

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ВА ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ  
УНИВЕРСИТЕТИ ХУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ  
DSc.27.06.2017. В.38.01 РАҚАМЛИ  
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

---

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ**

**ХОШИМОВ НОЗИМЖОН НУМОНЖОНОВИЧ**

**КАЛАМУШ МИЯСИ СИНАПТОСОМАЛАРИ  $Ca^{2+}$ -  
ТРАНСПОРТИГА ПОЛИФЕНОЛ (РУТАН, ГОССИТАН)  
ВА АЛКАЛОИД (ДЕЗОКСИПЕГАНИН)  
ТАЪСИРИНИ ТАВСИФЛАШ**

**03.00.08 – Одам ва ҳайвонлар физиологияси**

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)  
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

**Тошкент – 2018**

**Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси автореферати мундарижаси**

**Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)**

**Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)**

**Хошимов Нозимжон Нумонжонович**

Каламуш мияси синаптосомаларидаги  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортига полифенол (рутан, госситан) ва алкалоид (дезоксипеганин) таъсирини тавсифлаш..... 3

**Хошимов Нозимжон Нумонжонович**

Характеристика действия полифенолов (рутана, госситана) и алкалоида (дезоксипеганина) на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в синаптосомах мозга крыс..... 21

**Khoshimov Nozimjon Numonjonovich**

Characteristics of the action of polyphenols (rutan, gossitan) and alkaloid (desoxypeganin) on the transport of  $\text{Ca}^{2+}$  in the brain synaptosomes of rats..... 39

**Эълон қилинган ишлар рўйхати**

Список опубликованных работ

List of published works..... 43

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ВА ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ  
УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ  
DSc.27.06.2017. В.38.01 РАҚАМЛИ  
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

---

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ**

**ХОШИМОВ НОЗИМЖОН НУМОНЖОНОВИЧ**

**КАЛАМУШ МИЯСИ СИНАПТОСОМАЛАРИ  $Ca^{2+}$ –  
ТРАНСПОРТИГА ПОЛИФЕНОЛ (РУТАН, ГОССИТАН)  
ВА АЛКАЛОИД (ДЕЗОКСИПЕГАНИН)  
ТАЪСИРИНИ ТАВСИФЛАШ**

**03.00.08 – Одам ва ҳайвонлар физиологияси**

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)  
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

**Тошкент – 2018**

**Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида B2017.1.PhD/B28 рақам билан рўйхатга олинган.**

Диссертация иши Биоорганик кимё институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус ва инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб саҳифасида (info@microbio.uz) ҳамда «ZiyoNet» Ахборот-таълим порталида (www.ziynet.uz) жойлаштирилган.

**Илмий раҳбар:**

**Насиров Қобил Эркинович**  
биология фанлари доктори

**Расмий оппонентлар:**

**Кучкарова Любовь Салижановна**  
биология фанлари доктори, профессор

**Есимбетов Адилбай Тлепович**  
биология фанлари номзоди, доцент

**Етакчи ташкилот:**

**Андижон давлат университети**

Диссертация ҳимояси Микробиология институти ва Ўзбекистон Миллий университети ҳузуридаги DSc.27.06.2017.B.38.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2018 йил «24» апрель соат 10:00 даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100128, Тошкент ш., Шайхонтохур тумани, А.Қодирий кўчаси 7 б-уй, Микробиология институти мажлислар зали. Тел.: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, факс: (+99871) 241-92-71, e-mail: info@microbio.uz).

Диссертация билан Микробиология институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (7 рақами билан рўйхатга олинган). (Манзил: 100128, Тошкент ш., Шайхонтохур тумани, А.Қодирий кўчаси 7 б-уй, Микробиология институти маъмурий биноси, 3-кават, мажлислар зали. Тел.: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98.

Диссертация автореферати 2018 йил «12» апрель куни тарқатилди.  
(2018 йил «12» апрелдаги 7 рақамли реестр баённомаси).



**Арипов Тахир Фатихович**  
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш раиси,  
б.ф.д., академик

**Ахмедова Захро Рахматовна**  
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш илмий  
котиби в.б, б.ф.д., профессор

**Рахимова Тўраҳон Узоқовна**  
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш  
кошидаги илмий семинар раиси,  
б.ф.д., профессор

## КИРИШ (фалсафа доктори (PhD) диссертацияси аннотацияси)

**Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати.** Бугунги кунда дунёда нерв хужайраларида  $Ca^{2+}$ -гомеостазининг бузилишидан келиб чиқувчи, ижтимоий аҳамиятга эга бўлган нейродегенератив касалликлар сонининг барқарор ҳолатда ортиб бориши кузатилмоқда<sup>1,2</sup>. Нейродегенератив касалликларни, шунингдек, токсикологик ва наркологик заҳарланиш патогенезида зарарланувчи марказий/периферик нерв тизимини даволашда ўсимликлардан ажратиб олинган биологик фаол бирикмалар самарали нейропротектор, антитоксик препаратларни яратишда истиқболли манбалар сифатида фойдаланилади.

Ҳозирги кунда жаҳон миқёсида ушбу йўналишда амалга оширилган илмий тадқиқотларда нейродегенератив касалликлар бош мия симпатик ва парасимпатик нерв тизими хужайраларининг функционал фаоллигини ифодалаб берувчи ион-транспорт тизимлари ва рецепторлар комплексининг дисфункцияси асосида келиб чиқиши аниқланган. Нерв хужайраларида сигнал трансдукцияси ва қўзғалиш/тормозланиш жараёнларини бошқаришда  $Ca^{2+}$ -транспорти марказий компонентлардан бири бўлиб, бош мия синаптосомаларида  $[Ca^{2+}]_{in}$  гомеостази дисфункцияси жиддий патологик ҳолатларга сабаб бўлиши қайд қилинган. Шу нуқтаи назардан, патологик шароитда бош мия синаптосомаларида  $Ca^{2+}$ -транспортини биологик фаол моддалар ёрдамида фармакологик коррекциялаш механизмларини тадқиқ қилиш масаласи долзарб, илмий–амалий аҳамиятга эга ҳисобланади.

Ҳозирги кунда республикамизда нерв тизими касалликларига ташхис қўйиш ва даволаш муассасаларининг моддий-техник базасини такомиллаштириш, фармацевтик препаратлар билан таъминлаш йўналишида сезиларли ислохотлар амалга оширилди. Мазкур йўналишда амалга оширилган дастурий чора-тадбирлар асосида муайян натижаларга, жумладан, нейродегенератив касалликларни даволаш ва профилактика қилиш мақсадида самарали нейропротектор дори воситаларини яратиш йўналишида муайян ютуқларга эришилди. Такидлаш жоизки, нерв хужайралари  $Ca^{2+}$ -гомеостазининг бузилишидан келиб чиқувчи, нейродегенератив касалликлар, токсикологик ва наркологик заҳарланиш оқибатида нерв хужайраларининг ўзгариши орқали бўладиган касалликларни ташхислашнинг замонавий усуллари ишлаб чиқиш борасидаги тадқиқот ишларини олиб бориш катта аҳамиятга эгадир. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида «фармацевтика саноатини янада ривожлантириш, аҳоли ва тиббиёт муассасаларининг арзон, сифатли дори воситалари билан таъминлаш» вазифаси белгилаб берилган. Бу ўринда маҳаллий хом ашёлар асосида жаҳон бозорида рақобатлаша оладиган нейропротектор дори воситаларини яратиш муҳим аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2011 йил 28 ноябрдаги ПҚ-1652-сон «Соғлиқни сақлаш тизимини ислоҳ қилишни янада чуқурлаштириш

<sup>1</sup> The World Health Organization ([www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics))

<sup>2</sup> World Federation of Neurology ([www.wfnurology.org](http://www.wfnurology.org))

чора-тадбирлари тўғрисида» ги Қарори ва 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида» ги Фармони ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

**Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг асосий устувор йўналишларига мослиги.** Мазкур тадқиқот Республика фан ва технологиялар ривожланишининг VI. «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

**Муаммонинг ўрганилганлик даражаси.** *In vitro* ва *in vivo* шароитида нерв хужайралари функционал фаоллигида  $[Ca^{2+}]_{in}$  динамикасининг аҳамияти ва регуляция механизмларини ўрганиш йўналишида иш олиб борган бир қатор олимлар, жумладан, Bhandage A.K. (2016) ишларида марказий нерв тизимида ионотроп/метаботроп каскадлар орқали таъсир кўрсатувчи асосий кўзгатувчи/тормозловчи нейротрансмитерлардан бири бўлган –  $\gamma$ -аминомой кислота (ГАМК) таъсирида фаоллашувчи ГАМК–рецепторининг фармакологик регуляция механизмлари тадқиқ қилинган. Бунда глутамат ионотроп каскад орқали – глутамат рецептори (*i*Glu–AMPA/каинат ва NMDA–рецептори), ГАМК эса, ГАМК–А–рецептори орқали таъсир кўрсатиши аниқланган. Tagliaferri S. (2010) томонидан нерв хужайраларида глутамат рецепторининг  $[Ca^{2+}]_{in}$ –гомеостазидаги аҳамияти таҳлил қилинган. Remigo P.V. (2013) томонидан этанол интоксикацияси шароитида нерв хужайраларида  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрациясининг ўзгариш динамикаси тавсифланган. Кауг Р. (2008) томонидан нейротоксик таъсир шароитида каламуш бош мия синаптосомалари функционал фаоллиги ўзгаришининг молекуляр механизмлари аниқланган. Rosa R.M. ва бошқалар (2007), Тарасенко А.С. ва бошқалар (2010) томонидан каламуш бош мия синаптосомалари фаоллигининг глутамат рецептори орқали регуляция механизмлари тадқиқ қилинган. Ўсимликлардан ажратиб олинган биологик фаол моддаларнинг каламуш бош мия синаптосомаларида  $Ca^{2+}$ –транспортига таъсири Кухта В.К. ва бошқалар (2010) томонидан илмий асосланган ва нерв хужайраларида сигнал трансдукцияси/узатилиши жараёнида  $Ca^{2+}$  ионлари марказий мессенжер сифатида аҳамиятга эга ҳисобланиши қайд қилинган.

Республикамик миқёсида каламуш бош мия синаптосомаларига алкалоидлар ва токсинларнинг  $Ca^{2+}$ –транспортига таъсирини ўрганиш йўналишида П.Б.Усманов, Дж.Каликулов ва бошқалар (1985) томонидан илмий тадқиқотлар амалга оширилган, бироқ нейропротектор дори воситаларига талаб юқорилиги ва ўсимликлардан ажратиб олинаётган биологик фаол моддаларнинг нерв тизимига таъсири тўлиқ тадқиқ қилинмаганлиги учун, ушбу йўналишида тадқиқотларни амалга ошириш долзарб, илмий-амалий аҳамиятга эга.

**Диссертация тадқиқотининг диссертация бажарилган олий таълим ёки илмий–тадқиқот муассасасининг илмий–тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги.** Диссертация тадқиқоти Биоорганик кимё институтининг илмий–тадқиқот ишлари режасининг ФА–А10–Т086

«Алкоголизм ва унга боғлиқ асоратларни даволаш ва профилактика қилишнинг янги услубларини ишлаб чиқиш» (2012–2014) мавзусидаги илмий лойиҳа доирасида бажарилган.

**Тадқиқотнинг мақсади** рутан, госситан ва дезоксипеганиннинг *in vitro* шароитида назорат ва сурункали алкоголь интоксикациясида бош мия синаптосомаси  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортига таъсирини тавсифлаш ҳамда нейропротектор хоссаларини асослашдан иборат.

**Тадқиқотнинг вазифалари:**

глутамат таъсирида каламуш бош мияси синаптосома мембранасининг  $\text{Ca}^{2+}$  ионлари учун ўтказувчанлик даражаси ҳамда  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  концентрациясига таъсирини аниқлаш;

сурункали алкоголь интоксикацияси шароитида ГАМК- ва NMDA-рецептор фаоллигининг бузилиши орқали синаптосома  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  концентрациясининг ўзгаришини аниқлаш;

рутан, госситан ва дезоксипеганиннинг назорат гуруҳида каламуш бош мияси синаптосомаларида глутамат, NMDA-, ГАМК-рецепторлари орқали  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортига таъсир механизмини тавсифлаш;

рутан, госситан ва дезоксипеганиннинг сурункали алкоголь интоксикацияси шароитида каламуш бош мияси синаптосомаларида  $\text{Ca}^{2+}$ -транспорти бошқарилиш механизмларини тадқиқ қилиш ва нейропротектор хоссасини асослаш;

дезоксипеганиннинг бошқа ҳужайралар (тромбоцитлар ва қон томир силлиқ мускул ҳужайраларида)  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортига таъсирини қиёсий таҳлил қилиш.

**Тадқиқотнинг объекти** ўсимликлардан ажратиб олинган - рутан, госситан полифеноллари ва дезоксипеганин алкалоиди, каламуш бош мияси синаптосомалари суспензияси, тромбоцитлар суспензияси, аорта қон томир препарати ҳисобланади.

**Тадқиқотнинг предмети** сурункали ва ўткир алкоголь интоксикацияси шароитида рутан, госситан ва дезоксипеганиннинг каламуш бош мияси синаптосомаларида  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортига таъсирини тавсифлашдан иборат.

**Тадқиқотнинг усуллари.** Тадқиқот давомида дифференциал центрифугалаш, спектрофотометрия, флуоресценция услублари, *in vitro* шароитида каламуш бош мияси синаптосомаларида  $\text{Ca}^{2+}$ -транспорти динамикасини баҳолаш имконини берувчи USB 2000 (Ocean Optics Inc., АҚШ) аппарат/дастур таъминоти, олинган натижаларни қайта ишлашда OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, АҚШ) математик–статистик таҳлил дастур пакетидан фойдаланилди.

**Тадқиқотнинг илмий янгиллиги** қуйидагилардан иборат:

$\text{Ca}^{2+}$ -сезгир зонд - хлортетрациклин ёрдамида глутаматнинг қуйи концентрацияси таъсирида пресинаптик мембрананинг ўтказувчанлик даражасини ошириши ва каламуш мияси синаптосомаси  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  концентрациясининг ортиши аниқланган;

сурункали алкоголь интоксикациясида рутан глутаматнинг нерв хужайраларида  $[Ca^{2+}]_{in}$  оширувчи таъсирга протектор таъсир кўрсатиши асосланган;

дигидропиридинга сезгир кальций каналларини бошқаришда госситан полифеноли ва нифедипин ўртасида рақобатлашиш типиди таъсирга эга эканлиги аниқланган;

сурункали алкоголь интоксикацияси шароитида дезоксипеганин алкалоиди глутамат сингари NMDA–рецептори фаоллигини модуляциялаши орқали антитоксик таъсир кўрсатиши аниқланган;

дезоксипеганиннинг тромбоцитларда ички деполардан чиқувчи  $Ca^{2+}$ -транспортини сусайтириши орқали  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрациясини камайтириши, шунингдек қон томир силлиқ мускул хужайраларида унинг релаксанти таъсири  $Ca^{2+}_L$ -канални блокадаси билан боғлиқлиги исботланган.

**Тадқиқотнинг амалий натижалари.** Рутан, госситан ва дезоксипеганиннинг каламуш бош мияси синаптосомаларида  $Ca^{2+}$ -транспортига таъсирини тавсифлашда олинган натижалар потенциал нейропротектор препаратларни ишлаб чиқишда илмий асос сифатида фойдаланилади. Олинган натижалар алкоголь интоксикациясида биологик фаол моддаларнинг антитоксик таъсир механизмлари бўйича мавжуд назарий билимлар диапазонини кенгайтиради. Рутан, госситан ҳамда дезоксипеганиннинг *in vitro* шароитида каламуш мияси синаптосомалари суспензиясида флуоресценция интенсивлигига таъсири бўйича аниқланган ҳолатлар амалий жиҳатдан, тадқиқ қилинган моддаларнинг нерв хужайраларида ГАМК –, NMDA–рецептор орқали  $[Ca^{2+}]_{in}$  динамикаси модуляцияси асосида нейропротектор таъсирга эга бўлган фармакологик препаратларни ишлаб чиқиш имконини беради.

**Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги.** Тадқиқот ишида фойдаланилган замонавий физиологик усуллар ва аппаратлар, дастурий таъминотлар, шунингдек уларнинг замонавий биофизикавий-биокимёвий тадқиқот усулларини қўллаш орқали олинганлиги билан тасдиқланади. Ҳар бир тадқиқот тажрибалари энг камида 4-6 марта ўтказилган. Олинган маълумотларни қайта ишлаш Стьюдент критерийси ёрдамида ўртача қийматнинг ишончлилиги интервали оралиқ қийматларини ҳисоблаган ҳолда OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, АҚШ) компьютер дастурида статистик таҳлил қилинди.

**Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти.** Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти – бош мия синаптосомаларида  $[Ca^{2+}]_{in}$  гомеостазининг  $Ca^{2+}$ -транспорти ва NMDA-рецепторларининг функционал фаоллигини фармакологик регуляция механизмлари бўйича назарий билимлар диапазонини кенгайтириши билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти рутан, госситан ва дезоксипеганиннинг каламуш бош мияси синаптосомаларида  $Ca^{2+}$ -транспортига таъсир механизмлари бўйича аниқланган ҳолатлар нейрпатологиялар, жумладан алкоголь интоксикацияси шароитида

фармакологик коррекция мақсадида препаратлар ишлаб чиқишда фойдаланилиши мумкинлиги билан изоҳланади.

**Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши.** Рутан, госситан ва дезоксипеганиннинг каламуш бош мияси синаптосомаларида  $Ca^{2+}$ -транспортига таъсирини аниқлаш бўйича олинган натижалар асосида:

нейродегенератив жараёнларни молекуляр даражадаги ривожланиш механизмларини нейропротектор препаратлар ёрдамида коррекциялашдан доривор воситаларни фармакологик тавсифлашда фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Соғлиқни сақлаш вазирлиги фармацевтика тармоғини ривожлантириш агентлигининг «Дори воситалари, тиббий буюмлар ва тиббий техника экспертизаси ва стандартлаштириш давлат маркази» 2018 йил 27 мартдаги № 29/09-1058 - сон маълумотномаси). Натижада давлат марказининг фармакологик ва токсикологик тадқиқотлар лабораториясида нейростимуляцияловчи доривор воситаларни специфик фаоллигини аниқлаш имконини берган;

рутан, госситан ва дезоксипеганиннинг каламуш бош мияси синаптосомаларида  $Ca^{2+}$ -транспортига таъсиридан ФА–А11–Т057 рақамли «Табий ва синтетик биологик фаол моддаларни юқори самарали скрининг марказини ташкил этиш» лойиҳасида гипоксияда каламуш бош мияси синаптосома мембраналари  $Ca^{2+}$ -транспортига ҳамда NMDA-рецепторига таъсир механизмларини аниқлашда фойдаланилган (Фан ва технологиялар агентлигининг 2017 йил 21 ноябрдаги ФТА-02-11/1148-сон маълумотномаси). Натижада гипоксияда синаптосома мембранаси  $Ca^{2+}$ -транспорти блоканиши ва NMDA-рецептори орқали  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрациясининг камайиши асосида нейропротектор хоссаларини тавсифлаш имконини берган.

**Тадқиқот натижаларининг апробацияси.** Мазкур тадқиқот натижалари 7 та халқаро ва 1 та республика илмий–амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

**Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши.** Диссертация мавзуси бўйича жами 13 та илмий иш чоп этилган, шулардан, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг диссертацияларнинг асосий илмий натижаларини чоп этишга тавсия этилган илмий журналларда 5 та мақола, шундан 3 та республика ва 2 таси хорижий журналларда нашр этилган.

**Диссертациянинг ҳажми ва тузилиши.** Диссертация таркиби кириш, бешта боб, хулосалар, фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан иборат. Диссертациянинг ҳажми 114 бетни ташкил этган.

## ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

**Кириш** қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурати асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари тавсифланган, республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий

натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий–амалий аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

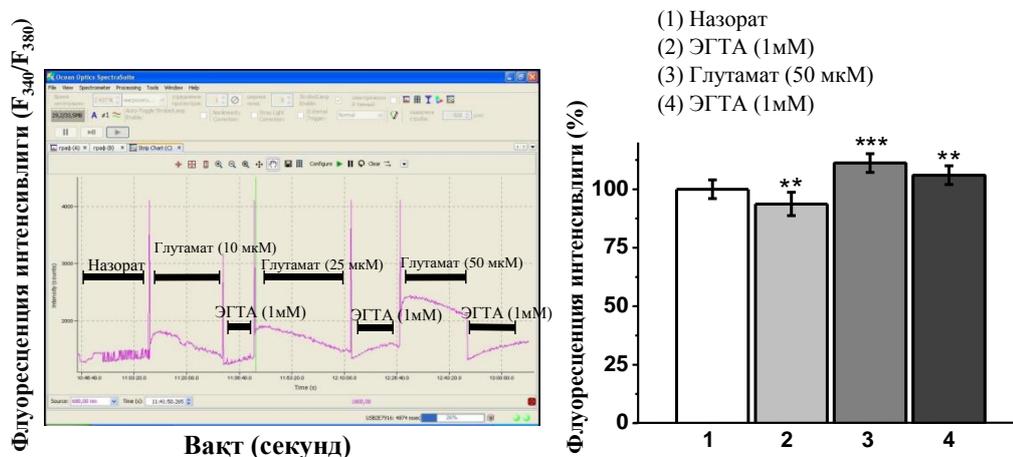
Диссертациянинг «**Нерв тизими хужайраларида  $[Ca^{2+}]_{in}$  гомеостазининг регуляция механизмлари**» деб номланган биринчи бобида замонавий адабиётлар асосида нерв тизими хужайраларида  $[Ca^{2+}]_{in}$  гомеостазининг регуляция механизмлари, бош мия нерв хужайраларида  $Ca^{2+}$ –транспорт тизимлари ва  $Ca^{2+}$ –гомеостазининг глутамат ва NMDA–рецепторлари орқали бошқарилиш механизмлари, глутамат, NMDA- ва AMPA–рецепторининг структура тузилиши ва функцияси, этанол интоксикацияси механизми бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «**Каламуш бош мияси синаптосомаларида  $Ca^{2+}$ –транспортини ўрганиш услублари**» деб номланган иккинчи бобида тадқиқотларни олиб бориш босқичлари, уларнинг бажарилишида фойдаланилган материаллар ва усуллар, хусусан сурункали алкохол интоксикациясининг экспериментал моделини тузиш, меъёр ва алкохол интоксикациясида дифференциал центрифугалаш усули ёрдамида каламуш бош миясидан синаптосома суспензиясини ажратиш, флуоресценция услубида синаптосомалардаги  $[Ca^{2+}]_{in}$  динамикасини баҳолаш, қўшимча тадқиқотларда гемостаз тизими ва қон томир силлиқ мускул хужайраларида  $[Ca^{2+}]_{in}$  динамикасини таъсирини қиёсий таҳлил қилиш учун тромбоцитларни ажратиш, тромбоцитлар агрегацияси, унинг функционал фаоллигини ўрганиш, аорта қон томир препаратининг механик фаоллигини қайд қилиш услуби, натижаларни статистик қайта ишлаш услуби ёритилган.

Диссертациянинг «**Каламуш бош мияси синаптосомаларида  $Ca^{2+}$ –транспортининг глутамат рецептори орқали регуляцияси**» деб номланган учинчи бобида  $Ca^{2+}$ –сезгир флуоресценция зондлари ёрдамида каламуш бош мия синаптосомалари суспензиясида флуоресценция сигналининг ( $F_{340}/F_{380}$ ) интенсивлигини ўзгаришини қайд қилиш асосида синаптик мембранада жойлашган глутамат рецептори активацияси орқали  $[Ca^{2+}]_{in}$  динамикаси ўзгаришларини таҳлил қилиш бўйича тажрибалар натижалари келтирилган.  $Ca^{2+}$ –сезгир зонд – хлортетрациклин (ХТЦ) ёрдамида тажрибаларда  $Ca^{2+}$  ионларини комплекс боғлаб олувчи – этиленгликоль (бис–аминоэтил эфир)–N, N–тетрасирка кислота (ЭГТА) (1 мМ) билан инкубация ( $[Ca^{2+}]_{out}=0$  мМ) қилинганда флуоресценция интенсивлиги назоратга нисбатан 5% га камайиши аниқланди. ЭГТА (1 мМ) инкубациясида L–глутамат (10–50 мкМ) таъсирида флуоресценция интенсивлиги 5–10% га ортиши кузатилди ва бу синаптик мембрананинг  $Ca^{2+}$  ионлари учун ўтказувчанлик даражасини ортиши, бу эса ўз навбатида цитозолга  $Ca^{2+}$  ионларининг кириши, шунингдек хужайра ички «депо»сидан чиқишини кучайиши ҳисобига  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрациясини ортиши билан изоҳланади (1–расм). Синаптосома суспензияси муҳитига L–глутамат (100 мкМ) қўшилганда ХТЦ–флуоресценция сигналининг интенсивлиги икки фазали типда, яъни 1–фазада инкубация муҳитида KCl (30 мМ) инкубацияси шароитида кузатилган ҳолатга ўхшаш, дастлаб нисбатан тезкор (5–10 секунд давомида) ўзгариши ва

кайтадан олдинги ҳолатга қайтиши, навбатдаги 2–фазада эса, нисбатан секин ортиб бориши кузатилди. Бунда 1–фаза L–глутамат концентрациясига (10–100 мкМ) пропорционал бўлиб, пресинаптик мембрана деполяризацияси,  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрацияси ортиши таъсирида кўп сонли везикулаларнинг экзоцитоз жараёнини юзага келтириши натижасида флуоресценция интенсивлигини «чақнаш» типига ўзгариши билан изоҳланади. L–глутамат концентрацияси ошириб борилганида 1– ва 2–фаза ўртасидаги лаг–фазанинг давомийлик даврининг қисқариши аниқланди. Шунингдек, L–глутамат 100 мкМ концентрацияда қўшилганда такрорий флуоресценция кузатилмади.

L–глутамат (10–50 мкМ) ва KCl (35 мМ) эритмасининг синаптосомалар суспензиясининг флуоресценция интенсивлигига солиштирма таъсири таҳлил қилинди.



**1–расм. Каламуш бош мияси синаптосомалари суспензияси ЭГТА (1 мМ) билан инкубация қилинганида L–глутамат (10–50 мкМ) таъсиридаги флуоресценция интенсивлигининг ўзгариши.** А. Оригинал расм. L–глутамат (50 мкМ) таъсирида флуоресценция интенсивлигининг ортиши. Ишончлилик даражаси.\*- P<0,05; \*\*- P<0,01; \*\*\*- P<0,001. (n=6).

Флуоресценциянинг икки фазали типда ўзгаришининг сабабини синаптосомада L–глутамат таъсирида цитозолда  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрациясининг 2 босқичли характерда ортиши ва везикулалардан  $H^+$  ажралишини кучайиши билан изоҳлаш мумкин. Цитозолда  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрациясининг ортиши  $Ca^{2+}$ –каналларининг фаоллашиши ва  $Na^+/Ca^{2+}$ –алмашувчининг реверсион типда фаолият кўрсатиши ҳисобига амалга ошириши қайд қилинади (Siesjo and Bengtsson, 1989). Шунингдек,  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрацияси  $Ca^{2+}$ ни ташқи муҳитдан кириши билан бирга, саркоплазматик ретикулум (СР) ва митохондриядан чиқиши ва  $Ca^{2+}$  ионларининг цитозолда камайиш механизмлари фаоллигини сусайиши ҳисобига ҳам ортиши мумкин. ЭГТА (1 мМ) билан инкубация қилинганида ( $[Ca^{2+}]_{out}=0$  мМ) L–глутамат (100 мкМ) таъсирида ХТЦ–флуоресценциясида «тезкор» типда кузатиладиган 1–фазани сақланиши, бироқ «чақнаш» типигаги ўзгариш кузатилмади. Аналогик ҳолат KCl (35 мМ) таъсирида ҳам қайд қилинди.  $Ca^{2+}$ –каналли блокатори –  $Cd^{2+}$  (25 мМ) билан инкубация қилинган шароитда ҳам L–глутамат (100 мкМ)/KCl (35 мМ) таъсирида ХТЦ–флуоресценцияси интенсивлиги ортиши кузатилмади.

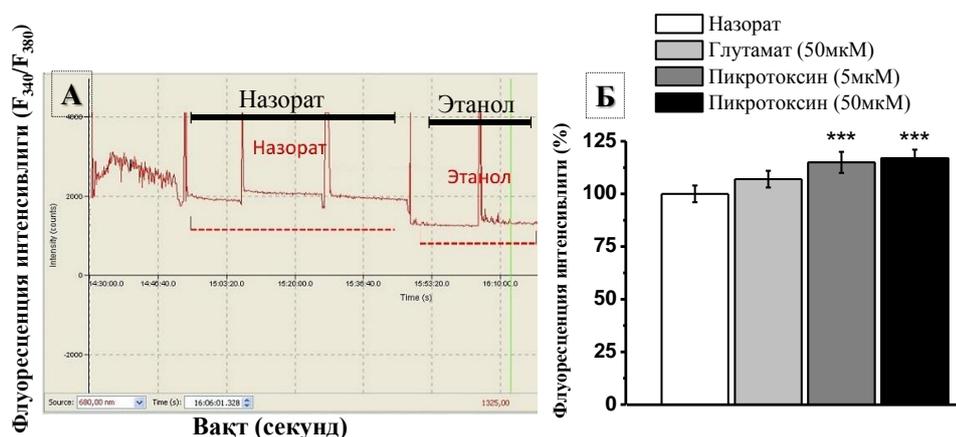
Маълумки, L-глутамат (100 мкМ) таъсирида ХТЦ-флуоресценцияси интенсивлигини ўзгариши NMDA- ва глутамат рецепторининг активацияси орқали цитозолда  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрациясини ортиши билан боғлиқ бўлиб, KCl (35 мМ) инкубацияси таъсирида эса, мембранани деполяризацияланиши натижасида  $Ca^{2+}$ -канални фаоллаштириши ҳисобига  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрацияси ортиши қайд қилинади. Шунингдек, тажрибаларда L-глутамат (100 мкМ) инкубациясида синаптосомалар суспензиясида ХТЦ-флуоресценциясининг 1-фазада нисбатан «тезкор» типда ўзгариши асосан, постсинаптик мембранада жойлашган  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропион кислота (АМПА)/каинат рецепторини активацияси орқали амалга ошишини тахмин қилиш мумкин. АМПА/каинат рецептор ГАМК-ергик трансмиссион сигнал трансдукциясида муҳим ўрин тутиши аниқланган (Mayer et al., 1989; Cossart et al., 2001; Lerma, 2006; Fiszman et al., 2007; Mathew et al., 2008).  $Ca^{2+}$ -канални блокатори –  $Cd^{2+}$  (25 мМ) (Mayer et al., 1989) билан инкубация қилинганида L-глутамат (100 мкМ) таъсирида ХТЦ-флуоресценцияси интенсивлигида «тезкор» типда кузатилувчи 1-фаза сақланиши,  $Cd^{2+}$  (25 мМ) таъсирида NMDA-рецептор орқали цитозолга  $Ca^{2+}$  ионларини кириши блокланганида АМПА/каинат рецепторлар фаоллигини сақланиб қолиши билан изоҳланиши мумкин.

Тажрибаларда глицин (10–100 мкМ) инкубацияси L-глутамат (100 мкМ) таъсирида NMDA-рецепторнинг фаоллаштиришини кучайтирувчи таъсир кўрсатиши аниқланди. Шунингдек, NMDA-рецепторнинг специфик блокатори – стрихнин (5 мМ) инкубацияси шароитида глициннинг (100 мкМ) инкубацияси L-глутамат (100 мкМ) таъсиридаги ХТЦ- флуоресценциясини кучайтирувчи таъсири кузатилмайди. Тажриба натижалари асосида, глицин ва L-глутамат NMDA-рецепторнинг турли хил функционал сайтлари билан боғланишини тахмин қилиш мумкин.

Диссертациянинг «**Назоратда ва алкоголь интоксикацияси шароитида каламуш бош мияси синаптосомаларида  $[Ca^{2+}]_{in}$  динамикасига рутан, госситан ва дезоксипеганиннинг таъсири**» деб номланган тўртинчи бобида ГАМК-рецепторининг активатор/блокаторлари ёрдамида алкоголь интоксикацияси шароитида рутан, госситан ва дезоксипеганиннинг синаптосомаларда  $Ca^{2+}$ -транспортига таъсири тадқиқ қилинганида, тажрибаларда этанол (5–10 мМ) инкубацияси шароитида флуоресценция интенсивлиги назоратга нисбатан сусайиши аниқланди (2А-расм). Бундай шароитда L-глутамат (50 мкМ) таъсирида флуоресценция интенсивлиги сезиларли даражада ўзгармади ва ўз навбатида, бу ҳолат мембрананинг  $Ca^{2+}$  ионларига нисбатан ўтказувчанлик даражаси қиймати ҳам ўзгармаслигидан далолат беради. Тажрибаларда ГАМК-рецептори блокатори – пикротоксин (5–50 мкМ) инкубацияси шароитида флуоресценция интенсивлигининг ортиб бориши аниқланди (2Б-расм).

Пикротоксин (5–50 мкМ) аллостерик характерда ГАМК-рецепторини блоклаганида NMDA-рецептори фаоллашади. Тажрибалардан олинган натижалар сурункали алкоголь интоксикацияси таъсирида ГАМК-рецепторининг фаоллигини ортиши, ўз навбатида цитозолга  $Ca^{2+}$

ионларининг киришини фаоллашиши, натижада  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрацияси ортишини кўрсатади. Тадқиқотларда этанол NMDA–рецепторининг функционал фаоллигини модуляция қилиш орқали глутаматергик нейротрансмиссия дисфункциясига олиб келиши қайд қилинган (Lima–Landman and Albuquerque, 1989; White et al., 1990). Сурункали алкоголь интоксикациясининг таъсир механизмларидан бири айнан, NMDA–рецепторининг функциясини ўзгариши билан боғлиқлиги таъкидланади (Simson et al., 1991; Gulya et al., 1991; Parsons et al., 1998).



**2–расм. А. Этанолнинг (100 мМ) синаптосома суспензиясида флуоресценцияга таъсири** (Оригинал расм). **Б. ГАМК–рецептори блокатори – пикротоксиннинг (5–50 мкМ) каламуш мияси синаптосомалари суспензиясида флуоресценция интенсивлигига таъсири.** Ишончлилиқ даражаси. \*- P<0,05; \*\*- P<0,01; \*\*\*- P<0,001. (n=6).

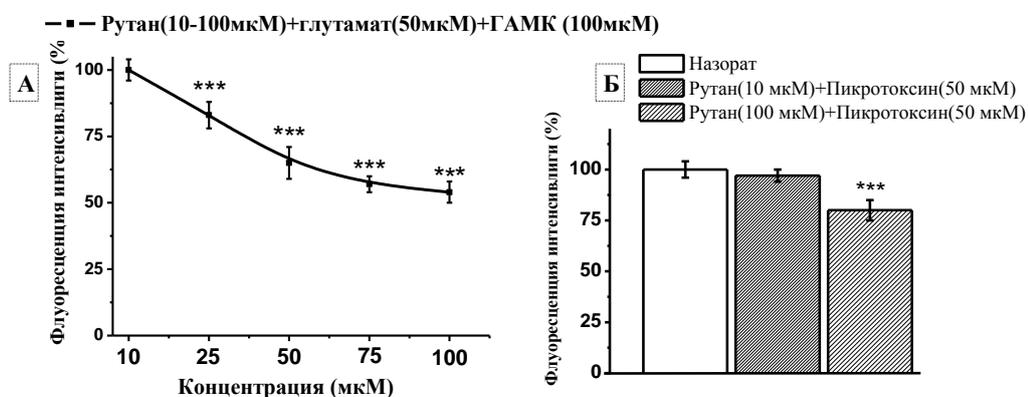
Сурункали алкоголь интоксикациясида глутамат секрециясини кучайиши таъсирида «эксайтотоксик таъсир» юзага келиши тасдиқланган (Dahchour and Witte, 2000). Сурункали алкоголь интоксикацияси таъсирида глутамат секрецияси кучаяди ва NMDA–рецепторини фаоллашиши орқали нейротоксик таъсир қайд қилинади. Тажрибаларда сурункали алкоголь интоксикациясида инкубация муҳитига ГАМК–рецептори агонистлари – диазепам ва фенobarбитал (50–100 мкМ) кўшилганида ГАМК–рецепторининг тормозловчи таъсири ортади ва мос равишда,  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрацияси ҳам камайиши қайд қилинади. Олинган ушбу натижалар сурункали алкоголь интоксикацияси таъсирида ГАМК–рецепторини фаоллашиши, AMPA/каинат рецептори фаоллигининг модуляцияси орқали глутаматергик нейротрансмиссия дисфункцияси билан изохлаиши мумкин. Сурункали алкоголь интоксикациясида L–глутамат (50 мкМ) ва глицин (5 мкМ) синаптосома суспензиясида ХТЦ–флуоресценция интенсивлигини сезиларсиз даражада ошириши аниқланди. Олинган натижалар асосида, сурункали алкоголь интоксикацияси таъсирида NMDA–рецепторнинг функционал суббирликларининг L–глутамат ва глицинга нисбатан сезувчанлик даражаси кескин сусайишини тахмин қилиш мумкин. Шунингдек, сурункали алкоголь интоксикацияси давридани кейин, тажриба ҳайвонлари организмига этанол киритиш тўхтатилиши шароитида ҳайвонларда безовталиқ ҳолати юзага келиши аниқланди. Ушбу ҳолатдаги

синаптосома суспензиясида ХТЦ–флуоресценция интенсивлиги назорат гуруҳига нисбатан сезиларли даражада ортиши аниқланди. Шундай қилиб, этанол таъсирида NMDA–рецептори функцияси бузилиши қайд қилиниб, сурункали алкоголь интоксикацияси тўхтатилганида синаптосома суспензиясида ХТЦ–флуоресценция интенсивлигининг назорат гуруҳига нисбатан ортишини глутаматергик тизим фаоллиги реактивацияси билан изохлаш мумкин. Навбатдаги тажрибаларда глутамат рецептори блокатори – МК–801 (5 мкМ) билан инкубация қилинганида сурункали алкоголь интоксикацияси шароитида синаптосомалар суспензиясида ХТЦ–флуоресценцияси интенсивлиги назоратга нисбатан 20% га камайиши, шунингдек глутамат рецептори блокатори – аргилобатин (10 мкМ) инкубацияси шароитида бу кўрсаткич назоратга нисбатан 35% га камайиши аниқланди. Олинган натижалар сурункали алкоголь интоксикацияси NMDA–рецептори функционал суббирликларига комплекс таъсир кўрсатишидан далолат беради.

Маълумки, сурункали алкоголь интоксикацияси таъсирида синапс терминалларида глутамат секрецияси кучайиши ҳисобига нерв хужайраларида – «*эксайтотоксик таъсир*» ёки «*қўзгалган аминокислоталар орқали токсик таъсир*» деб номланган патологик ҳолат юзага келади. Глутаматнинг эксайтотоксик таъсири NMDA–рецепторининг специфик антагонисти – N–метил–D–аспартат таъсирига аналогик типда амалга ошади, деб тахмин қилинади. Глутамат NMDA–рецептори билан боғланганида цитозолда  $[Ca^{2+}]_i$  концентрацияси кескин ортади, бу эса ўз навбатида Паркинсон касаллигида кузатилгани каби, нерв хужайраларининг эксайтотоксик таъсир оқибатида нобуд бўлиши жараёни ишга тушади. Шунингдек, глутамат орқали амалга ошувчи сигнализация каскади функциясининг ўзгариши эпилепсия, Альцгеймер каби нейропатологиялар ривожланишида ҳам асосий ўрин тутиши тахмин қилинади.

Дастлаб, АКШда вирусга қарши препарат сифатида синтезланган – «Амантадин» препарати (Симметрел) NMDA–рецептори антагонисти типиде таъсир кўрсатиши, эксайтотоксик таъсир реакциялар каскадини блоклаши аниқланган ва бу препарат нейроклиник амалиётда Паркинсон касаллиги терапиясида самарали фойдаланилади (Schwab and Poshanzer, 1969). Ушбу маълумотлар асосида, навбатдаги тажрибаларда сезиларли даражада антивирус хоссага эга бўлган – рутан ва госситаннинг эксайтотоксик таъсирга қарши таъсир кўрсатиш хоссасига эга бўлиши мумкинлиги ўрганилди. Тажрибаларда назорат гуруҳида рутан (10–100 мкМ) синаптосомалар суспензиясида ХТЦ–флуоресценция интенсивлигига сезиларли даражада таъсир кўрсатмаслиги, шунингдек L–глутамат (50 мкМ) билан инкубация қилинганида рутан (50 мкМ) ХТЦ–флуоресценция интенсивлигини сусайтириши аниқланди. Рутан (10 мкМ) билан инкубация қилинганида ХТЦ–L–глутамат комплексининг флуоресценция интенсивлиги сусайиши аниқланди. Бунда рутан концентрацияга (10–100 мкМ) боғлиқ ҳолатда L–глутаматнинг таъсирини сусайтириши қайд қилинди. Олинган ушбу натижалар рутан ва L–глутаматнинг рақобатлашиш типиде таъсир

кўрсатишини тахмин қилиш имконини беради. Навбатдаги тажрибаларда сурункали алкохол интоксикациясида рутан (50 мкМ) флуоресценция интенсивлигини бирозгина ошириши аниқланди. Шунингдек, ГАМК (100 мкМ) билан инкубацияси қилинганда синаптосомалар суспензияси муҳитига L–глутамат (50 мкМ) қўшилиши NMDA–рецептори фаоллигини сусайиши ва ўз навбатида,  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрацияси камайганида рутан (10–100 мкМ) флуоресценция интенсивлигини сусайтириши аниқланди (3А–расм). ГАМК–рецептор антагонисти – пикротоксин (50 мкМ) инкубацияси шароитида рутан (10–100 мкМ) ГАМК–ХТЦ комплексининг флуоресценция интенсивлиги сезиларли даражада сусайиши аниқланди. Олинган натижалар рутан  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрациясини камайтирган шароитда ГАМК–рецептор фаоллигига антагонист сифатида таъсир кўрсатмаслигидан далолат беради (3Б–расм).



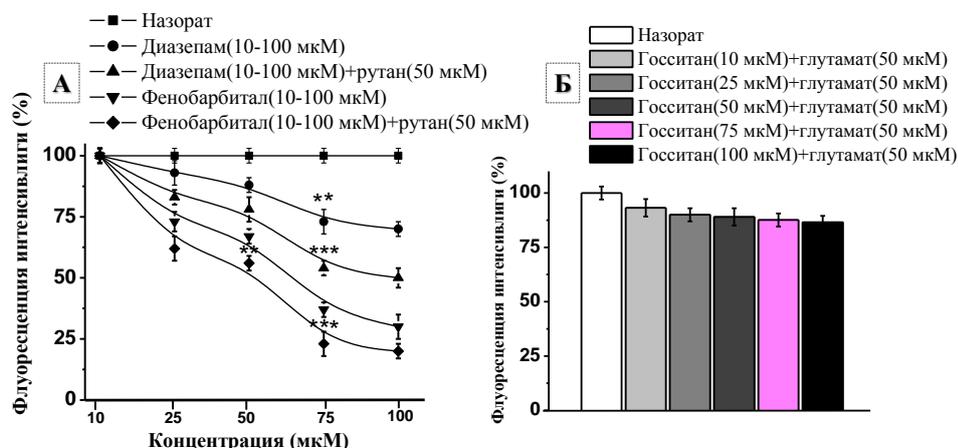
**3–расм. А.** Рутаннинг (10–100 мкМ) ГАМК (100 мкМ) инкубацияси шароитида синаптосомалар суспензияси муҳитига L–глутамат (50 мкМ) қўшилган ҳолатда ХТЦ–флуоресценция интенсивлигига таъсири. **Б.** ГАМК–рецептор антагонисти – пикротоксин (50 мкМ) инкубациясида рутаннинг (10–100 мкМ) ГАМК–ХТЦ комплекси флуоресценция интенсивлигига таъсири. Ишончлилиқ даражаси.\*-  $P < 0,05$ ; \*\*-  $P < 0,01$ ; \*\*\*-  $P < 0,001$ . ( $n=6$ ).

Тажрибаларда рутан (50 мкМ) инкубацияси шароитида ГАМК–рецептори агонистлари – диазепам ва фенобарбиталнинг (10–100 мкМ) флуоресценция интенсивлигига таъсирини кучайиши аниқланди (4А–расм).

Госситан полифеноли (10 мкМ) ХТЦ–L–глутамат глутамат комплексининг флуоресценция интенсивлигини сезиларли даражада сусайтириши аниқланди. Шунингдек, рутандан фарқ қилиб, госситан (10–100 мкМ) концентрация диапазонида L–глутамат таъсирини сезиларли даражада ўзгартирмаслиги аниқланди (4Б–расм). Олинган натижалар госситаннинг L–глутамат билан рақобатлашиш типидида таъсир кўрсатмаслиги, эҳтимол NMDA–рецептор орқали таъсир кўрсатиши мумкинлигини тахмин қилиш имконини беради.

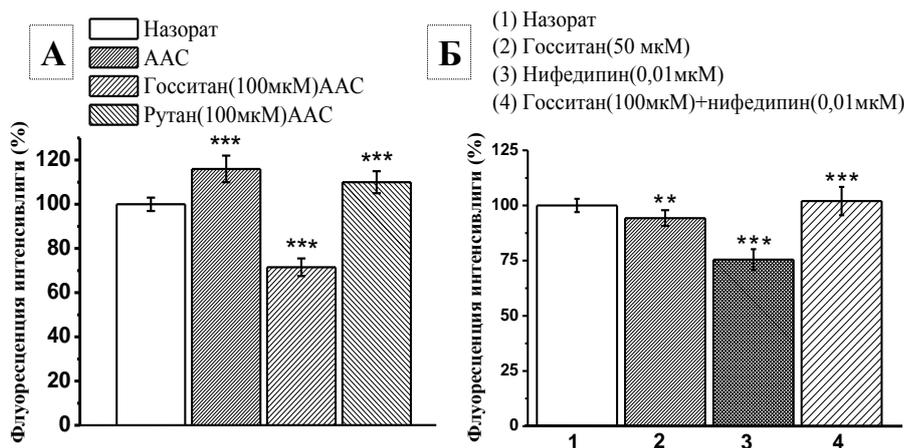
Қаламушлар организмига этанол киритилишини тўхтатилиши, яъни сурункали алкохол интоксикациясидан кейин госситан концентрацияга (10–100 мкМ) боғлиқ L–глутамат (50 мкМ) фонидида синаптосомалар суспензиясида ХТЦ–флуоресценциясини сусайтириши аниқланди. Олинган

натижалар госситан полифенолининг сурункали алкоголь интоксикациясидан кейинги даврда синаптосомаларда  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрациясини камайтирувчи таъсир кўрсатишидан далолат беради.



**4–расм. А.** Рутан (50 мкМ) инкубациясида ГАМК–рецептори агонистлари – диазепам ва фенобарбиталнинг (10–100 мкМ) флуоресценция интенсивлигига таъсири. **Б.** Сурункали алкоголь интоксикацияси давридан кейин госситаннинг концентрацияга (10–100 мкМ) боғлиқ ҳолатда L–глутамат (50 мкМ) фонида синаптосомалар суспензиясида ХТЦ–флуоресценциясига таъсири. Ишончлилик даражаси.\*-  $P < 0,05$ ; \*\*-  $P < 0,01$ ; \*\*\*-  $P < 0,001$ . ( $n=6$ ).

Рутан ва госситан (100 мкМ) сурункали алкоголь интоксикацияси давридан кейин синаптосомалар суспензиясида ХТЦ–флуоресценцияси интенсивлигини сезиларли даражада камайтириши аниқланди (5А–расм).  $Ca^{2+}$ –каналли блокатори нифедипин (0,01 мкМ) инкубацияси шароитида госситан (10–100 мкМ) ХТЦ–флуоресценцияси интенсивлигини сезиларли даражада ошириши аниқланди (5Б–расм).

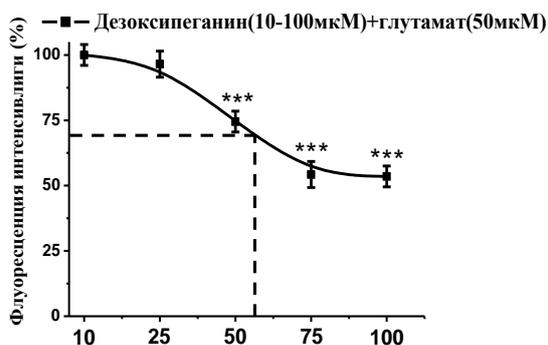


**5–расм. А.** Сурункали алкоголь интоксикацияси давридан кейин рутан (100 мкМ) ва госситаннинг (100 мкМ) синаптосомалар суспензиясида ХТЦ–флуоресценцияси қийматига таъсири. **Б.**  $Ca^{2+}$ –каналли блокатори нифедипин (0,01 мкМ) инкубацияси шароитида госситаннинг (100 мкМ) синаптосома суспензиясида ХТЦ–флуоресценцияси интенсивлигига таъсири. Ишончлилик даражаси.\*-  $P < 0,05$ ; \*\*-  $P < 0,01$ ; \*\*\*-  $P < 0,001$ . ( $n=6$ ).

Олинган натижалар госситаннинг синаптосомаларда  $\text{Ca}^{2+}$ -канални фаоллигини блоклаши орқали таъсир кўрсатишидан далолат беради.

Дезоксипеганин алкалоидининг глутаматергик нейромедиатор тизимининг функционал фаоллигини модуляциялаш орқали  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  динамикасига таъсирини баҳолаш учун синаптосомалар суспензияси флуоресценция интенсивлигига таъсири ўрганилди. Дезоксипеганин паст концентрацияда (1–10 мкМ) ХТЦ–флуоресценциясига сезиларли таъсир кўрсатмаслиги, 50–100 мкМ концентрацияда флуоресценция интенсивлигини камайтириши аниқланди. Глутамат (50 мкМ) инкубацияси шароитида дезоксипеганин концентрацияга (10–100 мкМ) боғлиқ ХТЦ–флуоресценция интенсивлигини камайтириши аниқланди (6–расм). Шундай қилиб, дезоксипеганин концентрацияга (10–50 мкМ) боғлиқ ХТЦ–L–глутамат комплекси инкубацияси шароитида флуоресценцияси интенсивлигини сусайтириши аниқланди. Олинган тажриба натижалари дезоксипеганин ва L–глутаматнинг ГАМК–рецепторга рақобатлашиш типидида регуляцион боғланиш сайтига эгаллигини тахмин қилиш имконини беради. Маълумки, глицин глутамат таъсирини кучайтириши, AP5 ва AV–2–1 токсини эса, ГАМК–рецептор фаоллигини сусайтириши, яъни глутаматга рақобатлашиш типидида таъсир кўрсатиши аниқланган. Шунингдек,  $\text{Mg}^{2+}$  ионлари глутаматга рақобатлашиш типидида бўлмаган характерда ГАМК–рецептори антагонисти сифатида таъсир кўрсатиши қайд қилинади. Умумий ҳолатда, нейротектор хоссага эга бўлган МК–801 препарати, аргиолобатин каби ГАМК–рецептор модуляторларининг таъсир механизмларини ўрганиш терапевтик нуқтаи назардан муҳим аҳамиятга эга ҳисобланади.

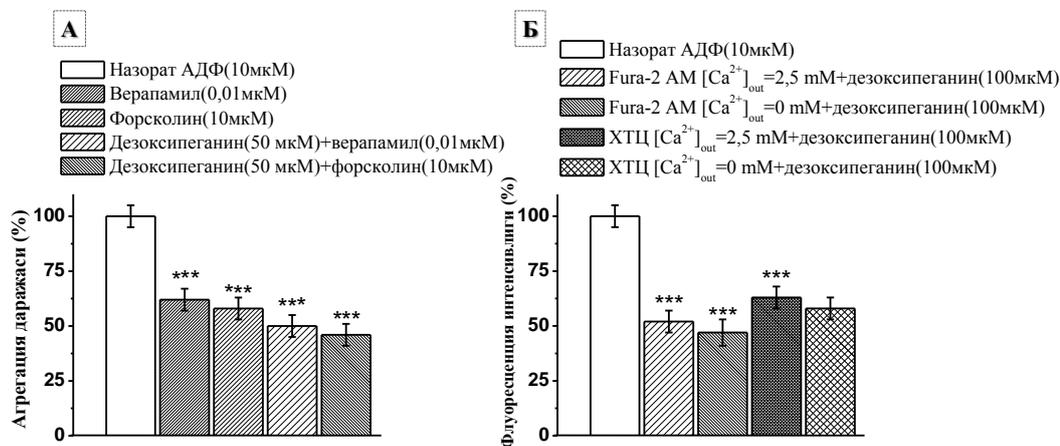
Дезоксипеганин (50 мкМ) NMDA–рецептор агонисти глициннинг (10 мкМ) таъсирини сезиларли даражада кучайтириши, ўз навбатида бунда  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  концентрациясини ортиши тахмин қилинди. Яъни, бу ҳолатда дезоксипеганин агонист/антагонист типидида таъсирга эгаллиги кузатилади. Дезоксипеганиннинг NMDA–рецепторига таъсири  $\text{Mg}^{2+}$  ионлари ва аргиолобатин ёрдамида ўрганилди. Бунда  $\text{Mg}^{2+}$  (1 мМ) каламуш мияси синаптосомалари суспензиясида L–глутамат–ХТЦ инкубацияси шароитида флуоресценция интенсивлигини сезиларли даражада сусайтириши аниқланди. Шунингдек, дезоксипеганин (100 мкМ) олдиндан инкубацияланганида  $\text{Mg}^{2+}$  (1 мМ) флуоресценция интенсивлигига сезиларли даражада таъсир кўрсатмаслиги қайд қилинди. Ушбу ҳолатга ўхшаш типда, дезоксипеганин (100 мкМ) инкубацияси шароитида аргиолобатин (5 мкМ) ҳам флуоресценция интенсивлигига таъсир кўрсатмаслиги аниқланди. Олинган ушбу тажриба натижалари дезоксипеганин алкалоидининг NMDA–рецептори фаоллигига бевосита таъсир кўрсатади, деб тахмин қилиш имконини беради.



**6-рассм.** Дезоксипеганінінннг (10–100 мкМ) синаптосома суспензиясида флуоресценция интенсивлигига таъсири. Ишончилилик даражаси.\*-  $P < 0,05$ ; \*\*-  $P < 0,01$ ; \*\*\*-  $P < 0,001$ . ( $n=6$ ).

Дезоксипеганін (10–50 мкМ) інкубаціяси синаптосомалар суспензиясида ХТЦ–флуоресценция интенсивлигини сезиларли даражада ошириши аниқланди. L–глутамат (50 мкМ) інкубаціясида эса, дезоксипеганін (10–50 мкМ) флуоресценция интенсивлигини сезиларли даражада камайтириши аниқланди. Сурункали алкоголь интоксикацияси шароитида дезоксипеганін (10–50 мкМ) флуоресценция интенсивлигини камайтириши ва ўз навбатида, бу ҳолат  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрацияси камайишидан далолат беради. Олинган натижалар ушбу алкалоид асосида алкоголь интоксикациясига қарши терапевтик таъсирга эга фармакологик нейротектор препарат ишлаб чиқиш истиқболлари юқорилигини кўрсатади. Шунингдек, дезоксипеганін (100 мкМ) інкубаціяси таъсирида сурункали алкоголь интоксикациясидан кейинги даврда каламушлар миясидан ажратиб олинган синаптосомалар суспензияси ХТЦ–флуоресценция интенсивлиги сезиларли даражада ўзгариши аниқланди. Навбатдаги тажрибаларда дезоксипеганін алкалоиди концентрацияга (10–100 мкМ) боғлиқ равишда тромбин, адреналин (1 мкМ) ва АДФ (10 мкМ) таъсирида юзага келтирилган тромбоцитлар агрегациясини сусайтириши аниқланди. Бунда дезоксипеганін (100 мкМ) АДФ (10 мкМ) таъсирида юзага келтирилган тромбоцитлар агрегациясини нисбатан кучли даражада сусайтириши (назоратга нисбатан 50% га) кузатилди. Олинган натижалар дезоксипеганінннг  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрациясини камайтиришидан далолат беради. Тажрибаларда  $Ca^{2+}$ –каналли блокатори верапамил (0,01 мкМ) ва аденилатциклаза ферменти блокатори – форсколин (10 мкМ) інкубаціяси шароитида дезоксипеганінннг (50 мкМ) АДФ (10 мкМ) таъсирида юзага келтирилган тромбоцитлар агрегациясини сусайтирувчи таъсири сезиларли даражада кучайиши аниқланди (7А–рассм). Олинган натижалар тахлили асосида, дезоксипеганін аденилатциклаза фаоллигини сусайтириши орқали  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрациясини камайтиришини тахмин қилиш мумкин. Дезоксипеганінннг антиагрегацион таъсирини  $Ca^{2+}$ –сезгир флуоресцент зондлар – Fura–2/АМ ва ХТЦ ёрдамида тахлил қилинди. Бунда  $[Ca^{2+}]_{out}=0$  мМ ва  $[Ca^{2+}]_{out}=2,5$  мМ шароитда АДФ таъсирида юзага келтирилган тромбоцитлар агрегациясида Fura–2/АМ ва ХТЦ–флуоресценцияси

интенсивлиги дезоксипеганин (100 мкМ) таъсирида сезиларли даражада сусайиши аниқланди (7Б–расм). Олинган натижалар дезоксипеганиннинг антиагрегацион таъсири тромбоцитларда ташқаридан кирувчи ва хужайра ички деполаридан чиқувчи  $Ca^{2+}$ –транспорти фаоллигини сусайтириши орқали  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрациясини камайтиришини тахмин қилиш имконини беради.



7–расм. А. Дезоксипеганиннинг (50 мкМ)  $Ca^{2+}$ –канални блокатори верапамил (0,01 мкМ) ва аденилатциклаза ферменти активатори – форсколин (10 мкМ) инкубацияси шароитида дезоксипеганиннинг (50 мкМ) АДФ (10 мкМ) таъсирида юзага келтирилган тромбоцитлар агрегациясига таъсири. Б. Дезоксипеганиннинг (100 мкМ)  $[Ca^{2+}]_{out}=0$  мМ ва  $[Ca^{2+}]_{out}=2,5$  мМ шароитида АДФ таъсирида юзага келтирилган тромбоцитлар агрегациясида Fura–2/AM ва ХТЦ–флуоресценцияси интенсивлигига таъсири. Ишончлилиги даражаси.\*-  $P<0,05$ ; \*\*-  $P<0,01$ ; \*\*\*-  $P<0,001$ . ( $n=6$ ).

Дезоксипеганин (10–50 мкМ) *in vitro* шароитида KCl (50 мМ) таъсирида юзага келтирилган каламуш аорта қон томири препаратининг изометрик қисқариш фаоллигига сезиларли даражада релаксат таъсир кўрсатиши аниқланди. Шунингдек, дезоксипеганиннинг вазорелаксат таъсири  $[Ca^{2+}]_{out}$  концентрациясига боғлиқ ҳолатда амалга ошиши ва дигидропиридинга сезгир  $Ca^{2+}_L$ –канални блокатори – нифедипин (0,01 мкМ) таъсирини кучайтириши аниқланди. Олинган натижалар дезоксипеганин қон томир силлиқ мускул хужайралари плазмалеммасида жойлашган потенциалга боғлиқ  $Ca^{2+}_L$ –канални блоклаши орқали  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрациясини камайтиришидан далолат беради. Ушбу натижалар дезоксипеганиннинг синаптосомаларда  $[Ca^{2+}]_{in}$  концентрациясини камайтиришини тасдиқловчи қўшимча маълумот ҳисобланади.

Ҳозирги вақтда экспериментал неврологияда ўсимликлардан ажратиб олинган биологик фаол моддалар асосида самарали нейропротектор хоссага эга бўлган фармакологик препаратларни яратиш устувор йўналишлардан бири ҳисобланади. Айниқса, ушбу нуқтаи назардан полифункционал фармакологик таъсир спектрига эга бўлган алкалоидлар ва полифенол бирикмалар истиқболли агентлар ҳисобланади (Shikov et al., 2014).

## ХУЛОСАЛАР

1. Назорат гуруҳида глутамат (10–100 мкМ) таъсирида каламуш бош мияси синаптосомалари суспензиясида флуоресценция интенсивлиги, ҳамда пресинаптик мембрананинг  $\text{Ca}^{2+}$  ионлари учун ўтказувчанлик даражасини ортиши, бунинг натижасида эса  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  концентрациясининг ошиши қайд этилди.

2. Сурункали алкоголь интоксикациясида ГАМК– ва NMDA–рецепторлар фаоллигининг ортиши, бу эса ўз навбатида  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  концентрациясининг патологик ўзгаришини юзага келтириши исботланди.

3. Илк бор сурункали алкоголь интоксикациясида рутан L–глутамат таъсирига рақобатлашиш асосида таъсир этиши мумкинлиги, госситан эса – L–глутамат таъсирига рақобатлашишга эга бўлмаган характерда нерв хужайраларида  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  динамикасига ижобий таъсир кўрсатиши қайд этилди.

4. Дезоксипеганин алкалоиди (10–100 мкМ) L–глутаматга аналогик типда, NMDA–рецептори фаоллигини модуляциялаши орқали сурункали алкоголь интоксикациясида антитоксик таъсир кўрсатиши аниқланди.

5. Илк бор дезоксипеганин алкалоидининг (100 мкМ) антиагрегацион таъсири тромбоцитларда ташқаридан кирувчи ва хужайра ички деполаридан чиқувчи  $\text{Ca}^{2+}$ –транспортини сусайтириши орқали  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  концентрациясини камайтириши аниқланди ва бу ҳолат дезоксипеганин алкалоидининг синаптосомаларда  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  концентрациясини камайтиришини кўшимча тасдиқловчи маълумот сифатида аҳамиятга эга ҳисобланади.

6. Дезоксипеганиннинг (10–50 мкМ) *in vitro* шароитида каламуш аорта қон томири препаратининг изометрик қисқариш фаоллигига релаксат таъсири силлиқ мускул хужайраларида  $\text{Ca}^{2+}$ –каналлини блокклаши орқали  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  концентрациясини камайтиришидан далолат беради ва бу натижалар дезоксипеганиннинг синаптосомаларда  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  концентрациясини камайтиришини кўшимча тасдиқловчи маълумот ҳисобланади.

7. Рутан, госситан ва дезоксипеганин каби биологик фаол моддалар ёрдамида *in vitro* шароитида ўтказилган тажрибалар асосида алкогольдан турлича захарланиш оқибатида ГАМК– ва NMDA–рецепторларида келиб чиққан патологик ўзгаришларни бошқариш мумкинлиги қайд этилди.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.27.06.2017. В.38.01 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ  
УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ МИКРОБИОЛОГИИ  
И НАЦИОНАЛЬНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ УЗБЕКИСТАНА**

---

**ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

**ХОШИМОВ НОЗИМЖОН НУМОНЖОНОВИЧ**

**ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЙСТВИЯ ПОЛИФЕНОЛОВ  
(РУТАНА, ГОССИТАНА) И АЛКАЛОИДА (ДЕЗОКСИПЕГАНИНА)  
НА ТРАНСПОРТ  $Ca^{2+}$  В СИНАПТОСОМАХ МОЗГА КРЫС**

**03.00.08 – Физиология человека и животных**

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ ДОКТОРА ФИЛОСОФИИ (PhD)  
ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ**

**Ташкент - 2018**

Тема диссертации доктора философии (PhD) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером B2017.1. PhD/B28.

Диссертация выполнена в Институте биоорганической химии  
Автореферат диссертации на трех языках (узбекский, русский, английский (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета (info@microbio.uz) и Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» (www.ziynet.uz).

**Научный руководитель:**

**Насиров Кабил Эркинович**  
доктор биологических наук

**Официальные оппоненты:**

**Кучкарова Любовь Салижановна**  
доктор биологических наук, профессор

**Есимбетов Адилбай Тлепович**  
кандидат биологических наук, доцент

**Ведущая организация:**

**Андижанский государственный университет**

Защита диссертации состоится «24» апреля 2018 года в \_\_\_ часов на заседании Научного совета DSc.27.06.2017. В.38.01 при Институте микробиологии и Национальном университете Узбекистана (Адрес: 100128, г. Ташкент, Шайхонтохурский район, ул. А. Кадырий, 7б, конференц-зал института Микробиологии, 3-й этаж. Тел.: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, факс: (+99871) 241-92-71, e-mail: info@microbio.uz).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института микробиологии (зарегистрирована под № 7). Адрес: 100128, г. Ташкент, Шайхонтохурский район, ул. А. Кадырий 7 б, Административное здание Института микробиологии, 5-й этаж, библиотека Института микробиологии. Тел.: (+99871) 241-92-28.

Автореферат диссертации разослан: «12» апреля 2018 г.  
(реестр протокола рассылки № 7 от «12» апреля 2018 г).



**Арипов Тахир Фатихович**  
Председатель научного совета по присуждению  
ученых степеней, д.б.н., профессор, академик

**Ахмедова Захро Рахматовна**  
Ученый секретарь научного совета по присуждению  
ученых степеней, д.б.н., профессор

**Рахимова Турашон Узаковна**  
Председатель научного семинара при научном  
совете по присуждению ученых степеней, д.б.н., профессор

## ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))

**Актуальность и востребованность темы диссертации.** В настоящее время во всем мире отмечается неуклонный рост числа социально значимых нейродегенеративных заболеваний вследствие нарушения кальциевого гомеостаза нервных клеток<sup>1,2</sup>. Биологически активные соединения являются перспективными источниками при создании эффективных нейропротекторных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний, а также заболеваний центральной/периферической нервной системы, повреждающиеся при патогенезе токсикологической и наркологической интоксикаций.

На сегодняшний день во всем мире в научных исследованиях, проведенных в этом направлении выявлено, что нейродегенеративные заболевания вызваны дисфункцией ионно-транспортных систем и рецепторных комплексов, которые представляют функциональную активность клеток симпатической/парасимпатической нервной системы мозга.  $Ca^{2+}$  является центральным компонентом в процессах передачи сигналов и возбудимости/регенерации в нервных клетках, особенно в синапсах мозга  $[Ca^{2+}]_{in}$ , что приводит к серьезным патологическим состояниям. С этой точки зрения изучение механизмов фармакологической коррекции  $Ca^{2+}$  - транспорта биологически активных веществ в синапсах в патологических состояниях имеет актуальное научно-практическое значение.

В настоящее время в нашей стране проведены масштабные реформы по улучшению материально-технической базы диагностики и лечения заболеваний нервной системы, обеспеченности фармацевтическими препаратами. В области профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний достигнуты определенные результаты в части производства эффективных нейропротекторных препаратов на основе местного сырья. Необходимо отметить, что, разработкам современных методов диагностики заболеваний, в основе которых лежит нарушение  $Ca^{2+}$ - гомеостаза, нейродегенеративных заболеваний, патологий связанных с изменением нервных клеток, при токсикологических и наркологических интоксикациях, уделено недостаточное внимание. Внедрение комплексных мер в этом направлении послужит ориентиром для дальнейшего развития фармацевтической промышленности, а также для улучшения предоставления доступных и высококачественных лекарств населению и поставщикам медицинских услуг, перечисленных в Стратегии действий для дальнейшего развития Республики Узбекистан. В этом отношении, играет важную роль создание нейропротекторных препаратов, на основе местного сырья, конкурентоспособных на мировом рынке.

---

<sup>1</sup> The World Health Organization ([www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics))

<sup>2</sup> World Federation of Neurology ([www.wfneurology.org](http://www.wfneurology.org))

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в Постановлении Президента Республики Узбекистан от 28 ноября 2011г № ПП-1652 «О мерах по дальнейшему углублению реформирования системы здравоохранения», Указе Президента Республики Узбекистан от 7 февраля 2017 г № УП-4947 «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

**Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики.** Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетными направлениями развития науки и технологий республики VI «Медицина и фармакология».

**Степень изученности проблемы.** Проведены многочисленные исследования о роли  $[Ca^{2+}]_{in}$  в динамике функциональной активности нервных клеток *in vitro* и *in vivo* и в изучении механизмов их регулирования. Bhandage A.K. (2016) исследовал механизмы фармакологической регуляции ГАМК-рецепторов, которые активировались  $\gamma$ -аминомасляной кислотой (ГАМК), одним из основных двигательных / нейротрансмиттеров, влияющих на центральную нервную систему через ионотропные / метаболические каскады. Глутаминовый ионотропный каскад через - рецептор глутамата (iGlu-AMPA / универсум и NMDA-рецептор) и ГАМК находятся под влиянием ГАМК-А-рецептора. Tagliaferri S. (2010) проанализировал важность глутаматного рецептора  $[Ca^{2+}]_{in}$  в гомеостазе в нервных клетках. Remiro P.B. (2013) охарактеризовал динамику изменений концентрации  $[Ca^{2+}]_{in}$  в нервных клетках при интоксикации этанолом. Kaur P. (2008) выявил молекулярные механизмы функциональной активности мозговых синапсом крыс при нейротоксическом эффекте. Rosa R.M. и другие (2007), Тарасенко А.С. и другие (2010) исследовали механизмы регуляции функции синапсом мозга крыс через рецептор глутамата. Кроме того, Кухта В.К и другие. (2010) научно обосновали влияние биологически активных веществ, экстрагированных из растений на транспорт  $Ca^{2+}$  у крыс, на цереброспинальных синапсом головного мозга, при этом была установлена важная роль ионов  $Ca^{2+}$  как центрального мессенджера в процессе трансдукции и передачи сигнала в нервных клетках.

В нашей республике П.Б.Усмановым, Д.Каликулоым и др. (1985) проведены исследования по изучению влияния алкалоидов и токсинов на транспорт  $Ca^{2+}$  на синапсом мозга крыс, однако из-за высокого спроса на нейропротекторные препараты, а также в связи с тем, что влияние биологически активных веществ растительного происхождения на нервную систему пока еще недостаточно изучено, исследования в этом направлении представляются актуальными и имеют научно-практическое значение.

**Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами института, где выполнена диссертация.** Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно-исследовательских работ прикладного проекта Института биоорганической химии АН РУз ФА-А10-Т086

«Разработка новых методов профилактики и лечения алкоголизма и связанных с ним осложнений» (2012-2014).

**Целью исследования** является характеристика механизма действия рутана, госситана и дезоксипеганина в условиях *in vitro* на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в синапсосомах головного мозга крыс, а также обоснование их нейропротекторных свойств.

**Задачи исследования:**

исследование действия глутамата в синапсосомах головного мозга крыс на  $\text{Ca}^{2+}$ -проницаемость пресинаптической мембраны и концентрацию  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$ ;

определение нарушения активности ГАМК- и NMDA-рецепторов и изменение концентрации  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  в синапсосомах мозга крыс при хронической алкогольной интоксикации;

характеристика механизма действия рутана, госситана и дезоксипеганина на регуляцию транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  глутамат-, NMDA-, ГАМК-рецепторами в синапсосомах мозга крыс в контрольной группе;

обоснование корректирующего действия рутана, госситана и дезоксипеганина на регуляцию транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в синапсосомах мозга крыс в условиях хронической алкогольной интоксикации и обоснование нейропротекторных свойств;

сравнительный анализ влияния дезоксипеганина на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в тромбоцитах, синапсосомах мозга крыс и сосудистых гладкомышечных клетках.

**Объектом исследования** являются полифенолы - рутан, госситан и алкалоид дезоксипеганин, выделенные из растений, суспензия синапсосом мозга крыс, суспензия тромбоцитов, препарат аорты кровеносных сосудов.

**Предметом исследования** является исследование влияния рутана, госситана и дезоксипеганина на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в синапсосомах головного мозга крыс в условиях острой и хронической алкогольной интоксикации у крыс.

**Методы исследования.** В ходе исследования использованы методы дифференциального центрифугирования, спектрофотометрии, флуоресценции, аппаратное/программное обеспечение USB 2.000 (Ocean Optics Inc., США), которое оценивает динамику транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в синапсосомах мозга крыс в условиях *in vitro*, программный пакет математического и статистического анализа с использованием OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, США) для обработки результатов.

**Научная новизна диссертационного исследования** состоит в следующем:

выявлено с помощью  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительного зонда - хлортетрациклина повышение проницаемости пресинаптической мембраны при низких концентрациях глутамата, а также возрастание концентрации  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  в синапсосомах мозга крыс;

обосновано протекторное действие рутана в условиях хронической алкогольной интоксикации на динамику  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  в нервных клетках;

установлена конкуренция между госситаном и нифедипином за счет регулирования дигидропиридин-чувствительных кальциевых каналов;

выявлено антитоксическое действие алкалоида дезоксипеганина подобно глутамату в условиях хронической алкогольной интоксикации путем модуляции активности NMDA-рецепторов;

доказано действие дезоксипеганина на выход  $\text{Ca}^{2+}$  из внутреннего депо тромбоцитов, обусловленное снижением активности  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$ , а также релаксантное действие на гладкомышечные клетки за счет блокирования  $\text{Ca}^{2+}_L$ -канала.

**Практические результаты исследования** заключаются в следующем:

Полученные научные результаты по изучению действия рутана, госситана и дезоксипеганина на транспорт ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в синапсосах головного мозга крыс используются в качестве научной основы при разработке потенциальных терапевтических нейропротекторных фармакологических препаратов. Полученные результаты расширяют диапазон теоретических знаний о механизмах антитоксического действия биологически активных веществ в условиях алкогольной интоксикации. Кроме того, результаты по изучению механизма действия рутана, госситана и дезоксипеганина на интенсивность флуоресценции суспензий синапсосом мозга крыс в условиях *in vitro*, с практической точки зрения, позволяют разработать фармакологические препараты с нейропротекторными свойствами, действующих путем модуляции динамики  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  с помощью ГАМК-, NMDA-рецепторов нервных клеток.

**Достоверность результатов исследования** подтверждается тем, что они получены с применением современных биофизических методов и приборов, программных продуктов. Каждый эксперимент проводился как минимум в 4-6 кратном повторении. Для статистической обработки достоверности различий в сравниваемых показателях использовали коэффициент Стьюдента, компьютерную программу OriginPro 7.5; (Origin Lab Corporation, США).

**Научная и практическая значимость результатов исследования.**

Научная значимость результатов исследования обусловлена тем, что определение механизмов фармакологической регуляции функциональной активности NMDA-рецепторы и  $\text{Ca}^{2+}$ -транспорты гомеостаза  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  в синапсосах головного мозга методом флуоресценции расширяет диапазон теоретических знаний.

Практическое значение результатов исследования состоит в том, что факты, установленные по механизму действия рутана, госситана и дезоксипеганина на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в синапсосах головного мозга крыс могут служить для фармакологической коррекции и лечения заболеваний нервной системы, в частности, состояния хронической и острой алкогольной интоксикации, и могут использоваться в разработке новых эффективных препаратов.

**Внедрение результатов исследования.** На основании полученных данных по изучению действия рутана, госситана и дезоксипеганина на транспорт кальция в синапсосомах головного мозга крыс:

полученные результаты по исследованию механизмов развития нейродегенеративных процессов на молекулярном уровне и их коррекция при помощи нейропротекторных препаратов использованы в фармакологической классификации лекарственных препаратов (справка № 29/09-1058 ГУП Гос. центра экспертизы и стандартизации лекарственных средств изделий медицинского назначения и медицинской техники МЗ РУз от 27 марта 2018 г.). В результате появилась возможность исследования специфической активности лекарственных препаратов - нейростимуляторов в лаборатории фармакологических и токсикологических исследований государственного центра;

действия рутана, госситана и дезоксипеганина на  $Ca^{2+}$ -транспорт в синапсосомах головного мозга крыс использованы в рамках проекта ФА–А11–Т057 «Создание центра высокоэффективного скрининга биологически активных соединений природного и синтетического происхождения» для  $Ca^{2+}$ - транспорта мембран синапсосом головного мозга крыс при гипоксии и при определении механизма действия на NMDA-рецептор (справка ФТА-02-11/1148 Агентства науки и технологии от 21 ноября 2017 г.). В результате установлено на основе блокирования  $Ca^{2+}$ -транспорта мембран синапсосом при гипоксии уменьшения  $[Ca^{2+}]_{in}$  через NMDA–рецептор постсинаптических мембран, можно охарактеризовать нейропротекторные свойства.

**Апробация результатов исследования.** Результаты исследований были обсуждены на 4 международных и 1 республиканской научно-практических конференциях.

**Опубликованность результатов исследования.** По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 5 научных статей, в том числе 3 в республиканских и 2 в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертации.

**Структура и объем диссертации.** Структура диссертации состоит из введения, пяти глав, выводов, списка использованной литературы. Объем диссертации составляет 114 страниц.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Во введении** обосновывается актуальность и востребованность проведенных исследований, цель и задачи исследований, характеризуются объект и предмет исследования, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики Узбекистан, излагаются научная новизна и практические результаты исследования, научно-практическая значимость полученных результатов, внедрение результатов исследования в практику, приведены сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

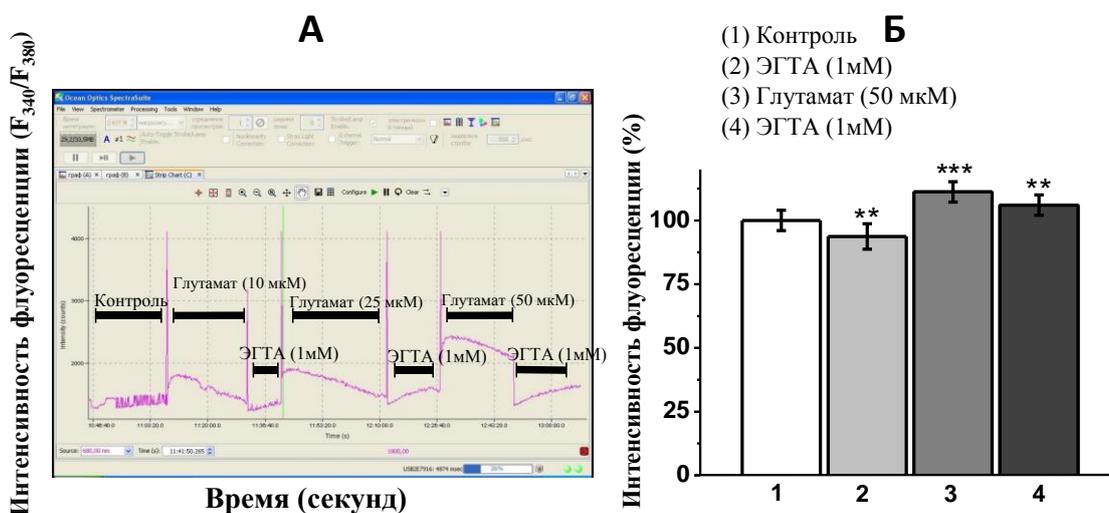
В первой главе диссертации «**Механизмы регуляции гомеостаза  $[Ca^{2+}]_{in}$  в нервных клетках**», на основе анализа современной литературы приводятся сведения о механизмах регуляции  $Ca^{2+}$ -гомеостаза в нервных клетках, о механизмах регуляции  $Ca^{2+}$ -транспорта и  $Ca^{2+}$ -гомеостаза глутамат- и NMDA-рецепторами головного мозга, о структуре и функциях глутамат-NMDA-, и AMPA-рецепторов, сведения о механизмах интоксикации этанолом.

Во второй главе диссертации «**Методы изучения транспорта  $Ca^{2+}$  в синапсосомах головного мозга крыс**» приведены этапы проведения исследований, используемые материалы и методы при экспериментальном моделировании хронической алкогольной интоксикации, методы выделения из головного мозга крысы суспензий синапсосом методом дифференциального центрифугирования в норме и при алкогольной интоксикации, методы оценки динамики  $[Ca^{2+}]_{in}$  в синапсосомах, методы выделения тромбоцитов для сравнительного анализа динамики  $[Ca^{2+}]_{in}$  в системе гемостаза и в гладкомышечных клетках сердечно-сосудистой системы, методы изучения агрегации тромбоцитов и их функциональной активности, методы регистрации механической активности препарата аорты, а также методы математической и статистической обработки полученных результатов.

В третьей главе диссертации «**Регуляция  $Ca^{2+}$ -транспорта в синапсосомах головного мозга крыс рецепторами глутамата**» приведены результаты исследований по анализу изменения динамики свободного  $[Ca^{2+}]_{in}$  путем активации глутаматного рецептора, локализованного в синаптической мембране, на основе регистрации изменения интенсивности флуоресцентного сигнала ( $F_{340}/F_{380}$ ) в суспензии синапсосом головного мозга крыс с помощью  $Ca^{2+}$ -чувствительных флуоресцентных зондов. В экспериментах с использованием  $Ca^{2+}$ -чувствительного зонда - хлортетрациклина (ХТЦ) преинкубированного с комплексом  $Ca^{2+}$  - этиленгликоль (бис-аминоэтил эфир)-N, N-тетрауксусной кислотой (ЭГТА) (1 мМ) ( $[Ca^{2+}]_{out}=0$  мМ) приводило к снижению флуоресценции на 5% по сравнению с контролем. В условиях инкубации с ЭГТА (1 мМ) интенсивность флуоресценции под воздействием L-глутамата (10–50 мкМ) увеличивается на 5–10%, что обусловлено повышением проводимости синаптических мембран для ионов  $Ca^{2+}$ , соответственно, перемещением ионов  $Ca^{2+}$  в цитозоль, а также увеличением концентрации  $[Ca^{2+}]_{in}$  за счет освобождения  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных «депо» (рис.1).

В следующих экспериментах, в случае внесения в среду суспензий синапсосом L-глутамата (100 мкМ) интенсивность флуоресцентного сигнала, аналогична с тем, что наблюдалось в условиях инкубации с KCl (30 мМ), в двухфазном типе, т.е. в 1-фазе, первоначально изменялась относительно быстро (в течение 5-10 секунд) и возвращалась в исходное состояние, а в следующей 2-фазе –повышалась относительно медленно. 1-фаза протекает пропорционально к концентрации L-глутамата (10–100 мкМ) и обусловлена изменением флуоресцентного сигнала по типу «всплеска» в результате

процесса экзоцитоза большого количества везикул под воздействием деполяризации пресинаптической мембраны и увеличения концентрации  $[Ca^{2+}]_{in}$ .



**Рис.1.** Действие L-глутамата (10–50 мкМ) на интенсивность флуоресценции в суспензии синапсом головного мозга крыс при инкубации с ЭГТА (1 мМ). А. Оригинальный снимок. Б. Повышение воздействия L-глутамата (50 мкМ) на интенсивность флуоресценции. Показатель достоверности \*-  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$ ; \*\*\* -  $P < 0,001$ . ( $n=6$ ).

При увеличении концентрации L-глутамата наблюдалось сокращение периода продолжительности *lag*-фазы между 1 и 2 фазами. Также, при добавлении в инкубационную среду L-глутамата в концентрации 100 мкМ повторная флуоресценция не наблюдалась.

Далее в экспериментах проводился сравнительный анализ влияния L-глутамата (10–50 мкМ) и раствора KCl (35 мМ) на интенсивность флуоресценции суспензии синапсом. Наблюдаемый нами двухфазный процесс глутамат индуцированного высвобождения протонов из синаптических везикул нервных терминалей мозга крыс коррелирует с двухступенчатым повышением концентрации кальция под воздействием глутамата.

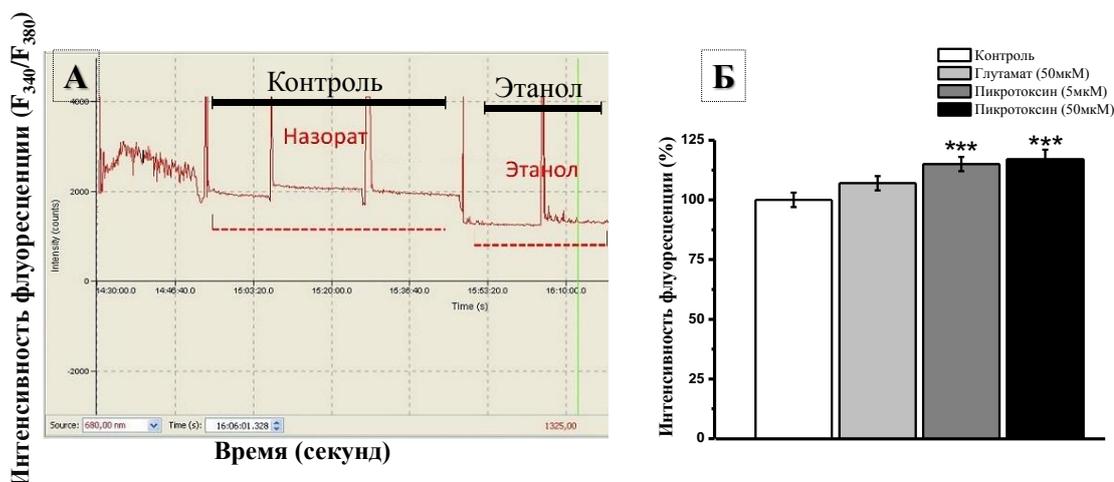
Изменения интенсивности флуоресценции, полученные в экспериментах, по двухфазному характеру могут быть связаны с увеличением концентрации  $[Ca^{2+}]_{in}$  в двух этапах в цитозоле под влиянием L-глутамата в синапсосоме и усилением выделения из везикул ионов  $H^+$ . Увеличение концентрации  $[Ca^{2+}]_{in}$  в цитозоле происходит за счет активации  $Ca^{2+}$ -каналов и реверсионном функционировании  $Na^+/Ca^{2+}$ -обменника (Siesjo and Bengtsson, 1989). Кроме того, концентрация  $[Ca^{2+}]_{in}$  может также увеличиться не только за счет поступления из внешней среды, но и за счет выхода из саркоплазматического ретикулума (СР) и митохондрий, а также ингибирования активности механизмов сокращения ионов  $Ca^{2+}$  в цитозоле. В условиях инкубации с ЭГТА (1 мМ), т.е. в условиях  $[Ca^{2+}]_{out}=0$  мМ, 1-фаза сохраняется, при которой под воздействием L-глутамата (100 мкМ)

интенсивность ХТЦ-флуоресценции изменяется по «быстрому» типу, однако изменение интенсивности по типу «вспышки» не наблюдается. Аналогичная тенденция наблюдалась и при воздействии KCl (35 мМ). Также преинкубация с блокатором Ca<sup>2+</sup>-канала – Cd<sup>2+</sup> (25 мМ) не приводила к увеличению интенсивности ХТЦ-флуоресценции при действии L-глутамата (100 мкМ)/KCl (35 мМ). Как известно, изменение интенсивности ХТЦ-флуоресценции при действии с L-глутаматом (100 мкМ) обусловлено увеличением концентрации [Ca<sup>2+</sup>]<sub>in</sub> в цитозоле путем активизации NMDA- и глутаматных рецепторов, а при инкубации с KCl (35 мМ) увеличение концентрации [Ca<sup>2+</sup>]<sub>in</sub> происходило за счет активизации Ca<sup>2+</sup>-канала в результате деполяризации мембраны. На основе полученных данных, можно предположить, что изменение интенсивности ХТЦ-флуоресценции в суспензии синапсом при инкубации с L-глутаматом (100 мкМ) в первой фазе по относительно «быстрому» типу связано с активацией α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионной кислоты (АМПА)/ каинатного рецептора, расположенного в постсинаптической мембране. Подтверждена важная роль АМПА/каинатного рецептора в ГАМК-ергической трансмиссионной быстрой сигнальной трансдукции (Mayer et al., 1989; Cossart et al., 2001; Lerma, 2006; Fiszman et al., 2007; Mathew et al., 2008). Кроме того, сохранение в условиях инкубации с блокатором Ca<sup>2+</sup>-канала – Cd<sup>2+</sup> (25 мМ) (Mayer et al., 1989) 1-фазы, при которой под влиянием L-глутамата (100 мкМ) интенсивность ХТЦ-флуоресценции изменяется по «быстрому» типу можно объяснить тем, что под влиянием Cd<sup>2+</sup> (25 мМ) в условиях блокирования поступления в цитозоль ионов Ca<sup>2+</sup> через NMDA-рецепторов сохраняется активность (возбуждение) АМПА/каинатных рецепторов.

Установлено, что преинкубация с глицином (10–100 мкМ) под действием L-глутамата (100 мкМ) усиливает активацию NMDA-рецепторов. Кроме того, преинкубация со специфическим блокатором NMDA-рецептора – стрихнином (5 мМ), инкубация с глицином (100 мкМ) под действием L-глутаматом (100 мкМ) не оказывает усиливающего действия на интенсивность ХТЦ- флуоресценции. На основе полученных результатов можно предположить, что глицин и L-глутамат взаимодействует с различными функциональными сайтами NMDA-рецептора.

В четвертой главе диссертации **«Влияние полифенолов рутана, госситана и алкалоида дезоксипеганина на динамику [Ca<sup>2+</sup>]<sub>in</sub> в синапсосамах головного мозга крыс в норме и при алкогольной интоксикации»** при изучении влияния полифенолов рутана, госситана и алкалоида дезоксипеганина на транспорт [Ca<sup>2+</sup>]<sub>in</sub> в синапсосамах в условиях хронической алкогольной интоксикации с помощью активаторов/блокаторов ГАМК-рецептора установлено значительное уменьшение интенсивности флуоресценции при инкубации с этанолом (5-10 мМ) по сравнению с контролем (рис.2А). Добавление в инкубационную среду 50 мкМ глутамата не приводило к значительным изменениям интенсивности флуоресценции соответственно, клеточного метаболизма, обусловленным в первую очередь

активацией мембранной проницаемости. Преинкубирование с блокатором ГАМК-рецептора - пикротоксином (5-50 мкМ) приводило к повышению интенсивности флуоресценции (рис.2Б).



**Рис.2.** А - Влияние этанола (100 мМ) на интенсивность флуоресценции в суспензии синапсом мозга крыс (Оригинальный снимок). Б - влияние блокатора ГАМК–рецептора (5–50 мкМ) на интенсивность флуоресценции в суспензии синапсом мозга крыс. Показатель достоверности \*- P<0,05; \*\*- P<0,01; \*\*\*- P<0,001. (n=6).

Известно, что в условиях аллостерического блокирования ГАМК–рецептора пикротоксином (5–50 мкМ) активируется NMDA–рецептор, и что хроническая алкогольная интоксикация приводит к повышению активности ГАМК-рецепторов, что в свою очередь приводит к повышению  $[Ca^{2+}]_{in}$  за счет поступления ионов  $Ca^{2+}$  в цитозоль, и что этанол, путем модуляции функциональной активности NMDA–рецепторов, приводит к глутаматергической нейротрансмиссионной дисфункции (Lima–Landman and Albuquerque, 1989; White et al., 1990). Также отмечается, что один из механизмов действия хронической алкогольной интоксикации обусловлен изменением функции именно NMDA–рецептора (Simson et al., 1991; Gulya et al., 1991; Parsons et al., 1998).

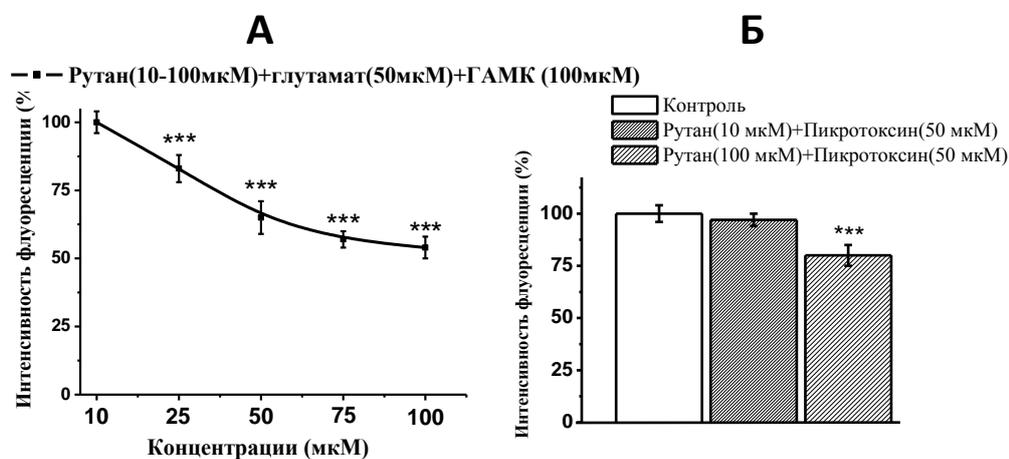
Доказано, что в результате усиления секреции глутамата при хронической алкогольной интоксикации возникает «эксайтотоксичность» (Dahchour and Witte, 2000). При хронической алкогольной интоксикации добавление в инкубационную среду агонистов ГАМК-рецептора - диазепам и фенобарбитала (50-100 мкМ), дозозависимо усиливают тормозящее действие ГАМК-рецептора и соответственно, снижают уровень внутриклеточного  $[Ca^{2+}]_{in}$ . На основании полученных нами данных можно объяснить, что активация ГАМК–рецептора при хронической алкогольной интоксикации обусловлена модуляцией каинат/AMPA рецептора путем дисфункции глутаматергической нейротрансмиссии. Выявлено, что при хронической алкогольной интоксикации L–глутамат (50 мкМ) и глицин (5 мкМ) в незначительной степени увеличивают интенсивность ХТЦ–флуоресценции суспензии синапсом. Согласно полученным данным, можно предположить, что под воздействием хронической алкогольной

интоксикации резко снижается чувствительность функциональных субъединиц NMDA–рецептора к L–глутамату и глицину. Кроме того, по окончании периода хронической алкогольной интоксикации, при отмене введения в организм экспериментальных животных этанола, у них возникает тревожное состояние. Установлено, что в таком состоянии в суспензии синапсом уровень интенсивности ХТЦ–флуоресценции у опытной группы крыс значительно выше по сравнению с контрольной группой. Таким образом, под действием этанола нарушается функция NMDA–рецептора, а увеличение интенсивности ХТЦ–флуоресценции в суспензии синапсом после отмены алкоголя можно объяснить реактивацией глутаматергической системы. В следующих сериях экспериментов при хронической алкогольной интоксикации при инкубации с блокатором рецептора глутамата – МК–801 (5 мкМ), при преинкубировании наблюдалось снижение на 20% интенсивности ХТЦ–флуоресценции в суспензии синапсом головного мозга крыс по сравнению с контрольной группой, а также снижение этого показателя по сравнению с контрольной группой на 35% в условиях инкубации с блокатором рецептора глутамата – аргиолобатыном (10 мкМ). Полученные результаты свидетельствуют о комплексном воздействии хронической алкогольной интоксикации на функциональные субъединицы NMDA–рецепторов.

Как известно, при хронической алкогольной интоксикации за счет усиления секреции глутамата в терминалах нервных клеток возникает патологическое состояние, которое называется «эксайтотоксичность» или эксайтотоксичность глутамата опосредуется NMDA–рецепторами, названными по специфическому антагонисту N–метил–D–аспартату. При взаимодействии глутамата с NMDA–рецептором резко увеличивается концентрация цитозольного  $[Ca^{2+}]_{in}$ , что приводит к запуску процесса гибели нервных клеток, характерного для болезни Паркинсона. Также предполагается, что глутамат-индуцируемое изменение функции каскада сигнализации, играет важную роль в развитии таких нейропатологий, как эпилепсия и болезнь Альцгеймера.

Выявлено, что противовирусный препарат «Амантадин» (Симметрел) впервые синтезированный в США, действует как антагонист NMDA–рецептора, блокирует каскад эксайтотоксических реакций. Этот препарат успешно применяется в нейроклинической практике для лечения болезни Паркинсона (Schwab and Poshanzer, 1969). На основании этих данных мы исследовали возможное противэксайтотоксическое действие противовирусных соединений - рутана и госситана. В экспериментах обнаружено, что в контрольной группе рутан (10-100 мкМ) в суспензии синапсом не приводил к значительному изменению интенсивности ХТЦ–флуоресценции. Также, рутан (50 мкМ) при преинкубации с L–глутаматом (50 мкМ) снижает интенсивность ХТЦ–флуоресценции. При преинкубировании рутана (10 мкМ) наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции комплекса ХТЦ–L–глутамат. Предварительно полученные результаты свидетельствуют о возможной конкуренции между рутаном и

глутаматом. Выявлено, что при хронической алкогольной интоксикации рутан (50 мкМ) незначительно увеличивает интенсивность флуоресценции. Кроме того, при инкубации с ГАМК (100 мкМ) добавление L-глутамата (50 мкМ) в суспензию синапсом снижает активность NMDA-рецепторов, что в свою очередь, при снижении концентрации  $[Ca^{2+}]_{in}$ , рутан (10–100 мкМ) снижает интенсивность флуоресценции (рис.3А).



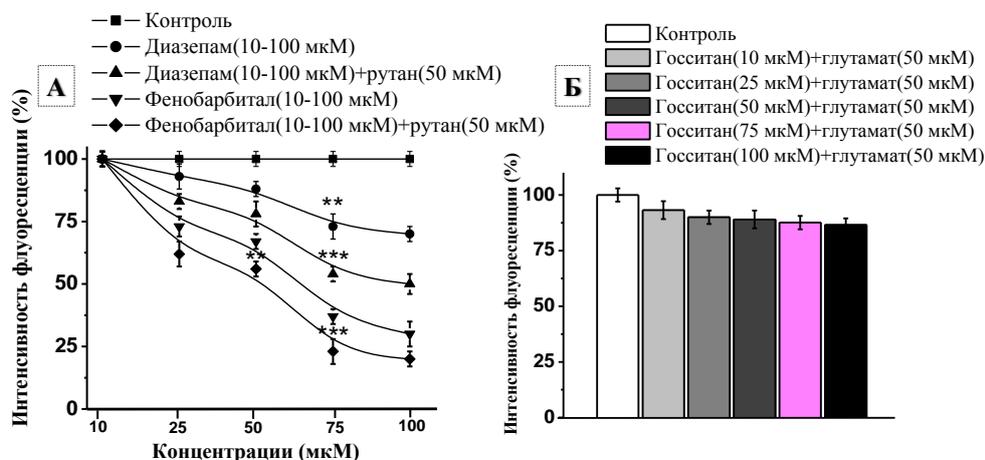
**Рис.3. А** - влияние полифенола рутан (10–100 мкМ) на интенсивность ХТЦ-флуоресценции в условиях инкубации с ГАМК (100 мкМ) при добавлении в среду с суспензией синапсом головного мозга крыс L-глутамата (50 мкМ). **Б**- влияние полифенола рутан (10–100 мкМ) на интенсивность флуоресценции ГАМК-ХТЦ-комплекса в условиях инкубации с антагонистом ГАМК-рецептора – пикротоксином (50 мкМ). Показатель достоверности \*- P<0,05; \*\*- P<0,01; \*\*\*- P<0,001. (n=6).

Установлено, что в условиях инкубации с антагонистом ГАМК-рецептора – пикротоксином (50 мкМ), рутаном (10–100 мкМ) значительно снижает интенсивность флуоресценции ГАМК-ХТЦ комплекса. Полученные результаты свидетельствуют о том, что рутан, снижая концентрацию  $[Ca^{2+}]_{in}$ , не оказывает влияние как антагонист на активность ГАМК-рецептора (рис.3Б). В экспериментах установлено, что в случае преинкубирования антагонистов ГАМК-рецептора - диазепам и фенобарбитала (10-100 мкМ) на фоне препарата рутана (50 мкМ) усиливается эффект на интенсивности флуоресценции (рис.4А).

В дальнейших экспериментах выявлено значительное снижение интенсивности флуоресценции ХТЦ-L-глутамат комплекса под воздействием полифенола госситана (10 мкМ). Кроме того, установлено, что в отличие от рутана, госситан не оказывает существенного влияния на действие L-глутамата в диапазоне рассматриваемой концентрации (10–100 мкМ) (рис. 4Б). Полученные результаты позволяют предположить, что препарат госситан не конкурирует с L-глутаматом. Возможно, их действие обусловлено взаимодействием с NMDA-рецепторами.

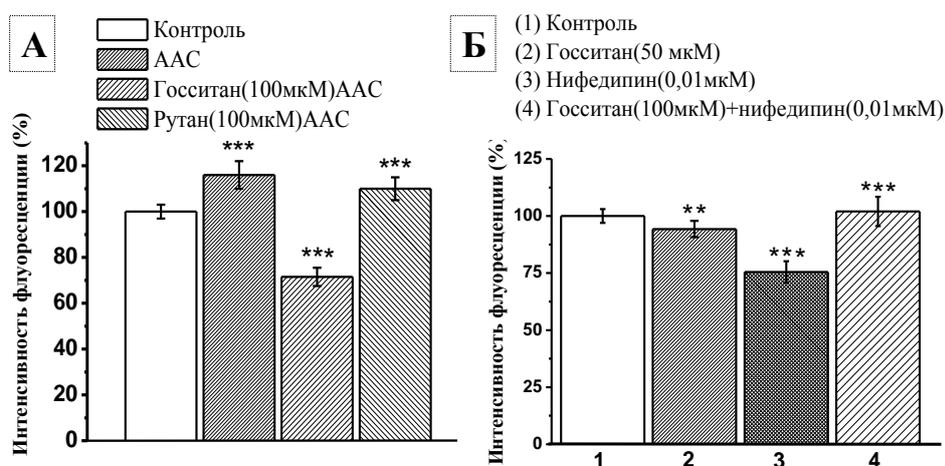
В экспериментах после отмены этанола, т.е. после окончания периода хронической алкогольной интоксикации, госситан (10–100 мкМ) дозозависимо снижал уровень интенсивности ХТЦ-флуоресценции в суспензии синапсом на фоне L-глутаматом (50 мкМ). Полученные

результаты свидетельствуют о том, что полифенол госситан в постинтоксикационном периоде снижает концентрацию  $[Ca^{2+}]_{in}$  в синапсосамах.



**Рис.4.** А- влияние агонистов ГАМК-рецептора – диазепама и фенобарбитала (10–100 мкМ) на интенсивность флуоресценции в условиях инкубации с рутаном (50 мкМ). Б-влияние полифенола госситан в зависимости от концентрации (10-100мкМ) на интенсивность ХТЦ–флуоресценции в суспензии синапсосом головного мозга крыс на фоне L–глутамата (50 мкМ) после завершения периода хронической алкогольной интоксикации. Показатель достоверности \*- P<0,05; \*\*- P<0,01; \*\*\*- P<0,001. (n=6).

В следующих экспериментах установлено, что после периода хронической алкогольной интоксикации рутан и госситан (100 мкМ) значительно снижают интенсивность ХТЦ–флуоресценции в суспензии синапсосом (рис.5А). Далее в экспериментах было установлено, что госситан (10–100 мкМ) при инкубировании с блокатором  $Ca^{2+}$ –канала - нифедипином (0,01 мкМ) значительно повышает интенсивность ХТЦ–флуоресценции (рис.5Б).



**Рис.5.** А-влияние рутана (100 мкМ) и госситана (100 мкМ) на значение ХТЦ–флуоресценции в суспензии синапсосом головного мозга крыс после периода хронической алкогольной интоксикации. Б-влияние полифенола госситан (100 мкМ) на интенсивность ХТЦ–флуоресценции в суспензии синапсосом головного мозга

крыс в условиях инкубации с блокатором  $\text{Ca}^{2+}$ -канала – нифедипином (0,01 мкМ). Показатель достоверности \*-  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$ ; \*\*\* -  $P < 0,001$ . ( $n=6$ ).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что действие полифенол госситана связано с блокированием активности  $\text{Ca}^{2+}$ -канала в синапсосамах.

При изучении влияния алкалоида дезоксипеганина на интенсивность флуоресценции для оценки динамики  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  путем модуляции функциональной активности глутаматергической нейромедиаторной системы выявлено, что дезоксипеганин в малых концентрациях (1–10 мкМ) почти не влияет на интенсивность ХТЦ-флуоресценции, а при концентрации 50–100 мкМ снижает интенсивность флуоресценции. Преинкубация с глутаматом (50 мкМ) дезоксипеганин дозозависимо (10–100 мкМ) снижает интенсивность ХТЦ-флуоресценции (рис.6).

Таким образом, при преинкубации с комплексом ХТЦ-L-глутамата, дезоксипеганин дозозависимо (10–50 мкМ) снижает интенсивность флуоресценции. По результатам проведенных исследований можно предположить возможную конкуренцию между дезоксипеганином и глутаматом за участок связывания регуляции открывания ионных каналов.

Как известно, глицин усиливает действие глутамата, а токсины AP5 и AV-2-1 снижают активность ГАМК-рецептора, т. е. они конкурируют с глутаматом. Кроме того, ионы  $\text{Mg}^{2+}$ , не конкурируя с глутаматом, воздействуют как антагонист ГАМК-рецептора. В целом, препарат МК-801 с нейропротекторными свойствами, аналогично с аргиолобатыном, с терапевтической точки зрения имеет важное значение в изучении механизмов действия модуляторов ГАМК-рецепторов.

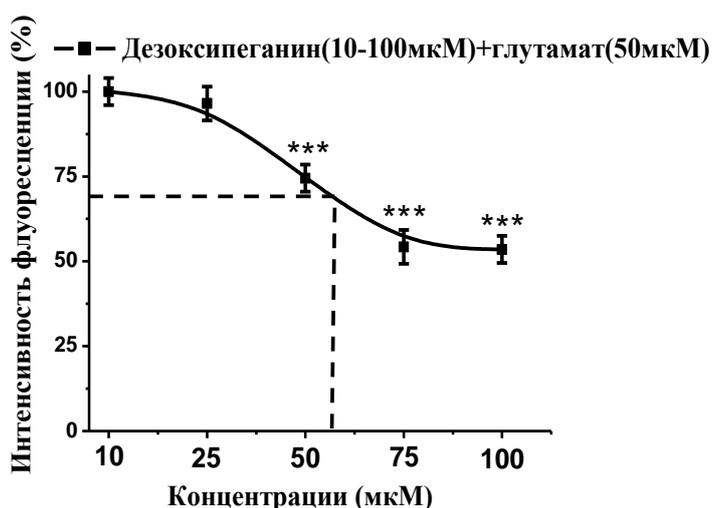


Рис.6. Влияние алкалоида дезоксипеганина (10–100 мкМ) на интенсивность флуоресценции в суспензии синапсом головного мозга крыс. Показатель достоверности \*-  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$ ; \*\*\* -  $P < 0,001$ . ( $n=6$ ).

В результате проведенных экспериментов получены данные, позволяющие предположить, что дезоксипеганин (50 мкМ) значительно усиливает действие агониста NMDA-рецептора – глицина (10 мкМ), что в

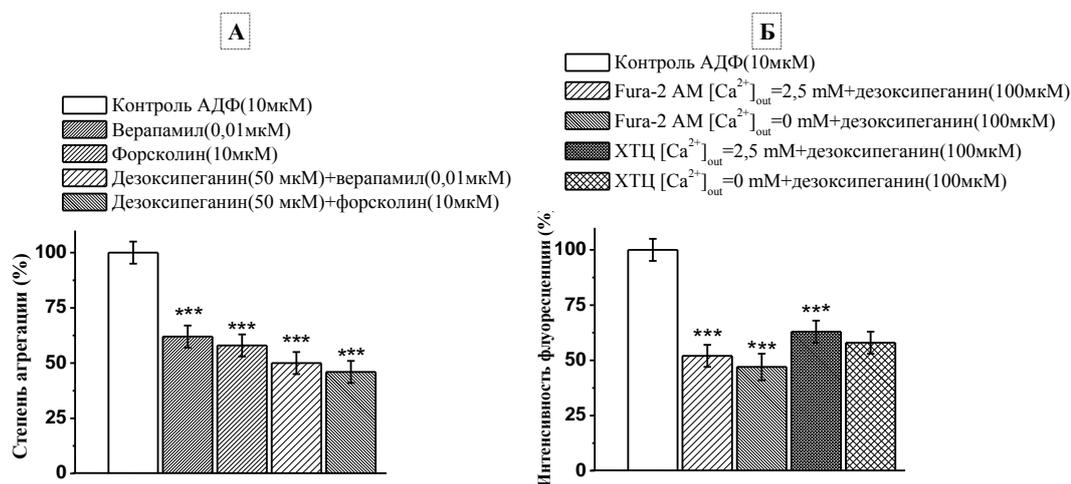
свою очередь, приводит к повышению концентрации  $[Ca^{2+}]_{in}$ , т.е. дезоксипеганин проявляет агонист/антагонистическое действие. В экспериментах было изучено влияние дезоксипеганина на NMDA–рецепторы с помощью ионов  $Mg^{2+}$  и аргиолобатина, и установлено, что  $Mg^{2+}$  (1 мМ) при инкубации с комплексом L–глутамат–ХТЦ в суспензии синапсом головного мозга крыс значительно снижает интенсивность флуоресценции. Кроме того, при преинкубации с дезоксипеганином (100 мкМ)  $Mg^{2+}$  (1 мМ) не оказывает существенного влияния на интенсивность флуоресценции. Аналогично, в условиях инкубации с дезоксипеганином (100 мкМ) аргиолобатин (5 мкМ), также не оказывает влияния на интенсивность флуоресценции. Полученные результаты позволяют предположить, что алкалоид дезоксипеганин непосредственно влияет на активность NMDA–рецептора.

Установлено, что инкубация дезоксипеганина (10–50 мкМ) в суспензии синапсом значительно увеличивает интенсивность ХТЦ–флуоресценции. А при преинкубации с L–глутаматом (50 мкМ) дезоксипеганин (10–50 мкМ) существенно снижает интенсивность флуоресценции. При алкогольной интоксикации дезоксипеганин (10–50 мкМ) снижает интенсивность флуоресценции, что в свою очередь, способствует снижению концентрации  $[Ca^{2+}]_{in}$ . Полученные результаты свидетельствуют о том, что создание нейропротекторного препарата с терапевтическим действием для лечения алкогольной интоксикации на основе данного алкалоида в фармакологии имеет хорошие перспективы. Установлено, что преинкубация с дезоксипеганином (100 мкМ) суспензии синапсом, выделенных из головного мозга крыс в постинтоксикационном периоде, в значительной степени изменяет интенсивность ХТЦ–флуоресценции.

Установлено, что алкалоид дезоксипеганин дозозависимо (10–100 мкМ) ингибирует тромбин, адреналин (1 мкМ) и АДФ-индуцируемую (10 мкМ) агрегацию тромбоцитов. При этом наиболее ингибирующим эффектом дезоксипеганин обладал при концентрации 100 мкМ и его ингибирующие свойства в большей степени проявляются при АДФ–индуцированной (10 мкМ) агрегации. Полученные результаты свидетельствуют о снижении концентрации  $[Ca^{2+}]_{in}$  под действием алкалоида дезоксипеганина.

Выявлено, что преинкубация с блокатором кальциевых каналов - верапамила (0,01 мкМ) и активатором аденилатциклазы - форсколина (10 мкМ) в значительной степени усиливает ингибирующие эффекты дезоксипеганина (50 мкМ) на АДФ–индуцированную (10 мкМ) агрегацию тромбоцитов (рис.7А).

На основе анализа полученных результатов можно предположить, что дезоксипеганин подавляет активность аденилатциклазы и снижает уровень внутриклеточного  $[Ca^{2+}]$ .



**Рис.7. А-** влияние алкалоида дезоксипеганина (50 мкМ) на АДФ-индуцируемую (10 мкМ) агрегацию тромбоцитов в условиях инкубации с блокатором Ca<sup>2+</sup>-канала - верапамилом (0,01 мкМ) и блокатором фермента аденилатциклазы – форсколином (10 мкМ). **Б-** влияние алкалоида дезоксипеганина (100 мкМ) в условиях [Ca<sup>2+</sup>]<sub>out</sub>=0 мМ и [Ca<sup>2+</sup>]<sub>out</sub>=2,5 мМ при агрегации тромбоцитов, вызванных под действием АДФ на интенсивность Fura-2/AM и ХТЦ-флуоресценции. Показатель достоверности \*- P<0,05; \*\*- P<0,01; \*\*\*- P<0,001. (n=6).

Исследовано антиагрегационное влияние дезоксипеганина с использованием флуоресцентных зондов Fura-2/AM и ХТЦ. Известно, что АДФ приводит к резкому увеличению внутриклеточной концентрации [Ca<sup>2+</sup>]<sub>in</sub> и что дезоксипеганин (100 мкМ) в условиях [Ca<sup>2+</sup>]<sub>out</sub>=0 мМ и [Ca<sup>2+</sup>]<sub>out</sub>=2,5 мМ при АДФ-индуцируемой агрегации ингибирует интенсивность Fura-2/AM и ХТЦ-флуоресценции (рис.7Б). Полученные результаты позволяют предположить, что антиагрегационное действие дезоксипеганина обусловлено снижением концентрации [Ca<sup>2+</sup>]<sub>in</sub> в тромбоцитах за счет ингибирования активности транспорта Ca<sup>2+</sup>, поступающего и выходящего из внутриклеточных депо.

В следующих сериях экспериментов было обнаружено, что дезоксипеганин (10–50 мкМ) в условиях *in vitro* оказывает релаксантное действие на KCl-индуцируемую (50 мМ) изометрическую сократительную активность препарата аорты крысы. Также установлено, что вазорелаксантное действие дезоксипеганина реализуется в зависимости от концентрации [Ca<sup>2+</sup>]<sub>out</sub> и он усиливает действие блокатора дигидропиридин-чувствительного Ca<sup>2+</sup><sub>L</sub>-канала - нифедипина (0,01 мкМ). Полученные данные свидетельствуют о том, что дезоксипеганин снижает концентрацию [Ca<sup>2+</sup>]<sub>in</sub> путем блокирования потенциал-зависимого Ca<sup>2+</sup><sub>L</sub>-канала плазматических мембран сердечно-сосудистых гладкомышечных клеток и могут служить дополнительным подтверждением того, что дезоксипеганин уменьшает концентрацию [Ca<sup>2+</sup>]<sub>in</sub> в синапсах.

В настоящее время в экспериментальной нейрологии создание эффективных фармакологических препаратов с нейропротекторными свойствами на основе биологически активных веществ растительного происхождения является одним из приоритетных направлений. С этой точки

зрения особенно перспективными агентами считаются алкалоиды и полифенольные соединения с широким спектром полифункционального фармакологического действия (Shikov et al., 2014).

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что в контрольной группе глутамат (10–100 мкМ) увеличивает интенсивность флуоресценции в суспензии синапсосом головного мозга крыс и уровень  $\text{Ca}^{2+}$ -проницаемости пресинаптической мембрана, следовательно и концентрацию  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$ .

2. Выявлено, что хроническая алкогольная интоксикация способствует повышению активности ГАМК- и NMDA-рецепторов, что в свою очередь, приводит к патологическому изменению концентрации  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$ .

3. Впервые выявлено, что при хронической алкогольной интоксикации рутан возможно конкурентно с L-глутаматом, а госситан неконкурентно с L-глутаматом оказывают положительное действие на динамику  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  в нервных клетках.

4. Алкалоид дезоксипеганин (10-100 мкМ) аналогично L-глутаматом, в условиях хронической алкогольной интоксикации путем модуляции активности NMDA-рецепторов оказывает антитоксическое действие.

5. Впервые установлено, что антиагрегационное действие алкалоида дезоксипеганина (100 мкМ) в тромбоцитах за счет снижения активности вне и внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ -транспорта выражается в снижении концентрации  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$ . Это имеет важное значение в качестве дополнительного подтверждения факта снижения концентрации  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  в синапсосомах под действием алкалоида дезоксипеганина.

6. Релаксантное действие дезоксипеганина (10-50 мкМ) в условиях *in vitro* на активность изометрического сокращения препарата аорты крыс связано с уменьшением концентрации  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  за счет блокирования  $\text{Ca}^{2+}_L$ -канала клеток гладких мышц. Эти данные могут служить дополнительным подтверждением того, что дезоксипеганин уменьшает концентрацию  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  в синапсосомах.

7. Обнаружено, что на основании проведенных экспериментов в условиях *in vitro*, с использованием биологически активных веществ, таких как рутан, госситан и дезоксипеганин можно регулировать патологические изменения в ГАМК- и NMDA-рецепторах при разных состояниях алкогольной интоксикации.

**SCIENTIFIC COUNCIL AWARDING SCIENTIFIC DEGREES  
DSc.27.06.2017.B.38.01 AT INSTITUTE OF MICROBIOLOGY AND  
NATIONAL UNIVERSITY OF UZBEKISTAN**

---

**INSTITUTE OF BIOORGANIC CHEMISTRY**

**KHOSHIMOV NOZIMJON NUMONJONOVICH**

**CHARACTERISTICS OF THE ACTION OF POLYPHENOLS (RUTAN,  
GOSSITAN) AND ALKALOID (DESOXYPEGANIN) ON THE  
TRANSPORT OF Ca<sup>2+</sup> IN THE BRAIN SYNAPTOSOMES OF RATS**

**03.00.08 – Human and animal physiology**

**DISSERTATION ABSTRACT OF THE DOCTOR OF  
PHILOSOPHY (PhD) ON BIOLOGICAL SCIENCES**

**Tashkent – 2018**

**The title of the doctoral dissertation (PhD) has been registered by the Supreme Attestation Commission at the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan with registration numbers of B2017.1.PhD/B28**

The dissertation has been prepared at the Institute of Bioorganic Chemistry.

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (resume)) languages on the website of the Scientific Council (info@microbio.uz) and on the website of «Ziyonet» information-educational portal (www.ziyonet.uz).

**Scientific supervisor:**

**Nasirov Kabil Erkinovich**  
doctor of biological sciences

**Official opponents:**

**Kuchkarova Lyubov Salijanovna**  
doctor of biological sciences, professor

**Yesimbetov Adilbay Tlepovich**  
Doctor of philosophy

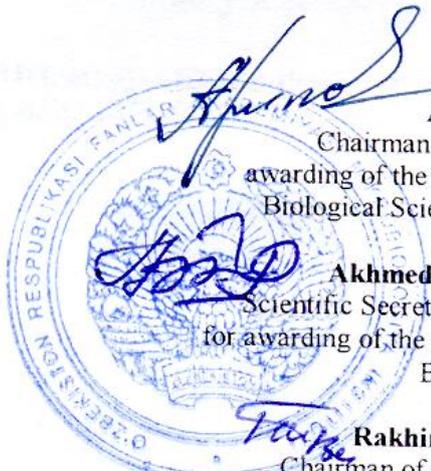
**Leading organization:**

**Andijan State University**

The defense of the dissertation will take place on «24» april 2018 year. 10:00 at the meeting of the Scientific council DSc.27.06.2017. B.38.01 on award of scientific degrees at the Institute of Microbiology and National University of Uzbekistan (Address: 100128, Tashkent, 7B A. Kadyri str. Conference hall of the palace of the Institute of Microbiology. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, Fax: (+99871) 241-92-71).

The dissertation has been registered at the Informational Resource Centre of Institute of Microbiology (100128, Tashkent, 7B A.Kadyri str. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, Fax: (+99871) 241-92-71), e-mail: (info@microbio.uz).

Abstract of dissertation is distributed on «12» April 2018 year.  
(Protocol at the register 7 on «12» April 2018 year)



**Aripov Takhir Fatikhovich**  
Chairman of the Scientific Council for  
awarding of the scientific degrees, Doctor of  
Biological Science, professor, academician

**Akhmedova Zakhro Rakhmatovna**  
Scientific Secretary of the Scientific Council  
for awarding of the scientific degrees, Doctor of  
Biological Science, professor

**Rakhimova Turakhon Uzokovna**  
Chairman of the Scientific seminar under  
Scientific Council for awarding the scientific  
degrees, Doctor of Biological Science,  
professor

## INTRODUCTION (abstract of PhD thesis)

**The aim of the research work** is to describe the characterization of mechanism of effect of rutan, gossitan and desoxypeganin on the transport of  $\text{Ca}^{2+}$  in the brain synaptosomes and to justify the neurotransmitter properties.

**The objects of the research** are isolated from plants - rutan, gossitan polyphenols and alkaloid desoxypeganin, rats cerebral synaptosomes suspension, platelet suspension, aortic vascular.

**The novelty of the research** consists of the following:

revealed with the help of  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive probe CTC it was obtained the increasing permeability of the presynaptic membrane at low concentration of glutamate as well as increasing of concentration of  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  in rat brain synaptosomes;

revealed that in the conditions of chronic alcohol intoxication rutan has a protective effect on the dynamics of  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  in nerve cells;

the competition between gossitane and nifedipine was established due to regulation of dihydropyridine-sensitive calcium channels;

revealed the antitoxic action of alkaloid desoxypeganine similar to glutamate, in conditions of chronic alcohol intoxication by modulating the activity of NMDA-receptors;

the action of desoxypeganine to the exit of  $\text{Ca}^{2+}$  from inward depot of platelets was determined by the reduction of activity of  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$ , and the relapse effect on the vascular smooth muscle cells associated with  $\text{Ca}^{2+}_L$ -channel blockade.

**Implementation of the research results.** On the basis of scientific findings on the description of the effects of rutan, gossitan and desoxypeganine on the transport of  $\text{Ca}^{2+}$  in the brain synaptosomes of rats:

the obtained results on the investigation of mechanisms of development of neurodegenerative processes at the molecular level and their correction by neuroprotective drugs were it is used for pharmacological classification of medicinal products (certificate No. 29 / 09-1058 GUP State Center for Expertise and Standardization of Medicinal Products of Medical Devices and Medical Equipment of the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan 27 March 2018). As a result, it became possible to investigate the specific activity of drugs - neurostimulants in the laboratory of pharmacological and toxicological studies of the State Center;

rutan, gossitan and desoxypeganin effect on the transport of  $\text{Ca}^{2+}$  in the brain synaptosomes of rats at FA-A11-T057 "Creation of a center for highly effective screening of biologically active compounds of natural and synthetic origin" in the hypoxia rats synaptosomes membranes  $\text{Ca}^{2+}$  and the NMDA-receptor in determining effective mechanisms was used as a comparison to the mechanism of action (Certificate FTA-02-11/1148 of 21 November, 2017 of the Agency of Science and Technology of the Republic of Uzbekistan). As a result, it has been established that on the basis of blocking the  $\text{Ca}^{2+}$  transport of synaptic membranes under hypoxia a reduction in the  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  through the NMDA-receptor of postsynaptic membranes, one can characterize the neuroprotective properties.

**Structure and volume of the dissertation.** The dissertation consists of introduction, four chapters, conclusion, list of used literature and appendixes. The volume of the thesis is 114 pages.

**ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ**  
**СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ**  
**LIST OF PUBLISHED WORKS**

**I бўлим (I часть; I part)**

1. Хошимов Н.Н., Насиров К.Э., Раимова Г.М. Исследование уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$  в синапсосомах мозга крыс при алкогольном абстинентном синдроме // Узбекский биологический журнал. – Ташкент, 2014. – №6. – С.15–18 (03.00.00; №5).

2. Хошимов Н.Н., Насиров К.Э. Исследование действия алкалоида дезоксипеганина на глутаматергическую нейромедиаторную систему при хронической алкогольной интоксикации // Инфекция, иммунитет и фармакология. – Ташкент, 2015. – №4. – С.303–307 (03.00.00; №7).

3. Khoshimov N.N., Nasirov K.E., Rakhimov R.N. Research of action of preparat rutan on various sites of GABA–receptor at chronic alcoholic intoxication // Eastern European Scientific Journal. – Dusseldorf, 2015. – №3. – P.32–37. (03.00.00; №2).

4. Хошимов Н.Н., Насиров К.Э., Наджимова Х.К. Исследование взаимодействий ГАМК–ергической системы с NMDA–рецепторами под действием этанола // Ежемесячный научный медицинский журнал «Интер–медикал». Международное научное объединение «Inter–Medical». – Москва, 2015. – №6(12). – С.70–75 (03.00.00; №1).

5. Хошимов Н.Н., Насиров К.Э. Действие этанола на систему гемостаза и уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$  синапсосомах мозга крыс // Инфекция, иммунитет и фармакология. – Ташкент, 2015. – №5. – С.338–347 (03.00.00; №7).

**II бўлим (II часть; II part)**

6. Khoshimov N.N., Nasirov K.E., Rakhimov R.N. The research of action of preparations rutan and gossitan on the glutamate eksitetoxic mediated by NMDA–receptor at chronic alcoholic intoxication and cancellation of ethanol // Russian Journal of Biological Research. – Sochi, 2015. – V.4(2). – P.60–67 (№-17. Open Academic Journals Index - 0.1).

7. Хошимов Н.Н., Насиров К.Э., Рахимов Р.Н. Исследование действия препарата «госситана» на эксайтотоксичность глутамата при хронической алкогольной интоксикации // Сборник тезисов междунаро. конф. молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика». – Пущино, 2014. – С.128.

8. Хошимов Н.Н., Насиров К.Э. Исследование действия алкалоида дезоксипеганина на глутаматергическую нейромедиаторную систему при алкогольной интоксикации // Сборник тезисов междунаро. конф. молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика». – Пущино, 2014. – С.129–130.

9. Хошимов Н.Н., Насиров К.Э., Рахимов Р.Н. Исследование действия препарата «ругтана» на эксайтотоксичность глутамата, опосредуемую NMDA–рецепторами, при хронической алкогольной интоксикации // Сборник тезисов междунард. конф. молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика». – Пущино, 2014. – С.30– 131.

10. Хошимов Н.Н. Исследование взаимодействий ГАМКергической системы с NMDA–рецепторами // Материалы XVIII Международной медико–биологической научной конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье». – Санкт–Петербург, 2015. – С.579–580.

11. Хошимов Н.Н. Исследование внутриклеточного  $Ca^{2+}$  в синапсомозга крыс при хронической алкогольной интоксикации // Материалы XVIII Международной медико–биологической научной конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье». – Санкт–Петербург, 2015. – С.575–576.

12. Khoshimov N.N., Nasirov K.E, Raimova G.M. Actions of preparation gossitan on GABAergic system at chronic alcoholic intoxication // Материалы научной конференции «Биоэкономика и экобиополитика». – Казань, 2015. – №1. – С.139.

13. Хошимов Н.Н., Камолиддинова С.Б., Айтбекова Н., Маматова З.А. Влияние алкалоида дезоксипеганина на агрегацию тромбоцитов // Материалы научно–практической конференции «Современные аспекты физико–химической биологии и экотоксикологии» посвящ. 70–летию проф. У.З.Мирходжаева. – Ташкент, 2016. – С. 247–248.

Автореферат «Ўзбекистон биология журналы» журналы таҳририятида  
таҳрирдан ўтказилган.

**Бичими 60x84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Ризограф босма усули. Times гарнитураси.  
Шартли босма табағи: 3. Адади 75. Буюртма № 22.**

**«IMPRESS MEDIA» МЧЖ корхонасида чоп этилди.  
100022, Тошкент, Қушбеги кўчаси,6.**