

Copyright © 2015 by Academic Publishing House *Researcher*



Published in the Russian Federation
Russian Journal of Biological Research
Has been issued since 2014.
ISSN: 2409-4536
Vol. 4, Is. 2, pp. 60-67, 2015

DOI: 10.13187/ejbr.2015.4.60
www.ejournal23.com



Articles and Statements

UDC 616.8; 577.2.04; 612.8

The Research of Action of Preparations Rutan and Gossitan on the Glutamate Eksitotoxic Mediated by NMDA-receptor at Chronic Alcoholic Intoxication and Cancellation of Ethanol

¹ Nozim Khoshimov

² Kabil Nasirov

³ Rakhmatilla Rakhimov

¹ A.S.Sadikov Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Uzbekistan

E-mail: Nozimka@inbox.ru

² A.S.Sadikov Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Uzbekistan

Doctor biological sciences, leading scientific researcher

E-mail: K_nasirov@front.ru

³ A.S.Sadikov Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Uzbekistan

E-mail: rrakhimov.83@mail.ru

Abstract

It is investigated actions of a rutan on synaptosomes of a brain of model rats with chronic alcoholic intoxication it is revealed that rutan slightly increases fluorescence, respectively a level of cytochindery calcium in comparison with control. Results show about the possible competition between rutany and a glutamate for a site of regulation of opening of ionic channels, possibility of application of a rutan as the exciting neurotransmitter at chronic alcoholic intoxication.

At research of action of a gossitan on sinaptosoma of a brain of model rats with chronic alcoholic intoxication it is revealed that gossitan slightly reduces fluorescence according to the level of cytochindery calcium in comparison with control. Results show that a preparation gossitan don't compete with a glutamate for a binding site. Perhaps, their action is caused by interaction with ionic channels of NMDA receptors.

Keyword: synaptosomes, glutamate, NMDA, rutan, gossitan, ethanol.

Введение

Одним из нейрональных механизмов, опосредующих острые эффекты этанола, является снижение глутаматергической нейротрансмиссии [1]. Этанол действует как антагонист N-метил-D- аспартатных (NMDA) рецепторов, одного из подтипов глутаматных ионотропных рецепторов [1-3], что, несомненно, играет роль в механизмах, лежащих в основе развития алкогольной интоксикации и алкогольного абстинентного синдрома (ААС) [4]. Хроническая алкогольная интоксикация вызывает компенсаторное увеличение

чувствительности отдельных субъединиц NMDA рецепторов, а также увеличение плотности самих рецепторов в различных областях головного мозга [5, 6]. ААС в результате отмены этанола, сопровождающийся, в частности, судорогами, связан с усилением глутаматергической передачи, происходящим также за счет увеличения высвобождения глутамата [7].

Известно, что отмена этанола при хронической алкогольной интоксикации сопровождается усилением глутаматергической передачи, происходящей за счет увеличения высвобождения глутамата. Возбуждающий нейротрансмиттер глутамат может вызывать повреждение и смерть ДА-нейронов, в связи с чем повреждающее действие глутамата на нейроны обозначено термином «токсичность возбуждающих аминокислот», или «эксайтотоксичность» [8-10].

Эксайтотоксичность глутамата опосредуется NMDA-рецепторами, названными по специфическому антагонисту N-метил-D-аспартату. При взаимодействии глутамата с этими рецепторами открываются ионные каналы нейронной мембраны и осуществляется вход глутамата в нейрон. Экстенсивное связывание глутамата NMDA-рецепторами приводит к усилению тока Ca^{2+} в нейрон через каналы NMDA-рецепторов. В связи с тем, что усиление тока Ca^{2+} является одним из ведущих механизмов гибели нейрона, можно полагать, что механизм эксайтотоксичности глутамата при болезни Паркинсона (БП) связан с массивным входом Ca^{2+} в ДА-нейроны черной субстанции [8, 11]. Нарушение глутаматергической передачи рассматривают в настоящее время также в качестве ведущего фактора в патогенезе таких заболеваний, как эпилепсия, болезнь Альцгеймера и др. [12-14]

Цель исследования: Действия препаратов рутана и госситана на эксайтотоксичность глутамата, опосредуемое NMDA-рецепторами при хронической алкогольной интоксикации и отмене этанола.

Материалы и методы

Модельные эксперименты проводили на белых беспородных крысах (200–250 г.) Подсчитывали по каждой группе фоновые среднесуточные потребления 15%ного этанола на 1 кг веса. Контрольной группе животных в аналогичных условиях опыта вводили дистиллированную воду. Синаптосомы выделяли из мозга крыс методом двухэтапного центрифугирования [15]. Вся процедура выделения осуществлялась при 4 °С.

Для измерения количества цитозольного Ca^{2+} в синаптосомах, 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 Optics inc., First in Photonics™. USB 2000. 2010 год 19 ноябрь. США). 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).

Результаты и обсуждение

В связи с этим, нами было исследовано действие противовирусного, противогриппозного препаратов рутана и госситана против эксайтотоксического действия глутамата.

Действие препарат рутана (3,6-бис-О-галлоил-1,2,4-три-О-галлоил-β-D-глюкоза), выделенного из растений *Rhus coriária*) на цитозольного Ca²⁺ в синапсоммах мозга крыс (рис. 1).

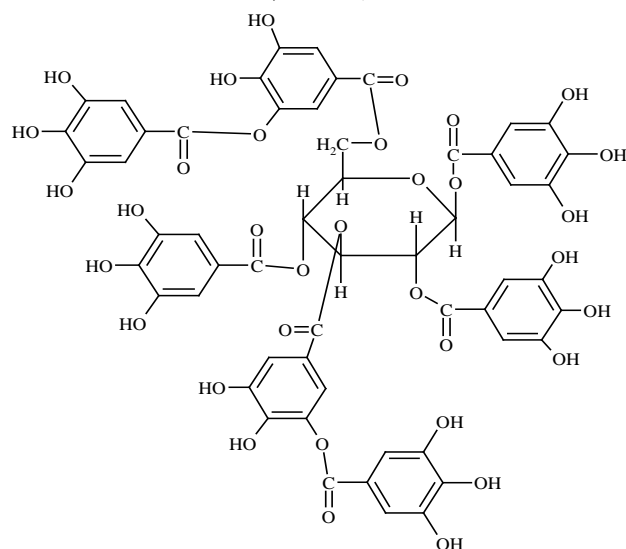


Рис. 1. Химическое формула рутана (C₅₅H₄₀O₃₄), молекулярная масса 1244

Действие препарат Госситана ((+) – галлокатехин -7-0-(β-D-Glcp) - 4β → 8)-(-) – [Эпикатехин]₇- 4β → 8)-(-)– эпигаллокатехин-5-0-(β-D- Glcp), выделенного из растений (*Gossipium L. сем. Malvaceae*) на цитозольного Ca²⁺ в синапсоммах мозга крыс(рис. 2).

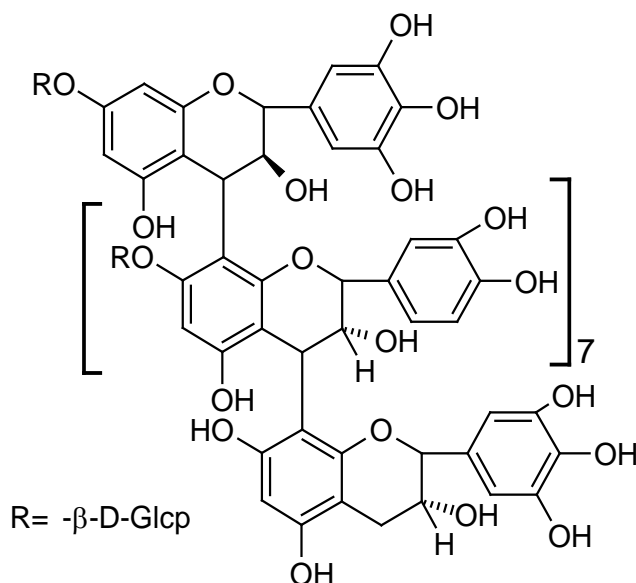


Рис. 2. Химическое формула Госситана (C₁₇₇H₁₅₄O₈₅), молекулярная масса 3638

Исследовано действие препаратов рутана и госситана на глутаматергическую нейромедиаторную систему в синапсоммах мозга контрольных крыс. Эти препараты в концентрациях 10-50 мкМ по-разному влияли на комплекс ХТЦ-синапсомма.

Преинкубирование рутана (10-100 мкМ) с комплексом ХТЦ-синапсомма, не увеличивал уровень флуоресценции. В то же время рутан (50 мкМ) снижал флуоресценцию и соответственно увеличение уровня цитозольного кальция на фоне глутамата (50 мкМ) на комплекс ХТЦ-синапсомма (рис. 3).

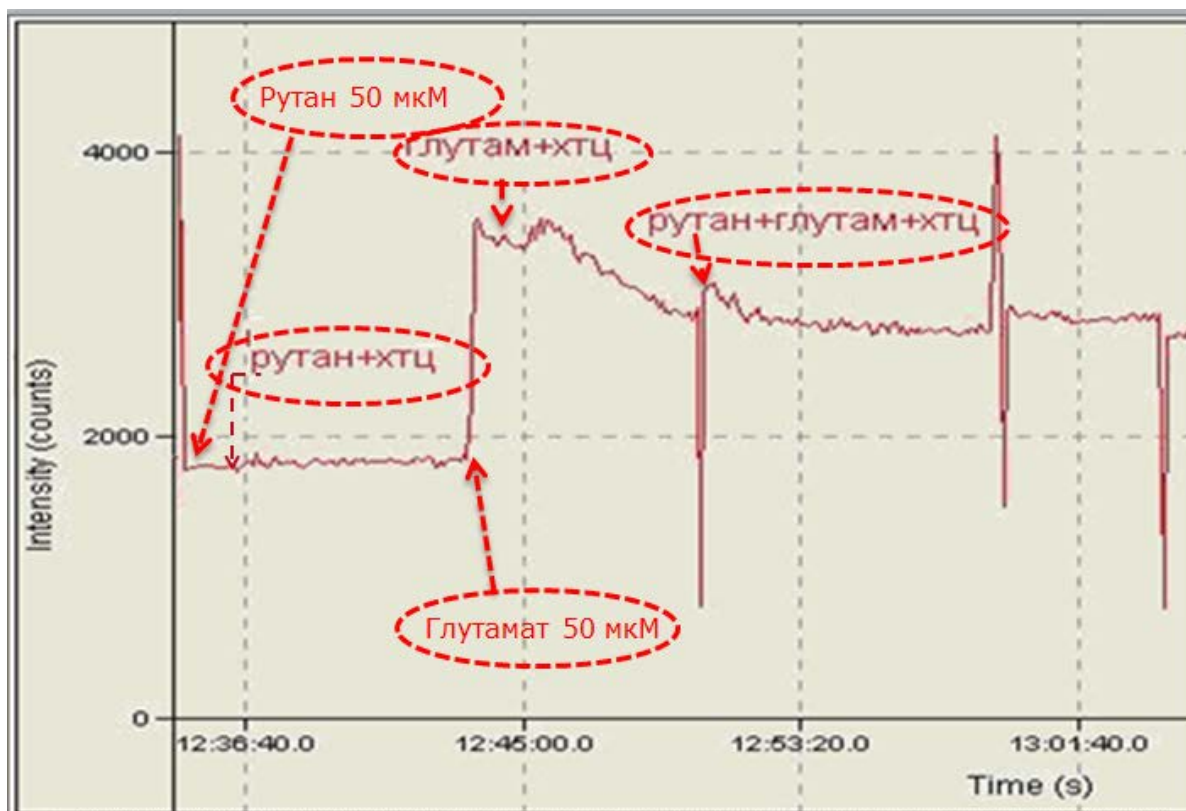


Рис. 3. Влияние препарата рутана на глутамат-индуцированную флуоресценцию

При исследовании действия рутана на синапсомы мозга модельных крыс с хронической алкогольной интоксикацией выявлено, что рутан незначительно увеличивает флуоресценцию, соответственно уровень цитозольного кальция в сравнении с контролем.

Предварительное преинкубирование рутана (10 мкМ) с синаптическими мембранами, затем добавление ХТЦ-глутамата приводило к снижению флуоресценции и уровень цитозольного кальция соответственно. Дозозависимое увеличение концентрации рутана до 10-100 мкМ, соответственно приводило к дозозависимому снижению эффекта глутамата (рис. 4). Полученные результаты показывают о возможной конкуренции между рутаном и глутаматом за участок регуляции открывания ионных каналов.

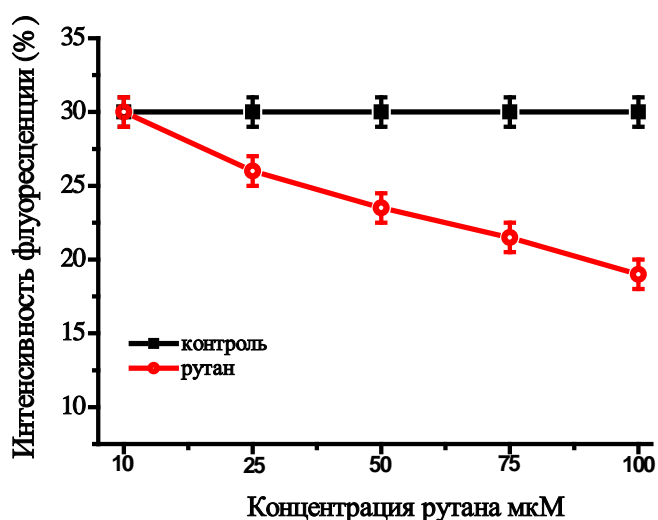


Рис. 4. Дозозависимое влияние препарата рутана на глутамат-индуцированную флуоресценцию

В следующих экспериментах исследовано действие рутана на синапсомы мозга модельных крыс с хронической алкогольной интоксикацией, после отмены алкоголя. При этом выявлено, что рутан незначительно увеличивает флуоресценцию и уровень цитозольного Ca^{2+} , соответственно в синаптических мембранах по сравнению с контролем.

Полученные результаты указывают на возможность применения рутана в качестве возбуждающего нейротрансмиттера при хронической алкогольной интоксикации.

При исследовании действия препарата госситана на синапсомы мозга модельных крыс с хронической алкогольной интоксикацией выявлено, что госситан незначительно снижает флуоресценцию соответственно уровню цитозольного кальция в сравнении с контролем. В тоже время преинкубирование госситана в концентрациях 10 мкМ с синаптическими мембранами, приводил к снижению флуоресценции и уровню цитозольного кальция ХТЦ-глутамата комплекса соответственно. Дозозависимое увеличение концентрации госситана до 10–100 мкМ, не приводило к дозозависимому снижению эффекта глутамата. Полученные результаты показывают, что препарат госситан не конкурирует с глутаматом за участок связывания. Возможно, их действие обусловлено взаимодействием с ионными каналами NMDA-рецепторов.

Для выявления возможного взаимодействия госситана с участками перевозбуждения NMDA-рецепторов, ответственных за открытие кальциевых каналов, исследовано их действие на фоне блокатора кальциевого канала нифедипина.

Преинкубирование госситана с комплексом ХТЦ-синапсомы, приводило к значительному снижению флуоресценции. Преинкубирование госситана на фоне нифедипина с комплексом ХТЦ-синапсомы, приводил к незначительному снижению флуоресценции (рис. 5), что указывает на конкуренцию между алкалоидами и нифедипином за участок регулирования дигидропиридин-чувствительных кальциевых каналов.

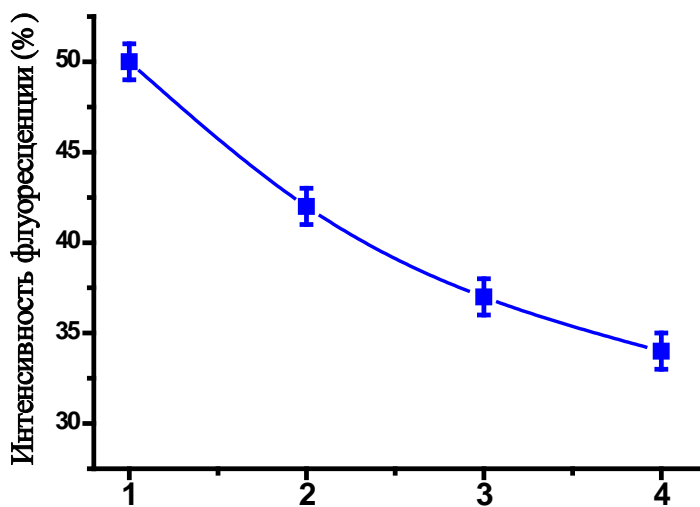


Рис. 5. Влияние госситана на кальций-зависимые процессы NMDA-рецептора на фоне нифедипина.

- 1 – контроль (комплекс ХТЦ-синапсомы); 2 – преинкубирование госситана с комплексом ХТЦ-синапсомы; 3 – преинкубирование нифедипина с комплексом ХТЦ-синапсомы; 4 – преинкубирование госситана на фоне нифедипина с комплексом ХТЦ-синапсомы

При исследовании действия госситана на синапсомы мозга крыс с хронической алкогольной интоксикации при отмене этанола, выявлено явное снижение флуоресценции и соответственно уровня цитозольного кальция (рис. 6).

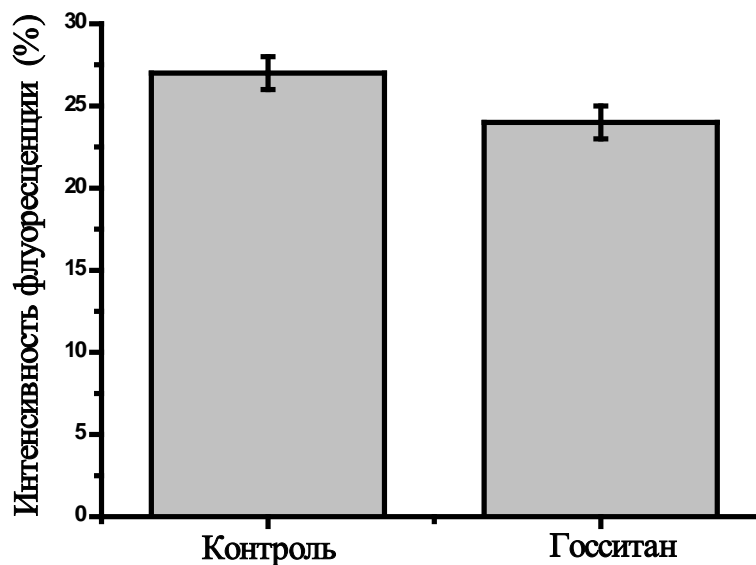


Рис. 6. Влияние госситана на синапсомы мозга крыс с хронической алкогольной интоксикации при отмене этанола

Полученные результаты показывают о возможности применения госситана в регуляции дигидропиридин-чувствительных кальциевых каналов основных подтипов нейрональных рецепторов, вовлеченных в механизмы, лежащие в основе ААС (включая судорожные припадки) и эффективно купировать их.

Таким образом, исследование фармакологических свойств некоторых биологически активных соединений, проведенных на модельных крысах с хронической алкогольной интоксикацией показали, что среди них имеются перспективные соединения, обладающие свойствами аналептиков, что дает возможность к их применению для лечения ААС.

Выводы

Результаты показывают о возможной конкуренции между рутаном и глутаматом за участок регуляции открывания ионных каналов и возможность применения рутана в качестве возбуждающего нейротрансмиттера при хронической алкогольной интоксикации. Госситан не конкурирует с глутаматом за участок связывания. Возможно, их действие обусловлено взаимодействием с ионными каналами NMDA-рецепторов и возможности применения госситана в регуляции дигидропиридин-чувствительных кальциевых каналов основных подтипов нейрональных рецепторов, вовлеченных в механизмы, лежащие в основе ААС (включая судорожные припадки) и эффективно купировать их.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы прикладных исследований АН РУз (по проекту ФА-А10-Т086 - «Разработка новых методов профилактики и лечения алкоголизма и связанных с ним осложнений»). Конфликт интересов не заявляется.

Примечания:

1. Martin, J.F. Influence of platelet size on outcome after myocardial infarction / Martin J.F., Bath P.M.W., Burr M.L. // Lancet. 1991. Vol. 338. P. 1409-1411.
2. Lima-Landman MTR, Albuquerque EX (1989) Ethanol potentiates and blocks NMDA-activated single-channel currents in rat hippocampal pyramidal cells. FEBS Lett 247:61–67
3. White G, Lovinger DM, Weight FF (1990) Ethanol inhibits NMDA-activated current but does not alter GABA-activated current in an isolated adult mammalian neuron. Brain Res 507(2):332–336.

4. Simson P.E., Criswell H.E., Johnson K.B. et al. Ethanol inhibits NMDA-evoked electrophysiological activity in vivo // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* -1991.-Vol. 257(1).-P. 225-231.
5. Gulya K., Grant K.A., Valverius P. et al. Brain regional specificity and time-course of changes in the NMDA receptor-ionophore complex during ethanol withdrawal // *Brain Res.* 1991. Vol. 547(1). P. 129-134.
6. Parsons C.G., Danysz W., Quack G. Glutamate and CNS disorders as a target for drug development: An update // *Drug News Perspect.* 1998. Vol. 11(9). P. 523-569.
7. Dahchour, A.; De Witte, Ph. Effect of Repeated Ethanol Withdrawal on Glutamate Microdialysate in the Hippocampus. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 2006. Vol.23. №10.
8. Крыжановский Г.Н., Карабань И.Н., Магаева С.В., Кучеряну В.Г., Карабань Н.В. Болезнь Паркинсона (этиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика). 2002. 315 с.
9. Левин О.С., Федорова Н.В. Болезнь Паркинсона. М.: Медпрессинформ, 2012. 315 с.
10. Olanow C.W., Stern M.B., Sethi K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson's disease // *Neurology.* 2009. V. 72, 21, Suppl. 4. 149 p.
11. Литвиненко И.В. Болезнь Паркинсона. М.: Миклош, 2006. 216 с.
12. Федорова Н.В., Ветохина Т.Н. Диагностика и лечение нейролептических экстрапирамидных синдромов: Учебно-методическое пособие. М.: РАМПО, 2006. 36 с.
13. Шток В.Н., Иванова-Смоленская И.А., Левин О.С., Федорова Н.В. Экстрапирамидные расстройства. Руководство для практических врачей. М.: Медпрессинформ, 2002. 606 с.
14. Saniova B., Drobny M., Lehotsky J., Sulaj M. Biochemical and clinical improvement of cytotoxic state by amantadine sulphate // *Cellular and Molecular Neurobiology.* 2006. V. 26, Nov. 7/8. P. 1475-1482.
15. Weiler, M. H., C. B. Gundersen, and D. J. Jenden (1981) Choline uptake and acetylcholine synthesis in synaptosomes: Investigations using two differently labelled variants of choline. *J. Neurochem.* 36: 1802-1812.

References:

1. Martin, J.F. Influence of platelet size on outcome after myocardial infarction / Martin J.F., Bath P.M.W., Burr M.L. // *Lancet.* 1991. Vol. 338. P. 1409-1411.
2. Lima-Landman MTR, Albuquerque EX (1989) Ethanol potentiates and blocks NMDA-activated single-channel currents in rat hippocampal pyramidal cells. *FEBS Lett* 247:61–67
3. White G, Lovinger DM, Weight FF (1990) Ethanol inhibits NMDA-activated current but does not alter GABA-activated current in an isolated adult mammalian neuron. *Brain Res* 507(2):332–336
4. Simson P.E., Criswell H.E., Johnson K.B. et al. Ethanol inhibits NMDA-evoked electrophysiological activity in vivo // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991. Vol. 257(1). P. 225-231.
5. Gulya K., Grant K.A., Valverius P. et al. Brain regional specificity and time-course of changes in the NMDA receptor-ionophore complex during ethanol withdrawal // *Brain Res.* 1991. Vol. 547(1). P. 129-134.
6. Parsons C.G., Danysz W., Quack G. Glutamate and CNS disorders as a target for drug development: An update // *Drug News Perspect.* 1998. Vol. 11(9). P. 523-569.
7. Dahchour, A.; De Witte, Ph. Effect of Repeated Ethanol Withdrawal on Glutamate Microdialysate in the Hippocampus. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 2006. Vol.23. №10.
8. Krojanovskiy G.N., Karaban I.N., Magaeva S.V., Kucheryanu V.G., Karaban N.V. Bolezn Parkinsona (etiologiya, patogenez, klinika, diagnostika, lechenie, profilaktika). 2002. 315 s.
9. Levin O.S., Fedorova N.V. Bolezn Parkinsona. M.: Medpressinform, 2012. 315 s.
10. Olanow C.W., Stern M.B., Sethi K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson's disease // *Neurology.* 2009. V. 72, 21, Suppl. 4. 149 p.
11. Litvinenko I.V. Bolezn Parkinsona. M.: Miklosh, 2006. 216 s.
12. Fedorova N.V., Vetoxina T.N. Diagnostika i lechenie neyrolepticheskix ekstrapiramidnix sindromov: Uchebno-metodicheskoe posobie. M.: RAMPO, 2006. 36 s.

13. Shtok V.N., Ivanova-Smolenskaya I.A., Levin O.S., Fedorova N.V. Ekstrapiramidnoe rasstroystvo. Rukovodstvo dlya prakticheskix vrachev. M.: Medpress-inform, 2002. 606 s.

14. Saniova B., Drobny M., Lehotsky J., Sulaj M. Biochemical and clinical improvement of cytotoxic state by amantadine sulphate // Cellular and Molecular Neurobiology. 2006. V. 26, Nov. 7/8. P. 1475-1482.

15. Weiler, M. H., C. B. Gundersen, and D. J. Jenden (1981) Choline uptake and acetylcholine synthesis in synaptosomes: Investigations using two differently labelled variants of choline. J. Neurochem. 36: 1802-1812.

УДК 616.8; 577.2.04; 612.8

Исследование действия препаратов рутана и госситана на эксайтотоксичность глутамата, опосредуемое NMDA-рецепторами при хронической алкогольной интоксикации и отмене этанола

¹ Нозим Нумонжонович Хошимов

² Кабул Эркинович Насиров

³ Рахматилла Нуриллаевич Рахимов

¹ Институт биоорганической химии им. академика А.С.Садыкова, Узбекистан
ул. М.Улугбека, 83, г. Ташкент, 100125
E-mail: Nozimka@inbox.ru

² Институт биоорганической химии им. академика А.С.Садыкова, Узбекистан
ул. М.Улугбека, 83, г. Ташкент, 100125
Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник.
E-mail: K_nasirov@front.ru

³ Институт биоорганической химии им. академика А.С.Садыкова, Узбекистан
ул. М.Улугбека, 83, г. Ташкент, 100125
E-mail: rrakhimov.83@mail.ru

Аннотация. Исследовано действия рутана на синапсомы мозга модельных крыс с хронической алкогольной интоксикацией выявлено, что рутан незначительно увеличивает флуоресценцию, соответственно уровень цитозольного кальция в сравнении с контролем. Результаты показывают о возможной конкуренции между рутаном и глутаматом за участок регуляции открывания ионных каналов, возможность применения рутана в качестве возбуждающего нейротрансмиттера при хронической алкогольной интоксикации.

При исследовании действия госситана на синапсомы мозга модельных крыс с хронической алкогольной интоксикацией выявлено, что госситан незначительно снижает флуоресценцию соответственно уровню цитозольного кальция в сравнении с контролем. Результаты показывают, что препарат госситан не конкурирует с глутаматом за участок связывания. Возможно, их действие обусловлено взаимодействием с ионными каналами NMDA-рецепторов.

Ключевые слова: синапсомы, глутамат, NMDA, рутан, госситан, этанол.