

УДК: 616.8;577.2.04;612.8

Н. Хошимов, млад. науч. сотруд., К. Насиров, д-р биол. наук
Институт биоорганической химии имени Академика А.С. Садыкова, Ташкент, Республика Узбекистан**ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО Ca^{2+} В СИНАПСОСОМАХ МОЗГА КРЫС, В НОРМЕ И ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ**

В статье рассмотрены механизмы действия этанола на ионные каналы синапсомозга крыс. Исследовано влияние глутамата на уровень внутриклеточного кальция в синапсомозгах контрольных крыс, вызванное глутаматом, что обусловлено в первую очередь активацией мембранной проницаемости, перемещением Ca^{2+} внутрь клетки и освобождением Ca^{2+} из внутриклеточных депо.

Ключевые слова: синапсомозга, глутамат, NMDA, глицин, магний, аргиолобатин, этанол.

Введение. Алкоголизм и наркомания являются одними из наиболее важных и актуальных проблем современной медицины. Алкоголь изменяет активность глутаматергической системы мозга. Данные о том, что этанол тормозит активность глутамата (торможение возбуждения), находятся в соответствии с результатами экспериментов, что этанол потенцирует активность ГАМК (усиление торможения). Глутамат осуществляет свое возбуждающее действие по крайней мере через три типа рецепторов, описываемых как каинатные, квисквалатные и NMDA по типу миметического действия возбуждающих рецепторы агонистов [1]; При этом обнаружено, что алкоголь осуществляет свои эффекты на глутаматергическую передачу, в основном, через NMDA-рецепторы.

Следует отметить, что мишенью этанола являются в основном рецепторы NMDA-подтипа, функционально связанные с кальциевыми каналами [2, 3]. NMDA-рецептор представляет собой целый рецепторно-ионофорный комплекс, включающий в себя:

1. сайт специфического связывания медиатора (L-глутаминовой кислоты);
2. регуляторный, или коактивирующий, сайт специфического связывания глицина;
3. аллостерические модуляторные сайты, расположенные на мембране (полиаминовый) и в ионном канале (сайты связывания фенциклидина, двухвалентных катионов и потенциалзависимый Mg-связывающий участок).

Ионы Mg^{2+} селективно блокируют активность рецепторов при высокой гиперполяризации или деполяризации. Глицин усиливает ответы NMDA-рецептора, увеличивая частоту открывания канала. При полном отсутствии глицина рецептор не активируется L-глутаматом [4, 5].

Цель исследования: Исследование уровня внутриклеточного Ca^{2+} в синапсомозгах мозга крыс, в норме и при хронической алкогольной интоксикации.

Материалы и методы исследования. Модельные эксперименты проводили на 20 беспородных белых

крысах самцах массой (200-250 г.) содержащиеся на стандартном рационе вивария. Все эксперименты выполняли в соответствии с требованиями "Всемирного общества защиты животных" и "Европейской конвенции по защите экспериментальных животных" [6]. Подсчитывали по каждой группе фоновые среднесуточные потребления 15% этанола на 1 кг веса. Контрольной группе животных в аналогичных условиях опыта вводили дистиллированную воду. Синапсомозги выделяли из мозга крысметодом двухэтапногоцентрифугирования [7]. Вся процедура выделения осуществлялась при 4 °С.

Для измерения количества цитозольного Ca^{2+} в синапсомозгах, выделенных из мозга крыс с хронической алкогольной интоксикацией помещенным в среду, аналогичную, той которая использовалась для выделения клеток, добавляли 20 мкМ хлортетрациклина (ХТЦ). Инкубировали 60 мин для достижения максимального взаимодействия ХТЦ с мембраносвязанным Ca^{2+} , как на плазматической, так и внутриклеточных мембранах. Длина волны возбуждения ХТЦ – 405 нм, регистрации – 530 нм. Результаты выражали в процентах, принимая за 100% разность между максимальным значением интенсивности флуоресценции (флуоресценция красителя, насыщенного Ca^{2+}) и минимальным ее значением (флуоресценция индикатора в отсутствие Ca^{2+}), полученным после добавления этиленгликоль-бис-аминоэтил-тетраацетат ЭГТА.

Измерение проводились с помощью флуориметра (Hitachi, Япония) и (Ocean Opticsinc., Firstin Photonics™, USB 2000.США, 2010.). Статистическую значимость различий между контрольными и опытными значениями определяли для ряда данных, используя парный t-тест, где контрольные и опытные значения взяты вместе, и непарный t-тест, если они взяты раздельно. Значение $P < 0,05$ указывало на статистически значимые различия.

Полученные результаты статистически обработаны на Origin 6.1 (OriginLab Corporation, США).

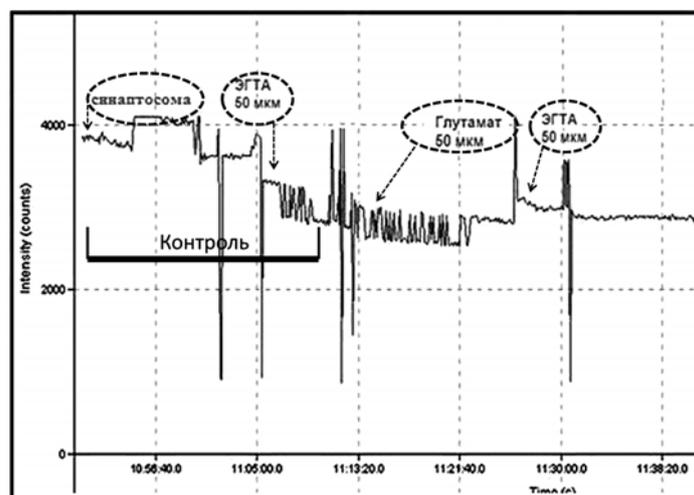


Рис.1. Влияние глутамата и ЭГТА на уровень внутриклеточного кальция в синапсомозгах мозга крыс (оригинальная запись)

Результаты и обсуждение. Исследовано влияние глутамата на уровень внутриклеточного кальция в си-

напсомозгах мозга контрольных крыс. Предварительно с помощью Ca^{2+} -чувствительного зонда хлортетрацикли-

на (ХТЦ) установлено отношение флуоресценции, возбуждаемой светом с длинами волн 340 и 380 нм (F_{340}/F_{380}) в синапсомемах. При удалении Ca^{2+} из внеклеточной среды, преинкубирование ЭГТА приводил к снижению флуоресценции на 5%. В присутствии в инкубационной среде ЭГТА, глутамат в концентрациях 1-100 мкМ дозозависимо увеличивает уровень флуоресценции на 5-10%, что свидетельствует об увеличении концентрации Ca^{2+} в цитозоле ($[Ca^{2+}]_i$), вызванное глутаматом, обусловленным в первую очередь активацией мембранной проницаемости, перемещением Ca^{2+} внутрь клетки и освобождением Ca^{2+} из внутриклеточных депо (рис.1.).

Известно, что ионы Mg^{2+} селективно блокируют активность NMDA-рецепторов. Глицин усиливает ответы NMDA-рецептора, увеличивая частоту открывания канала. При полном отсутствии глицина рецептор не активируется L-глутаматом.

В частности компоненты, выделенные из яда паука *Argiopo lobata*, A-V-2 (м.м. 637 Да) конкурентно ингибируют связывание глутамата, а аргиолобатин (AV-7-7 - м.м. 657 Да) увеличивает связывание L- 3H -глутамата с синаптическими мембранами подобно агентам, углубляющим десенситизацию глутаматных рецепторов.

Действительно, добавление в инкубационную среду 5мкМ глицина усиливало глутамат-зависимое увеличение флуоресценции на 15-20%. В то же время ионы Mg^{2+} (50мкМ) ингибировали глутамат-индуцируемое освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (рис. 2.A).

В ранее проведенных нами исследованиях в целях поиска новых блокаторов глутаматного рецептора из яда пауков семейства *Araneidae* выделен ряд низкомолекулярных компонентов (~1000Да). Последние подавляли токи, индуцируемые глутаматом, действуя на уровне рецептор-канального комплекса глутаматного рецептора.

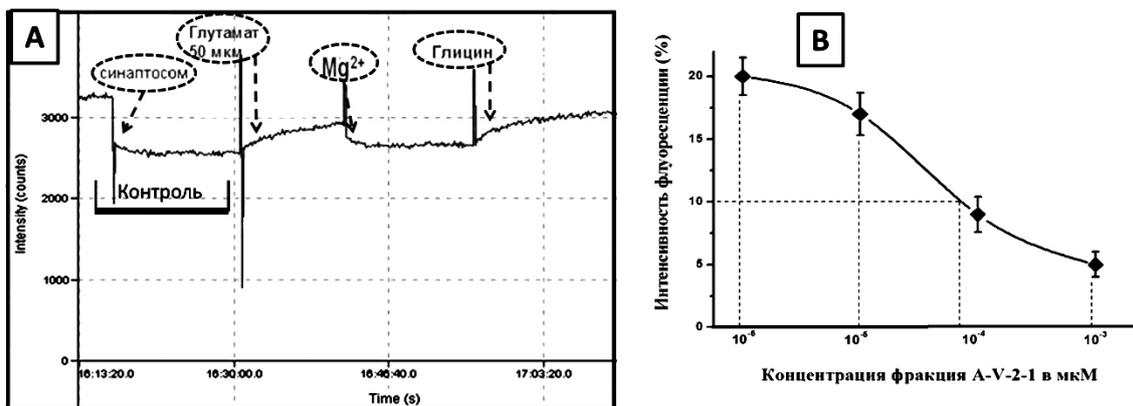


Рис. 2. А) Влияние ионов магния и глицина на глутамат-индуцированное изменение уровня внутриклеточного кальция. Изменение флуоресценции при добавлении глутамата (50 мкМ), магния (50 мкМ) и глицина (5 мкМ).
 В) Влияние фракции AV-2-1 на связывание $[^3H]$ -МК-801 с фракцией синапсомембранных мембран из мозга крыс

Примечание: во всех случаях $P < 0,05$ ($n = 6$)

При этом было установлено, что оба токсина взаимодействуют с NMDA-рецепторами. Токсин AV-2-1 в микромолярных концентрациях проявляет ингибирующее действие на связывание $[^3H]$ -МК-801 (NMDA-антагонист) с фракцией синаптических мембран. При этом AV-2-1 полностью снимает стимулирующий эффект глутамата. Из этого можно сделать вывод, что

токсин AV-2-1 конкурентно взаимодействует с глутаматными участками NMDA-рецепторов (рис.2.B).

В отличие от AV-2-1, аргиолобатин в разных концентрациях проявлял двухфазный характер действия, т.е. как потенцирующий, так и ингибирующий действием, специфически взаимодействуя с Ca^{2+} -каналами L-типа NMDA-рецептора.

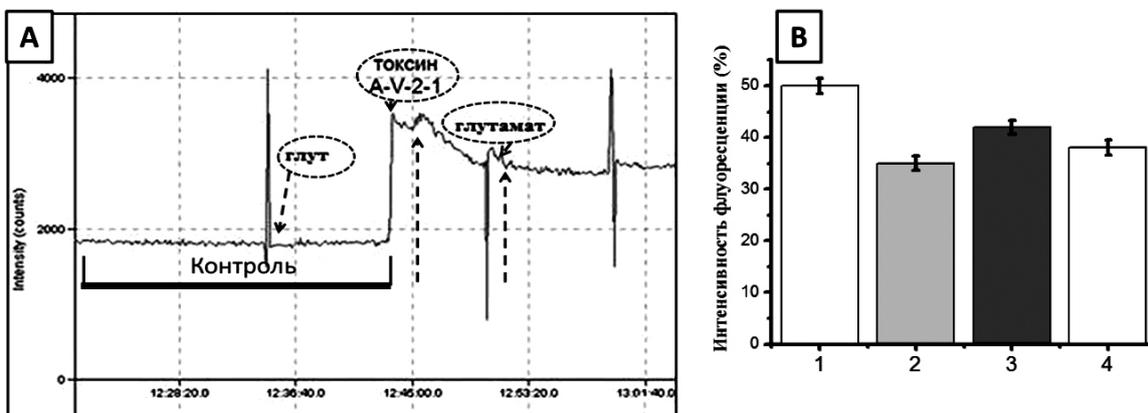


Рис.3. А) Влияние токсина AV-2-1 на глутамат-индуцированное изменение уровня внутриклеточного кальция.
 В) Влияние этанола на изменение мембраносвязанного Ca^{2+} в синапсомемах мозга крыс.
 1 – контроль, показание флуоресценции комплекса ХТЦ-синапсомема, интактных крыс.
 2 – флуоресценция комплекса ХТЦ-синапсомембрана мозга крыс при хронической алкогольной интоксикации;
 3 – при добавлении 50 мкМ глутамата; 4 – при добавлении 5 мкМ глицина

В дальнейших экспериментах была проверена специфичность взаимодействия глутамата с синапсомемами мозга крыс, в присутствии токсинов AV-2-1 и ар-

гиолобатина. Преинкубирование синапсомем с токсином AV-2-1 и аргиолобатина, затем добавление глутамата не приводило к увеличению флуоресценции, и

соответственно к увеличению уровня цитозольного кальция (рис.3.А).

Полученные результаты показывают, что токсины AV-2-1 и аргиолобатин блокируют связывание глутамата с NMDA-рецепторами.

Исследование уровня внутриклеточного Ca^{2+} в синапсосомах мозга крыс при хронической алкогольной интоксикации показало, что уровень флуоресценции комплекса ХТЦ-синапсосома ниже по сравнению с контролем. Добавление в инкубационную среду 50 мкМ глутамата не приводило к значительным изменениям флуоресценции соответственно клеточного метаболизма, обусловленным в первую очередь активацией мембранной проницаемости, перемещение Ca^{2+} внутрь клетки. Добавление в инкубационную среду 5 мкМ глицина также не влияло на уровень внутриклеточного Ca^{2+} (рис.3.В).

Таким образом, полученные результаты показывают, что хроническая алкогольная интоксикация приводит к повышению чувствительности NMDA-рецепторов и усилению кальциевого тока, что в свою очередь приводит к повышению внутриклеточной концентрации ионов кальция.

Результаты показывают, что методом флуоресценции, используя в качестве инструмента флуоресцентные зонды ХТЦ и Fura 2AM, блокаторы NMDA-рецепторов, AV-2-1 и аргиолобатин, можно исследовать механизмы регуляции глутаматергической нейромедиаторной системы.

Выводы. Результаты показывают, что токсины AV-2-1 и аргиолобатин блокируют связывание глутамата с NMDA-рецепторами. Хроническая алкогольная интоксикация приводит к повышению чувствительности

NMDA-рецепторов и усилению кальциевого тока, что в свою очередь приводит к повышению внутриклеточной концентрации ионов кальция.

Acknowledgements. Работа выполнена при финансовой поддержке Программы прикладных исследований АН РУзпо проекту ФА-А10-Т086 – "Разработка новых методов профилактики и лечения алкоголизма и связанных с ним осложнений". Конфликт интересов не заявляется.

Список использованных источников

1. Watkins J.C. Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors/ Watkins J.C., Olverman H.J.// Trends Neuroscience, Vol. 10. 1987. page – 265-272. Available from: <http://www.sciencedirect.com>
2. Devaud L.L. Ethanol dependence has limited effects on GABA or glutamate transporters in rat brain/ Devaud L.L.// Alcohol Clinical. Experimental Research – 2001. – Vol. 25, № 4. – p. 606-611. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
3. Maragos W.F. Anatomic correlation of NMDA [3H]-TCP-labelled receptors in rat brain/ Maragos W.F., Penney J.B., Young A.B. // Journal Neuroscience – 1988. – Vol. 8, N 2. – p. 493-501. Available from: www.jneurosci.org
4. Tsai G.E. The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism/ Tsai G.E., Coyle J.T.// Annual Review. Medicine Select Topical Clinical Science – 1998. –Vol. 49. – p.173-184. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
5. Бонитенко Ю. Ю. Острые отравления этанолом и его суррогатами. – СПб.: Изд-во "ЭЛБИ-СПБ", 2005. – 225 с. Available from: <http://www.booksmed.com>
6. "Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях". Страсбург, 18 марта 1986 года. Available from: <http://conventions.coe.int>
7. Weiler, M.H. Choline uptake and acetylcholine synthesis in synaptosomes: Investigations using two differently labelled variants of choline / Weiler, M.H., C.B. Gundersen., D.J. Jenden. // Journal Neurochemistry – 1981, № 36. – p.1802-1812. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com>

Надійшла до редколегії 02.09.15

Н. Хошімов, молод. наук співроб., К. Насиров, д-р біол. Наук
Інститут біоорганічної хімії ім. академіка А.С. Садикова, Ташкент, Республіка Узбекистан

ДОСЛІДЖЕННЯ РІВНЯ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ Ca^{2+} У СІНАПСОМАХ МОЗКУ ЩУРІВ В НОРМІ І ПРИ ХРОНІЧНІЙ АЛКОГОЛЬНІЙ ІНТОКСИКАЦІЇ

У статті розглянуто механізми дії етанолу на іонні канали синапсомозку щурів. Досліджено вплив глутамату на рівень внутрішньоклітинного кальцію в синапсосомах мозку контрольних щурів, викликане глутаматом, що обумовлене в першу чергу активацією мембранної проникності, переміщенням Ca^{2+} в середину клітини і звільненням Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо.

Ключові слова: синапсосоми, глутамат, NMDA, глицин, магній, аргиолобатин, етанол

N. Hoshimov, junior researcher., K. Nasirov, DSc
Institute of Bioorganic Chemistry. Academic A. S. Sadykov, Tashkent, Republic of Uzbekistan

RESEARCH OF LEVEL OF INTRACELLULAR Ca^{2+} IN SYNAPTOSOMES OF THE BRAIN OF RATS, IN NORM AND AT CHRONIC ALCOHOLIC INTOXICATION

Studying of mechanisms of effect of ethanol on ionic canals synaptosome a brain of rats. Influence of a glutamate on the level of intracellular calcium in the synaptosomes of a brain of control rats is investigated. Caused by the glutamate first of all by activation of membrane permeability, movement of Ca^{2+} in a cage and release of Ca^{2+} from intracellular depots.

Key words: synaptosomes, glutamate, NMDA, glycine, magnesium, argiolobatin, ethanol.

УДК:579.083.13;616.39:613.24

А. Польшакова, студ., М. Яшук, студ., І. Прибитько, канд. біол. наук, Т. Фалалєєва, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
Н. Кобиляк, канд. мед. наук
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ

ПАРАМЕТРИ ЛІПІДНОГО ОБМІНУ ПРИ ГЛУТАМАТ-ІНДУКОВАНОМУ ОЖИРІННІ У ЩУРІВ ЗА УМОВ КОРЕКЦІЇ ПРОБІОТИЧНИМИ ШТАМАМИ ЛАКТОБАЦИЛ ТА БІФІДОБАКТЕРІЙ

Дослідили вплив пробіотикотерапії на ліпідний обмін щурів, яким після народження вводили глутаматнатрію. Ожиріння викликали шляхом неонатального введення глутамату натрію (4 мг/г, підшкірно) на 2, 4, 6, 8, 10 день життя. Введення пробіотиків починали через 4 тижні після народження та продовжували двоцикловими курсами з перервами у 2 тижні. Через 4 місяці у щурів всіх груп було визначено вмісту холестерину, тригліцеридів, ліпопротеїдів високої щільності, ліпопротеїдів низької щільності, ліпопротеїдів дуже низької щільності сироватки крові. Неонатальне введення глутамату натрію призводило до зростання вмісту тригліцеридів, холестерину, ліпопротеїдів дуже низької щільності та зниження вмісту ліпопротеїдів високої щільності. Періодичне введення комбінованих пробіотиків запобігало суттєвим порушенням ліпідного обміну у щурів з ожирінням гіпоталамічного генезу. Найбільш значний ефект мав комбінований пробіотик на основі штамів *Lactobacillus casei* IMVB-7280, *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB. Періодичне введення пробіотичних штамів біфідобактерій та лактобацил запобігало порушенню ліпідного обміну, що викликане ожирінням гіпоталамічного генезу.

Ключові слова: ожиріння, обмін речовин, цукровий діабет 2 типу, пробіотики.

Вступ. Обмін речовин є одним з найважливіших процесів для підтримання життєдіяльності і гомеостазу

організму. Відомо, що здоров'я формується в дитячому віці, і багато функціональних порушень, що спостеріга-