ до $6,4 \div 8,3$ мМ) против снижения в контрольной группе в $1,1 \div 1,2$ раза. Наиболее значимым показателем в отношении снижения уровня сосудистых осложнений при СД2 явилось уменьшение содержания гликированного гемоглобина с $9,5 \div 10,8\%$ до $7,4 \div 8,5\%$ (в контрольной группе – на $0,5 \div 0,7\%$) при одновременном снижении доли липопротеидов низкой плотности на $18 \div 37\%$.

При этом доля больных, находящихся в негативных НАР («стресс» или «переактивация») [7], уменьшилась с 19,5% до нуля, а находящихся в позитивных НАР («тренировка» или «акти-

вация») увеличилась с 47,2 до 71,7%. По-видимому, это явилось причиной достоверно регистрируемого повышения качества жизни (уровня физической и умственной работоспособности, уменьшения утомляемости и т.д.) больных СД2 после 4-недельного приема БАД «Ягель».

Полученные результаты позволяют рекомендовать БАД «Ягель» в качестве дополнительного средства для нормализации уровня глюкозы у пациентов с диагнозом СД2.

Поскольку в Гематологическом научном центре РАМН (г. Москва) была показана антитромбиновая активность БАД «Ягель», то полученные результаты, наряду с выявленной антиагрегированной активностью, позволяют рекомендовать БАД «Ягель» в целях профилактики и купирования последствий сосудистых патологий, включая инсульты и инфаркты.

Литература

1. Телятьев В.В. Полезные растения Центральной Сибири. – Иркутск: Восточно-Сибирское кн. изд-во, 1985. – 384 с.
2. Свидетельство о государственной регистрации, санитарно-эпидемиологическое заключение и ТУ на БАД «Ягель» / Свидетельство ЕВРАЗЭС о гос. регистрации Роспотребнадзора РФ № RU.77.99.11.003. E.051236.11.11 от 17.11.2011.

3. Чуркина Е.В., Кершенгольц Б.М., Шаройко В.В. Эффект препарата «Ягель» из слоевищ лишайника рода *Cladonia* на секрецию инсулина // Дальневосточный медицинский журнал. – 2011. – №2. – С.67–70.

4. <http://www.webcitation.org/61BHrqVfM>.

5. Никитин М.П. Способ определения содержания лиганда в образце (варианты) // Патент WO2013151464 A2, приоритет от 02.04.2012, опубликовано 10.10.2013.

6. Творогова М.Г. Лабораторная диагностика нарушений липидного обмена // Лабораторная медицина. – 2001. – №4. – С. 67–74.

7. Гаркави Л.Х., Квакуина Е.Б., Кузьменко Т.С. Антистрессорные реакции и активационная терапия. – М.: ИМЕДИС, 1998. – 656 с.

8. Ajit Vark. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct Glycobiology. – 1993. – V. 3, no. 2. – P. 97–130.

9. Raphaël Trouillona, Andrew G. Ewinga. Single Cell Amperometry Reveals that the Glycocalyx Hinders the Release of Neurotransmitters During Exocytosis // Anal Chem. – 2013. – 85(9). – P. 4822–4828.

10. Bart J.M. Eskens, Hans L. Mooij, Jack P.M. Cleutjens et al. Rapid Insulin-Mediated Increase in Microvascular Glycocalyx Accessibility in Skeletal Muscle May Contribute to Insulin-Mediated Glucose Disposal in Rats. PLOS ONE. – 2013. – V. 8. Issue 1. – P. 1–11.

11. Гольдерова А.С., Кривошапкина З.Н., Миронова Г.Е. et al. Влияние БАД «Ягель» на биохимические показатели крови // Якутский медицинский журнал. – 2010. – №4. – С. 73–76.

Поступила в редакцию 02.06.2014

УДК 612.01; 591.1–027.21

Эколого-физиологические особенности адаптации женщин-эвенкиек в условиях Арктики

О.Н. Колосова, Е.А. Бельчусова, Е.Н. Николаева

Приведены результаты исследования неспецифических адаптивных реакций организма женщин-эвенкиек в различных возрастных группах в условиях Арктики. Обнаружено, что к группе риска по развитию патологических процессов с наибольшей вероятностью можно отнести женщин-эвенкиек трех возрастных групп: 16–18 лет, 45–59 лет и 75 и старше лет, поскольку в данных возрастных периодах выявляется наиболее высокий уровень напряженности протекания адаптивных процессов.

Ключевые слова: Арктика, женщины, адаптация, физиология, экология, реакции, лимфоциты, стресс, напряженность, гомеостаз.

The results of study of nonspecific adaptive reactions of the organism of Evenkie women in different age groups in conditions of the Arctic are presented. It is found that in a risk group of the development of pathological processes with the greatest probability there are Evenkie women of three age groups: 16-18 years, 45-59 years and 75 years and older, because for these age periods the highest level of tension of adaptation processes flow is revealed.

Key words: Arctic, women, adaptation, physiology, ecology, reactions, lymphocytes, stress, tension, homeostasis.

КОЛОСОВА Ольга Николаевна – д.б.н., проф., в.н.с. ИБПК СО РАН, kolosova.olga8@inbox.ru; БЕЛЬЧУСОВА Елена Александровна – аспирантка МИ СВФУ, belchusova@mail.ru; НИКОЛАЕВА Евгения Николаевна – к.б.н., доцент МИ СВФУ, evgeniaschacte@mail.ru.