



Биол. журн. Армении, Приложение 1 (66), 2014

ИНГИБИРОВАНИЕ ФИБРИЛЛОГЕНЕЗА АМИЛИНА ЭКСТРАКТАМИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ КОМПОНЕНТАМИ

С. Г. ШАРОЯН, А. А. АНТОНЯН, С. С. МАРДАНЯН, А. А. АРУТЮНЯН

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА
biochem@ipia.sci.am

Фибриллизация пептидного гормона поджелудочной железы, амилина, считается одной из причин гибели β -клеток при сахарном диабете 2-го типа. Исследовали влияние препаратов из шести видов растений на агрегацию амилина. Степень агрегированности оценивали по интенсивности флуоресценции и флуоресцентно-микроскопическим снимкам тиофлавин-содержавших препаратов. Этаноловые экстракты пяти растений, кроме экстракта из корня перестуля белого, ингибировали агрегацию амилина. Наиболее эффективными ($> 90\%$) оказались экстракты конского щавеля и виноградных листьев. Эффективны были также кумариновые фракции из конского щавеля и донника лекарственного. Экстракты донника лекарственного, листьев винограда и конского щавеля приводили к дезагрегации предварительно образованных агрегатов амилина соответственно на 70, 90 и 100 %. На основании полученных данных можно рекомендовать: а) частое использование указанных растений лицами, находящимися в группе риска; б) проведение клинических исследований с целью использования данных растений и их экстрактов в качестве антидиабетических средств.

Амилин - амилоидоз - растительные экстракты - растительные кумарины

Fibrillation of peptide hormone of pancreas, amylin, is considered as one of causes of death of β -cells in type 2 diabetes. The effect of six species medical plants on aggregation of amylin was investigated. Aggregation degree was evaluated by fluorescence intensity and fluorescence microscope images of thioflavin-containing incubation mixture. Ethanol extracts of five plants inhibited the aggregation of amylin. The extracts of sorrel and grape leaves were most effective, by $> 90\%$. The coumarin fractions of sorrel and melilot were also effective. Extracts of melilot, grape and sorrel leaves led to disaggregation of preformed aggregates of amylin, respectively, by 70, 90 and 100 %. Based on these data we can recommend: a) frequent usage of these plants by persons at risk group; b) conducting clinical studies of these plants and their extracts as antidiabetic agents.

Amylin - amyloidosis - plant extracts - plant coumarins

Ենթաստամոքսային գեղձի պեպտիդային հորմոնի, ամիլինի, ֆիբրիլացումը համարվում է β -քիչների մահվան և 2-րդ տեսակի շաքարախտի պատճառներից մեկը: Ուսումնասիրվել է պեպտիդի ամիլոիդային վիճակի վրա վեց տեսակի դեղաբույսերի ազդեցությունը: Ամիլոիդային վիճակը գնահատվել է տիոֆլավինի հետ ուսումնասիրվող լուծույթի խառնուրդի ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությամբ և ֆլուորեսցենտ մանրադիտակով ստացված պատկերներով: Հինգ բույսերի էթանոլային թուրմերը արգելակում էին ամիլինի ագրեգացումը: Առավել արդյունավետ էին՝ > 90 %, ավելուկի և խաղողի տերևների թուրմերը: Նաև արդյունավետ էին ավելուկի և իշառվույտի կուժարինային ֆրակցիաները: Իշառվույտի, խաղողի և ավելուկի տերևների թուրմերը համապատասխանաբար 70 , 90 և 100 %-ով քայքայում էին ամիլինի նախորդը կազմված ագրեգատները: Այս տվյալների հիման վրա կարող ենք առաջարկել ա) այդ բույսերի հաճախակի օգտագործումը վտանգի տակ գտնվող անձանց կողմից; բ) իրականացնել այդ բույսերի և դրանց բաղադրիչների կլինիկական ուսումնասիրություններ որպես հակադիաբետիկ գործոններ:

Ամիլին - ամիլոիդոզ - բուսական թուրմեր - բուսական կուժարիններ

Амилоидные фибриллы, являющиеся причиной различных патологий, сходны по своей морфологии и структуре, независимо от аминокислотного состава и последовательности образующих белков [8, 23]. Неправильное сворачивание пептидов и белков приводит к формированию строго упорядоченных амилоидных агрегатов [4-5]. Термодинамически амилоидное состояние пептида более стабильно, а нативная форма белка является метастабильным состоянием [2]. Неправильное сворачивание белка, его самосборка в нерастворимые амилоидные фибриллярные структуры и формирование строго упорядоченных накоплений лежат в основе многих тяжелых заболеваний, составляющих группу амилоидозов (в скобках указаны соответствующие амилоидные белки): болезнь Альцгеймера (амилоидные β -пептиды, тау-белок), болезнь Паркинсона (α -синуклеин), диабет 2 типа (амилин), диализный амилоидоз (β 2-микроглобулин), катаракта (кристаллин), лизоцим-системный амилоидоз (лизоцим), и т.д. [10, 18, 20].

В настоящее время нет терапевтических средств, успешно противостоящих формированию фибриллярных агрегатов. Учитывая высокую стоимость и побочные эффекты синтетических лекарств, а также неполное выздоровление пациентов при их использовании, проводятся исследования по разработке подходов, основанных на использовании природных препаратов из растений. Природные соединения с широким спектром биологической активности представляют собой один из основных источников для разработки новых терапевтических препаратов [6]. Небольшие молекулы из растений способны понижать риск таких заболеваний, как рак, диабет, сердечно-сосудистые и невропатологические заболевания [3, 9, 11, 14]. Полифенолы ингибируют образование фибриллярных агрегатов амилоидных белков и понижают их цитотоксичность. При этом важны особенности их структуры и специфические ароматические взаимодействия, которые следует учитывать при разработке новых терапевтических средств для лечения обусловленных амилоидозом заболеваний [19].

Амилоидный полипептид амилин содержит 37 аминокислотных остатков и является одним из основных секреторных продуктов β -клеток поджелудочной железы [21, 7]. Это регуляторный пептид, функционирующий как в островках β -клеток (где он ингибирует секрецию инсулина и глюкагона), так и в некоторых других органах. Амилоидные отложения амилина были обнаружены в островках β -клеток при сахарном диабете 2 типа у людей и у некоторых млекопитающих (обезьяны и кошки). Агрегированный амилин цитотоксичен и, как полагают,

играет важную роль в потере β -клеток при диабете 2 типа и при их пересадке людям с диабетом 1 типа [22].

Известно ингибирование образования амилоидной структуры амилина такими природными соединениями, как флавоноиды (мирицетин, кверцетин, кемпферол и пр.), полифенолы (галлат эпигаллокатехина, розмариновая кислота, куркумин и пр.) и т.д. [1,15,16]. Очевидно, что цитотоксичность пептида в отношении β -клеток может быть уменьшена этими соединениями. Действительно, галлат эпигаллокатехина из зеленого чая *in vitro* ингибировал амилоидогенез амилина и дестабилизировал его предварительно сформированные агрегаты [17].

Растительные соединения, проявляющие антиамилоидогенную активность в отношении амилина, могут быть предложены для разработки препаратов против диабета. Настоящая работа направлена на проверку такой активности у растений, используемых в пищу или в народной медицине (корень переступня белого, виноградные листья, конский щавель, семена расторопши, донник лекарственный, листья ежевики). Изучена также активность кумариновых фракций из конского щавеля и донника лекарственного.

Материал и методика.

Сефадексы G-25 и LH-20 были приобретены у фирмы "Pharmacia Biotech" (Упсала, Швеция), амилин – у фирмы "Gene Cust" (Люксембург), Тиофлавин (ThT) – у фирмы "Sigma" (США). Остальные реактивы и растворители были высокой степени чистоты. Измерения проведены на спектрофотометре "Specord M-40" фирмы Specord (Германия); спектрофлуорометре MPF-44A фирмы "Perkin-Elmer", (США); флуоресцентном микроскопе модели BH2 RFCA, фирмы Olympus.

Корень переступня белого (*Bryonia alba*) и семена расторопши (*Cardulus silybum*) приобретены из Фитотерапевтического центра "Артемисия" (Армения). Донник лекарственный (*Melilotus officinalis*), виноградные листья (*Vitis vinifera*), конский щавель (*Rumex crispus*), листья ежевики (*Rubus caesius*) собраны в Араратской долине. Растительный материал был идентифицирован сотрудником кафедры ботаники биологического факультета ЕГУ кандидатом биологических наук Нарине Закарян.

Высушенные в тени растения измельчали в ступке и суспензировали в 70 %-ном этаноле в соотношении 1:10 (вес/объем). Суспензию выдерживали 3 сут в закрытой темной посуде при комнатной температуре, фильтровали через стерильную марлю и стеклянный фильтр. Полученный экстракт высушивали до постоянного веса и хранили до использования при температуре -18°C .

Для получения компонентов экстрактов, навеску высушенного экстракта растворяли в 70 %-ном этаноле и подвергали последовательной гель-фильтрации на колонках с сефадексами LH-20 и G-25, уравновешанных 20 %-ным этанолом. Фракции элюировали возрастающими концентрациями этанола до 70 %. Кумариновые фракции с колонки G-25 элюировали 20 %-ным этанолом. Их наличие определяли по красно-вишневому окрашиванию реактивом Паули после кипячения в щелочной среде. Чистоту препарата оценивали с помощью тонкослойной хроматографии на силикагеле. Кумариновые фракции высушивали и хранили при температуре -18°C , как описано выше. В опытах, в качестве исходного, использовали 1 или 2 %-ные (вес/объем) растворы (в 70 %-ном этаноле) высушенных растительных препаратов.

Для приготовления исходного раствора амилина к 1 мг пептида добавляли 0,8 мл свежekiпяченной и охлажденной бидистиллированной воды, размешивали и через 30 мин центрифугировали. Спектр поглощения надосадочного раствора регистрировали в пределах 220-320 нм. Молярную концентрацию пептида оценивали, используя молярный коэффициент экстинкции (ϵ) тирозина при 276 нм, $1,39 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Агрегаты амилина получали, инкубируя пептид, в концентрации 50-70 мкМ, при 37°C в 20-40 мМ фосфатном буфере, pH 7,4, в присутствии 0,02 %-ного азида Na в течение 3-8 сут. При исследовании влияния растительных препаратов на процесс агрегации выявлено, что

аналогичная инкубационная среда содержала также раствор растительного препарата. В опытах с амилином концентрация растительных препаратов была в пределах 0,3-0,8 %.

В опытах по дезагрегации фибрилл амилина суспензию фибрилл, образовавшихся в процессе предварительного инкубирования раствора пептида без добавок в течение 8 сут. при описанных выше условиях инкубировали при 37°C в течение 2-х сут в присутствии исследуемых растительных экстрактов.

Тиофлавин (ThT) в присутствии белковых агрегатов флуоресцирует при длине волны 485 нм (длина волны возбуждения 430 нм), в то время как сам ThT, а также его комплексы с мономерами или димерами пептидов не имеют этого спектра [12-13]. Степень агрегированности пептидов оценивали по интенсивности спектра флуоресценции ThT в смеси, содержащей аликвоты инкубированных пептидов. Смесь в 290 мкл фосфатного буфера, pH 7.4, содержала 8 мкМ пептида и 8,6 мкМ ThT. Об агрегированности судили также по снимкам образцов, полученным с помощью флуоресцентного микроскопа.

Результаты и обсуждение.

Чтобы оценить способность растительных препаратов предотвращать образование агрегатов амилина, идентичные растворы пептида инкубировали в отсутствие и в присутствии исследуемых препаратов. Аликвоты из этих проб вносили в буферную смесь с ThT и регистрировали спектр флуоресценции в пределах 460-520 нм, при длине волны возбуждения 430 нм.

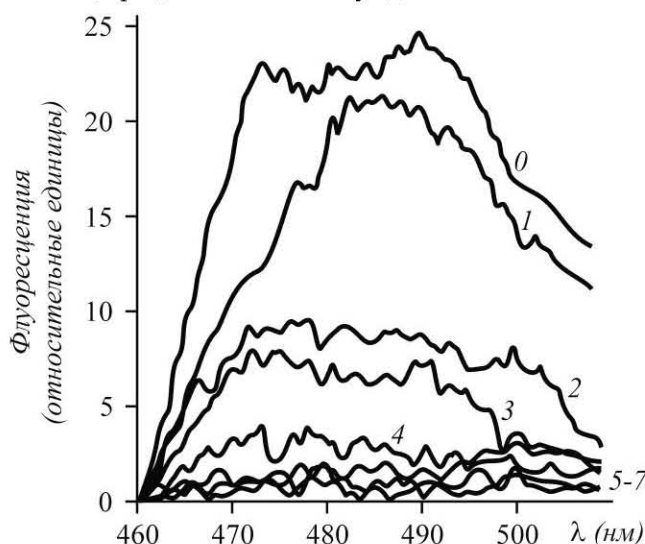


Рис. 1. Спектры флуоресценции ($\lambda_{\text{возб.}}$ 430 нм) ThT в смесях, содержащих аликвоты пептидов, инкубированных в течение 96 ч. 0 – контроль, амилин инкубирован в отсутствие растительных препаратов; 1 – инкубационная смесь содержала экстракт из корня переступня белого; 2 и 3 – экстракт из семян расторопши и кумариновую фракцию донника лекарственного; 4 – экстракт донника; 5-7 – экстракты конского щавеля, листьев ежевики и кумарина, очищенного из экстракта конского щавеля.

На рис. 1 приведены типичные спектры флуоресценции комплексов ThT с амилином, инкубированным в течение 96 ч в отсутствие (кривая 0) и в присутствии экстрактов пяти видов растений и двух кумариновых фракций. Из рис. видно, что экстракты конского щавеля и листьев ежевики, а также кумарин конского щавеля почти полностью предотвращал образование агрегатов амилина. Так же хорошо, на 85 %, ингибировали экстракт донника лекарственного. Экстракт из корня переступня белого почти не влиял на процесс агрегации амилина.

На рис. 2 представлены изображения, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа проб, обработанных аналогично пробам, спектры которых приведены на рис. 1. На рис. полученных с помощью флуоресцентного микроскопа, можно видеть крупные образования на снимке амилина без каких-либо добавок. В тех случаях, когда раствор пептида в процессе инкубирования содержал экстракт листьев ежевики или конского щавеля, а также экстракт семян расторопши, эти образования почти полностью отсутствуют. В случаях, когда раствор пептида инкубировали в присутствии кумаринов конского щавеля и донника лекарственного, наблюдаемые на первом снимке образования значительно размельчены и разрыхлены.

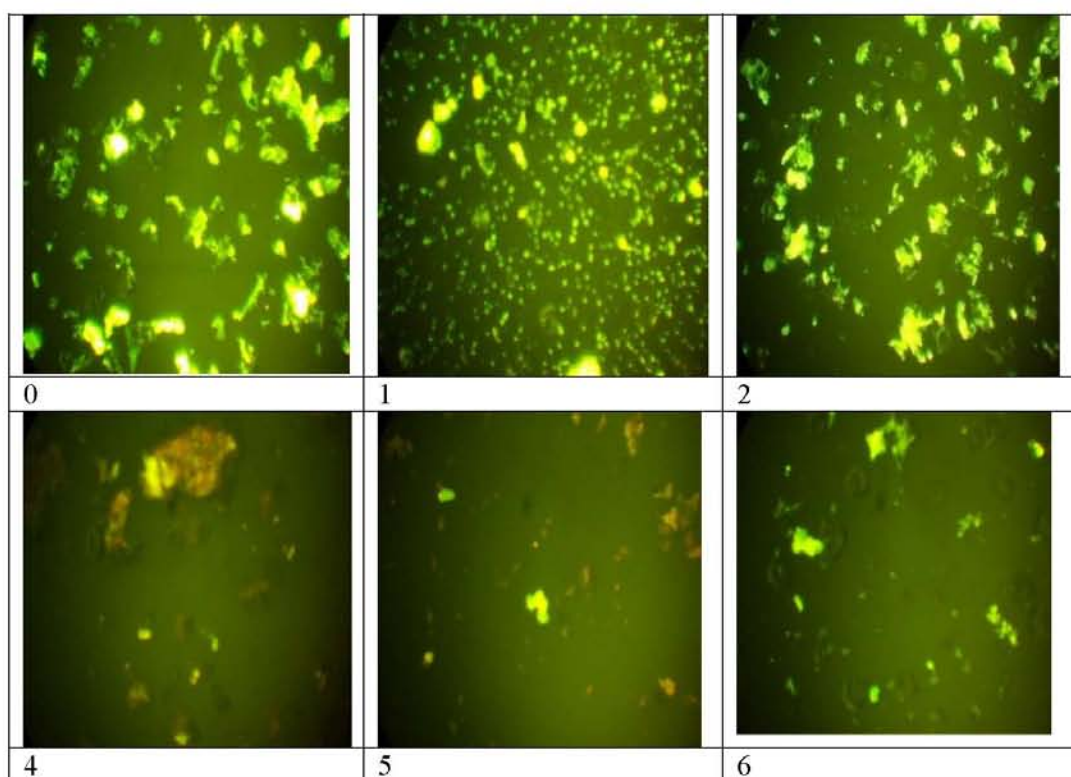


Рис. 2. 0 – амилин, инкубированный в течение 96 час при 37°C без добавок и в присутствии: 1 и 2 – кумаринов из конского щавеля и донника лекарственного, 4, 5 и 6 – экстрактов листьев ежевики, конского щавеля и семян расторопши.

Результаты исследования, представленные на рис. 1 и 2, свидетельствуют о том, что использованные нами растительные препараты препятствуют образованию агрегатов амилина.

Было проведено три независимых опыта по влиянию на процесс агрегации амилина экстрактов 6-ти видов растений. Степень агрегированности амилина в исследуемых смесях была оценена по интенсивности флуоресценции ThT в комплексе с пептидным препаратом как процент от флуоресценции образца без добавок (контроль). На рис. 3 показаны данные, полученные в трех независимых опытах, усредненные для каждого растения.

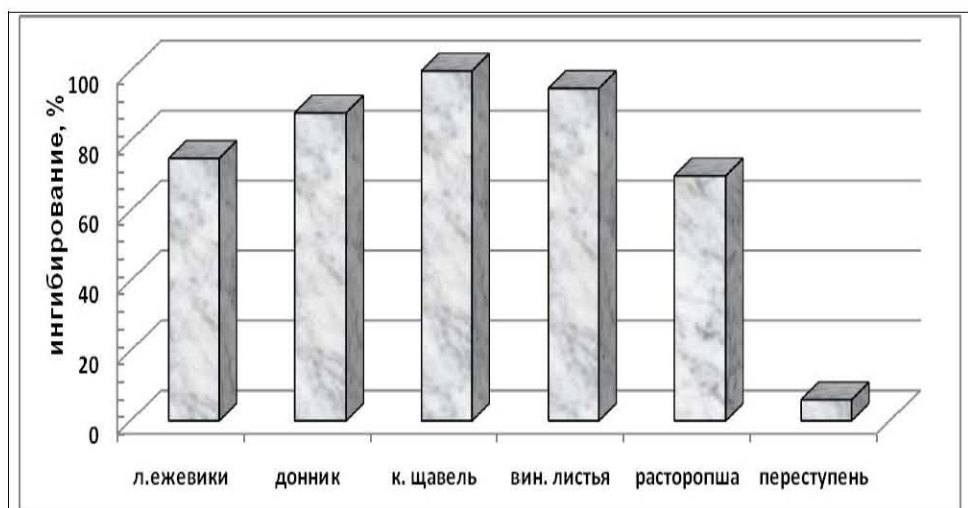


Рис. 3. Усредненные показатели ингибирования агрегации амилина экстрактами растений.

Чтобы оценить способность исследуемых растительных препаратов дезагрегировать предварительно образованные агрегаты амилина, был проделан следующий опыт. Раствор амилина в концентрации 60 мкМ без добавок инкубировали в течение 8 сут при 37°C и регистрировали спектр флуоресценции, свидетельствующий об образовании агрегатов. Из этого раствора отбирали аликвоты по 60 мкл и добавляли растительные экстракты до 0,5 %. Аликвоты с растительными препаратами (контроль, без добавок) инкубировали двое суток при тех же условиях. На рис. 4 кривая 0 представляет спектр флуоресценции амилина без добавок, инкубированного в течение 10 сут. Кривые 1, 2 и 3 – спектры флуоресценции аликвот агрегированного амилина, инкубированных в течение двух суток в присутствии экстрактов листьев, соответственно донника, винограда и конского щавеля. Как свидетельствуют кривые, экстракты привели к дезагрегации агрегатов амилина на 70, 90 и 100 %, соответственно.

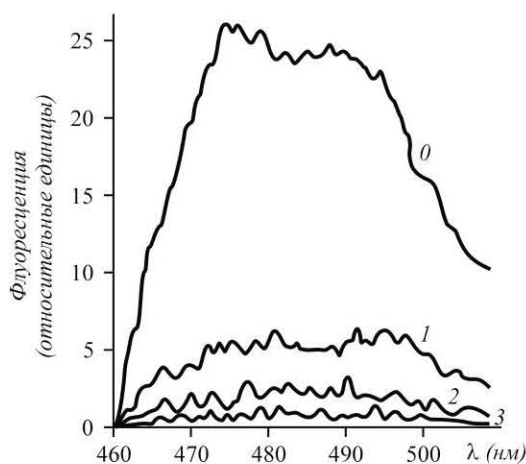


Рис. 4. Спектр флуоресценции агрегированного в течение 10-ти сут препарата амилина (кривая 0) и аналогичных образцов, инкубированных в течение 2-х сут в присутствии экстрактов листьев донника лекарственного (1), винограда (2) и конского щавеля (3).

На рис. 5 представлены снимки, полученные на флуоресцентном микроскопе для проб, обработанных аналогичным образом. Здесь также как и в опытах с фибриллизацией (рис. 2), видны крупные флуоресцирующие образования в суспензии амилина без добавок, которые в образцах, инкубированных в присутствии растительных препаратов, существенно раздроблены и даже полностью отсутствуют.

Следовательно, как спектры флуоресценции (рис. 4), так и флуоресцентные снимки (рис. 5) позволяют сделать вывод о том, что исследованные нами растительные препараты способны дезагрегировать предварительно образованные фибриллы амилина.

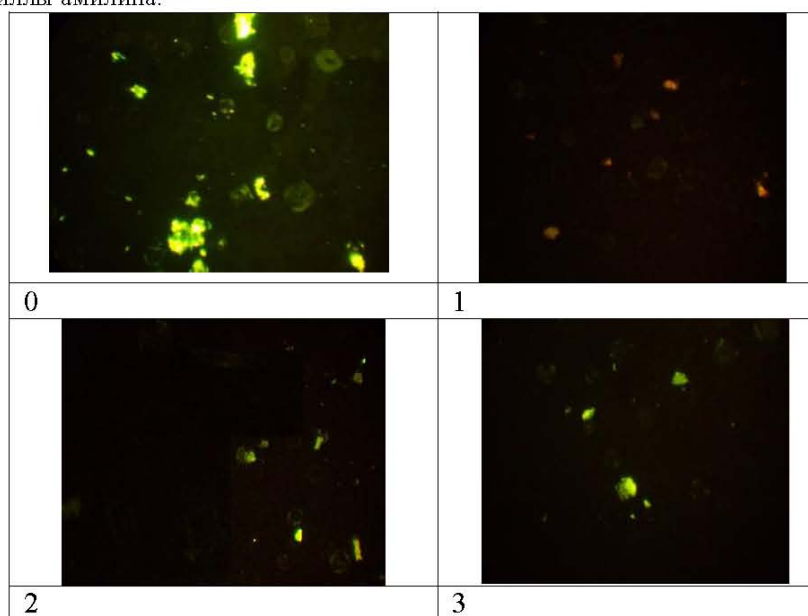


Рис. 5. 0 – предварительно агрегированный амилин, 1, 2, 3 – его алиquotы, инкубированные в присутствии экстрактов листьев конского щавеля и винограда и семян расторопши.

Таким образом, в настоящей работе исследовано влияние этаноловых экстрактов 6-ти видов растений и двух выделенных из них кумариновых фракций на процесс агрегации пептидного гормона поджелудочной железы, амилина.

Пептиды инкубировали в определенных условиях в присутствии растительных экстрактов и, в качестве контроля, в их отсутствие. Степень агрегированности пептидов оценивали по интенсивности спектров флуоресценции смеси алиquot инкубированных препаратов с тиюфлавином, а также по снимкам этих же смесей, полученным с помощью флуоресцентного микроскопа. Проведенные эксперименты впервые показали, что 5 из 6-ти экстрактов исследованных растений способны ингибировать процесс агрегации амилина. Притом, наиболее эффективно, на 90 % и более, действуют экстракты листьев конского щавеля и винограда. Экстракт корня переступня белого практически не влиял на процесс агрегации. Существенно препятствовали агрегации пептида кумариновые фракции, выделенные из экстрактов конского щавеля и донника лекарственного. Исследование влияния некоторых растительных экстрактов на процесс дезагрегации предварительно образованных агрегатов амилина показали, что экстракты донника лекарственного, листьев винограда и конского щавеля способны дезагрегировать фибриллы амилина на 70, 90 и 100 %.

Следует отметить, что отобранные нами растения издавна применяют в Армении в качестве пищи или как лечебное средство. Поэтому на основании полученных данных можно рекомендовать: а) частое их использование лицам, находящимися в группе риска; б) проведение клинических исследований с целью использования данных растений и их экстрактов в качестве антидиабетических средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Aarabi M.-H., Mirhashemi S.M.*, The role of two natural flavonoids on human amylin aggregation, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6, 2374-2379, 2012.
2. *Baldwin, A.J., Knowles, T.P.J., Tartaglia, G.G., Fitzpatrick, A.W., Devlin, G.L., Shammas, S.L., Waudby, C.A., Mossuto, M.F., Meehan, S., Gras, S., et al.*, Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 14160-3, 2011.
3. *Carocho, M., Ferreira I.C.F.R.*, A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.*, 51, 15-25, 2013.
4. *Chiti, F., Dobson, C.M.* Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 333-366, 2006.
5. *Chiti, F., Dobson, C.M.* Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nat. Chem. Biol.*, 5, 15-22, 2009.
6. *Clardy, J., Walsh C.*, Lessons from natural molecules. *Nature*, 432, 829-837, 2004.
7. *Cooper G.J.S., Leighton B., Dimitriadis GD, Parry-Billings M., Kowalchuk JM, Howland K, Rothbard JB, Willis AC, Reid KBM.* Amylin found in amyloid deposits in human type 2 diabetes mellitus may be a hormone that regulates glycogen metabolism in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 7763-7767, 1988.
8. *Greenwald, J., Riek, R.* Biology of amyloid: Structure, function, and regulation. *Structure*, 18, 1244-1260, 2010.
9. *Hawkes, C.A.; Ng V., McLaurin, J.A.* Small molecule inhibitors of A β -aggregation and neurotoxicity. *Drug Dev. Res.*, 70, 111-124, 2009.
10. *Invernizzi, G. Papaleo, E., Sabate, R., Ventura, S.* Protein aggregation: Mechanisms and functional consequences. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 44, 1541-1554, 2012.
11. *Joynera, P.M., Cichewicz, R.H.* Bringing natural products into the fold - Exploring the therapeutic lead potential of secondary metabolites for the treatment of protein-misfolding related neurodegenerative diseases. *Nat. Prod. Rep.*, 28, 26-47, 2011.
12. *Klajnert, B., Cladera, J., Bryszewska, M.*, Molecular interactions of dendrimers with amyloid peptides: pH dependence. *Biomacromolecules* 7, 2186-21915, 2006.
13. *LeVine H.*, Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science.*, 2, 404-410, 1993.
14. *Mecocci P., Polidori, M.C.* Antioxidant clinical trials in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1822, 631-638, 2012.
15. *Meng F., Abedini A., Plesner A., Verchere C.B., Raleigh D.P.*, The Flavanol (-)-Epigallocatechin 3-Gallate Inhibits Amyloid Formation by Islet Amyloid Polypeptide, Disaggregates Amyloid Fibrils and Protects Cultured Cells Against IAPP Induced Toxicity. *Biochemistry*, 49 (37): 8127-8133, 2010.
16. *Mirhashemi S.M., Aarabi M.-H.*, Effect of two herbal polyphenol compounds on human amylin amyloid formation and destabilization *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 3207-3212, 2012.
17. *Mirhashemi S.M., Aarabi M.-H.* To evaluate likely anti-amyloidogenic property of ferulic acid and baicalein against human islet amyloid polypeptide aggregation, in vitro Study. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6 (9), 671-676, 2012.
18. *Pastore A., Temussi P.* Protein aggregation and misfolding: Good or evil? *J. Phys. Condens. Matter*, 24, p. 1-9, 2012.

19. *Porat Y., Abramowitz A., Gazit E.*, Inhibition of Amyloid Fibril Formation by Polyphenols: Structural Similarity and Aromatic Interactions as a Common Inhibition Mechanism, *Chem Biol Drug Des*; **67**, 27–37, 2006.
20. *Stefani M.*, Protein misfolding and aggregation: New examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. *Biochim. Biophys. Acta*, **1739**, p. 5–25, 2004.
21. *Westermarck P., Wernstedt C., Wilander E., Hayden D.W., O'Brien T.D., Johnson K.H. et al* Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. *Proc Natl.Acad Sci USA* **84**, 3881–3885, 1987.
22. *Westermarck P, Andersson A, Westermarck GT.* Islet Amyloid Polypeptide, Islet Amyloid, and Diabetes Mellitus. *Physiol Rev*, **91**, 795–826, 2011.
23. *Zerovnik, E.* Amyloid fibril formation. Proposed mechanisms and relevance to conformational disease. *Eur. J. Biochem.* **269**, 3362–3371, 2002.

Благодарность

Исследование выполнено при финансовой поддержке ГКН МОН РА в рамках научного проекта № SCS # 13-1F186.