GL25 POLIFENOLINING KALAMUSH BOSH MIYASI SINAPTOSOMALARIDA N-TIPLI KALSIY KANALLARI ORQALI CA^{2+} GOMEOSTAZIGA TA'SIRI

Xoshimov Nozim Numonjonovich
Biofizika va biokimyo instituti
Khoshimovn@gmail.com
Xayrullayeva Madina Anvarovna
O'zbekiston Milliy universiteti
khayrullaevamadina231@gmail.com
Qozoqov Islom Baxtiyarovich
Biofizika va biokimyo instituti
islombek25266465702526646570@gmail.com
https://doi.org/10.5281/zenodo.23283439

Annotatsiya. Ushbu maqolada GL25 polifenolining kalamush bosh miyasi sinaptosomalarida N-tipli kalsiy kanallari bilan bog'liq Ca^{2+} gomeostaziga ta'siri o'rganildi. Tajribalarda Fluo-4 AM fluoressensiya zondidan foydalanilib, levetirasetam fonida sinaptosomalardagi sitozolik kalsiy miqdorining o'zgarishi baholandi. Levetirasetamning 5–10 mkM konsentratsiyalarda qo'llanilishi fluoressensiya intensivligining susayishiga olib keldi. GL25 polifenolining 50 mkM konsentratsiyasi levetirasetam fonida qo'llanganda sitozoldagi kalsiy miqdorining yanada susayishi kuzatildi. Olingan natijalar GL25 va levetirasetamning birgalikdagi ta'siri neyronal kalsiy gomeostaziga ta'sir qilishi mumkinligini ko'rsatadi. Shu bilan birga, Fluo-4 AM usuli umumiy sitozolik Ca^{2+} o'zgarishini baholagani sababli, natijalar GL25 ning N-tipli kanalga bevosita selektiv bog'lanishini isbotlamaydi.
Kalit so'zlar: GL25 polifenoli, N-tipli kalsiy kanallari, Ca^{2+}, levetirasetam, Fluo-4 AM, sinaptosoma, kalsiy gomeostazi, neyron.

Аннотация. В статье изучено влияние полифенола GL25 на Ca^{2+}-гомеостаз в синаптосомах головного мозга крыс в условиях воздействия леветирацетама. Для оценки изменений внутриклеточного кальция использовали флуоресцентный зонд Fluo-4 AM. Прединкубация с леветирацетамом в концентрации 5–10 мкМ приводила к снижению интенсивности флуоресценции. При добавлении GL25 в концентрации 50 мкМ на фоне леветирацетама наблюдалось дальнейшее снижение содержания цитозольного Ca^{2+}. Полученные результаты указывают на возможное модулирующее влияние совместного действия GL25 и леветирацетама на кальциевый гомеостаз нейронов. При этом метод Fluo-4 AM отражает изменения общего цитозольного Ca^{2+} и не позволяет самостоятельно доказать прямое селективное связывание GL25 с N-типом кальциевых каналов.
Ключевые слова: полифенол GL25, N-тип кальциевых каналов, Ca^{2+}, леветирацетам, Fluo-4 AM, синаптосомы, кальциевый гомеостаз, нейроны.

Abstract. This study investigated the effect of GL25 polyphenol on Ca^{2+} homeostasis in rat brain synaptosomes under levetiracetam exposure. Changes in intracellular calcium were

evaluated using the fluorescent probe Fluo-4 AM. Pre-incubation with levetiracetam at concentrations of 5–10 μM resulted in a decrease in fluorescence intensity. Addition of GL25 at 50 μM in the presence of levetiracetam produced a further reduction in cytosolic Ca^{2+} levels. The findings indicate a possible modulatory effect of the combined action of GL25 and levetiracetam on neuronal calcium homeostasis. However, because the Fluo-4 AM method reflects overall cytosolic Ca^{2+} changes, the results alone do not demonstrate direct selective binding of GL25 to N-type calcium channels.

Keywords: GL25 polyphenol, N-type calcium channels, Ca^{2+}, levetiracetam, Fluo-4 AM, synaptosomes, calcium homeostasis, neurons.

Kirish. N-tipli kalsiy kanallari neyronlarda, ayniqsa presinaptik terminallarda joylashgan bo‘lib, harakat potensiali ta’sirida ochilishi natijasida Ca^{2+} ionlarining hujayraga kirishini ta’minlaydi. Presinaptik Ca^{2+} oqimi sinaptik vezikulalardan neyromediatorlarning ajralishida muhim ahamiyatga ega. Shu sababli N-tipli kalsiy kanallari orqali Ca^{2+} oqimining o‘zgarishi neyronlarning qo‘zg‘aluvchanligi va sinaptik uzatilish jarayonlariga ta’sir ko‘rsatishi mumkin.

Levetirasetam sinaptik vezikulyar oqsil 2A (SV2A) bilan bog‘lanib, sinaptik vezikula ekzotsitozini modulyatsiyalaydi. Adabiyotlarda levetirasetamning yuqori kuchlanish bilan faollashadigan kalsiy kanallari, jumladan N-tipli kanallar bilan bog‘liq Ca^{2+} oqimlariga ta’siri qayd etilgan. Shu nuqtai nazardan, levetirasetam fonida GL25 polifenolining Ca^{2+} gomeostaziga ta’sirini o‘rganish ushbu birikmaning neyronal kalsiy almashinuviga ta’sirini baholash imkonini beradi.

Mazkur ishning maqsadi GL25 polifenolining levetirasetam fonida kalamush bosh miyasi sinaptosomalaridagi Ca^{2+} miqdoriga ta’sirini o‘rganishdan iborat.

Materiallar va usullar. Tadqiqot obyekti sifatida kalamush bosh miyasi sinaptosomalari suspenziyasi hamda Euphorbia rigida o‘simligidan ajratilgan 1-O-galloyl-6-bisgalloyl-2,4-valoneoyl-β-D-glucose polifenol birikmasi (GL25) qo‘llanildi. Sinaptosomalar C.W. Cotman usuli va uning modifikatsiyalari asosida differensial sentrifugalash yo‘li bilan ajratildi. Bosh miya to‘qimasi muzli sharoitda 0,32 M saxaroza, 0,01 M Tris-HCl va 0,5 mM EDTA saqlagan pH 7,4 muhitda 1:10 nisbatda gomogenizatsiya qilindi.

Gomogenat 4500 ayl/min tezlikda 10 minut sentrifugalandi; supernatant 14000 ayl/min tezlikda 20 minut qayta sentrifugalandi. Keyingi bosqichlarda 11000 ayl/min da 20 minut va 14000 ayl/min da 30 minut sentrifugalash orqali sinaptosomal fraksiya olindi. Preparativ jarayonlar sovuq sharoitda bajarildi. Tajribalarda $CaCl_2$ saqlovchi va EGTA bilan Ca^{2+} dan xoli muhitlardan foydalanildi. Membranani depolyarizatsiya qilish uchun 35 mM KCl ishlatildi. Sitozolik Ca^{2+} dinamikasi Fluo-4 AM zondi yordamida baholandi. 1 mg Fluo-4 AM 135 μl DMSO da eritilib, 1 mM boshlang‘ich eritma tayyorlandi. 2 ml Krebs–Ringer buferiga 80 μl sinaptosoma suspenziyasi va 12 μl Fluo-4 AM qo‘shilib, 37°C da 30 minut inkubatsiya qilindi. Inkubatsiyadan so‘ng ortiqcha bo‘yoq yuvish va sentrifugalash bilan chiqarildi. O‘lchashda taxminan 5×10^6 zarracha/ml konsentratsiyadan foydalanildi. Fluorescensiya 488 nm da qo‘zg‘atilib, 506 nm da qayd etildi. Signal USB2000 spektrofluorimetrida (Ocean Optics, AQSh) o‘lchandi. GL25 polifenoli 10, 25, 50 va 100 μM konsentratsiyalarda sinovdan o‘tkazildi. N-tipli kalsiy kanallarining funksional ishtirokini baholash maqsadida levetirasetam 10 μM konsentratsiyada qo‘llanildi. Dastlab levetirasetamning

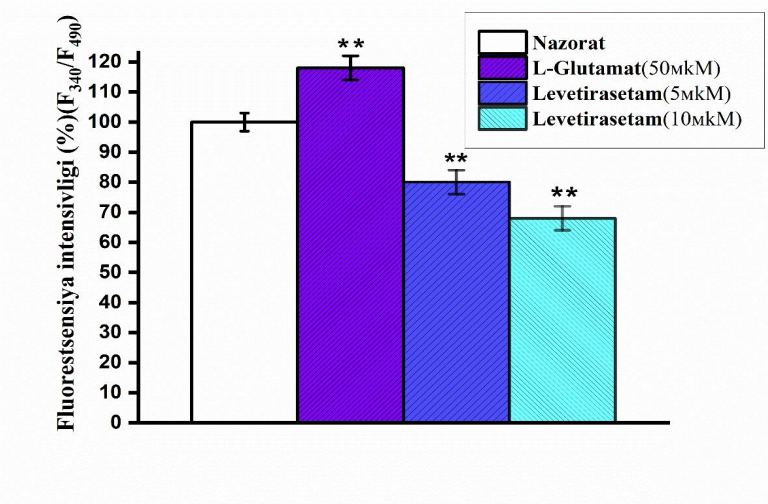
sinaptosomalardagi Ca^{2+} signaliga mustaqil ta'siri aniqlanib, keyinchalik GL25 polifenoli bilan birgalikdagi ta'siri o'rganildi.

Har bir tajriba kamida olti marotaba takrorlandi (n=6). Olingan natijalar o'rtacha qiymat ± standart xatolik (M±m) ko'rinishida ifodalandi. Statistik tahlil OriginPro va Microsoft Excel dasturlari yordamida amalga oshirildi. Guruhlar orasidagi farqlarning ishonchliligi Student t-testi yordamida baholandi va $P<0,05$ qiymat statistik jihatdan ishonchli deb qabul qilindi.

Tadqiqot natijalari va muhokamasi. Tadqiqotning mazkur bosqichida L-glutamat, levetirasetam va GL25 polifenolining kalamush bosh miyasi sinaptosomalari suspenziyasidagi hujayra ichki Ca^{2+} signaliga ta'siri o'rganildi. Anderson va uning hammualliflari uslubiyatiga asosan sitozolik Ca^{2+} konsentratsiyasining o'zgarishini baholash uchun Fluo-4 AM fluoressensiya zondidan foydalanildi. Natijalar nazorat guruhi bilan taqqoslandi va fluoressensiya intensivligi nisbiy birliklarda ifodalandi.

Levetirasetamning sinaptosomal Ca^{2+} signaliga ta'siri. Dastlab L-glutamat va levetirasetamning turli konsentratsiyalarida sinaptosomal Ca^{2+} signalining o'zgarishi baholandi (1-rasm). Nazorat guruhida Fluo-4 AM fluoressensiya intensivligi 100% deb qabul qilindi. L-glutamatning 50 µM konsentratsiyasida qo'llanilishi fluoressensiya intensivligining taxminan 118% gacha oshishiga olib keldi. Demak, L-glutamat ta'sirida nazorat guruhiga nisbatan fluoressensiya intensivligi qariyb 18% ga oshgan. Mazkur o'zgarish $P<0,01$ darajasida statistik jihatdan ishonchli bo'ldi.

L-glutamat ta'sirida kuzatilgan fluoressensiya intensivligining ortishi sinaptosomalarda hujayra ichki Ca^{2+} signalining kuchayganligini ko'rsatadi. L-glutamatning qo'zg'atuvchi neyrotransmitter sifatidagi xususiyatlarini hisobga olgan holda, mazkur natija glutamatergik stimulyatsiya sharoitida Ca^{2+} gomeostazining sezilarli darajada o'zgarishini tasdiqlaydi. Bu holat neyronal qo'zg'alishning kuchayishi bilan bog'liq Ca^{2+} signalizatsiyasini eksperimental modelda namoyon etadi.

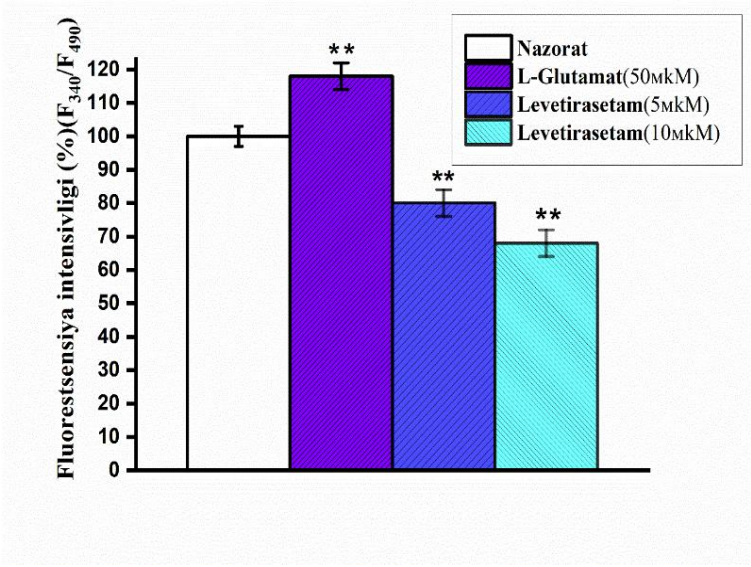


1-rasm. Levetirasetam (5-10 mkM) inkubatsiya sharoitida kalamush bosh miyasi sinaptosomalari suspenziyasida fluoressensiya intensivligiga ta'siri. Ishonchlilik darajasi: *- $P<0,05$; **- $P<0,01$ (n=6).

Levetirasetam qo'llanilganda esa L-glutamat ta'siridan farqli ravishda fluoressensiya intensivligining yaqqol pasayishi kuzatildi. Levetirasetamning 5 µM konsentratsiyasida

fluoressensiya intensivligi taxminan 80% ni tashkil etib, nazorat guruhiga nisbatan qariyb 20% ga kamaydi. Preparatning 10 µM konsentratsiyasida esa mazkur ko‘rsatkich taxminan 68% gacha pasaydi, ya’ni nazoratga nisbatan qariyb 32% kamayish kuzatildi. Har ikkala konsentratsiyada qayd etilgan o‘zgarishlar P<0,01 darajasida statistik jihatdan ishonchli bo‘ldi. Shunday qilib, levetirasetamning 5 µM dan 10 µM gacha konsentratsiyasining oshirilishi fluoressensiya intensivligining qo‘shimcha pasayishi bilan kechdi. Ushbu natija levetirasetamning sinaptosomal Ca^{2+} signaliga ta’siri konsentratsiyaga bog‘liq ravishda kuchayishi mumkinligini ko‘rsatadi. Ayniqsa, 10 µM levetirasetam ta’sirida qayd etilgan taxminan 68% lik signal nazorat qiymatidan sezilarli darajada past bo‘lib, preparatning hujayra ichki Ca^{2+} gomeostaziga kuchliroq ta’sirini ko‘rsatadi. Levetirasetam ta’sirida Ca^{2+} signalining kamayishi uning sinaptik uzatishni modulyatsiya qiluvchi farmakologik xususiyatlari bilan bog‘liq bo‘lishi mumkin. Preparatning asosiy molekulyar nishoni bo‘lgan SV2A sinaptik vezikula funksiyasi va neyrotransmitterlarning ajralish jarayonida muhim rol o‘ynaydi. Presinaptik Ca^{2+} signali sinaptik vezikulalarning ekzotsitozi uchun zarur bo‘lganligi sababli, uning kamayishi neyrotransmitter ajralishining pasayishiga olib kelishi mumkin.

GL25 polifenolining levetirasetam fonidagi ta’siri. Keyingi tajribalarda GL25 polifenolining 50 µM konsentratsiyasida levetirasetam bilan birgalikdagi ta’siri o‘rganildi (2-rasm). Ushbu tajribada nazorat guruhi bilan bir qatorda GL25 (50 µM), levetirasetam (5 µM), levetirasetam (10 µM), GL25 (50 µM) + levetirasetam (5 µM) va GL25 (50 µM) + levetirasetam (10 µM) guruhlari taqqoslandi.



2-rasm. GL25 polifenolining (50 mkM) levetirasetam (5-10 mkM) bilan inkubatsiya sharoitida kalamush bosh miyasi sinaptosomalari suspenziyasida fluoressensiya intensivligiga ta’siri. Ishonchlilik darajasi: *- P <0,05; **- P <0,01 (n=6).

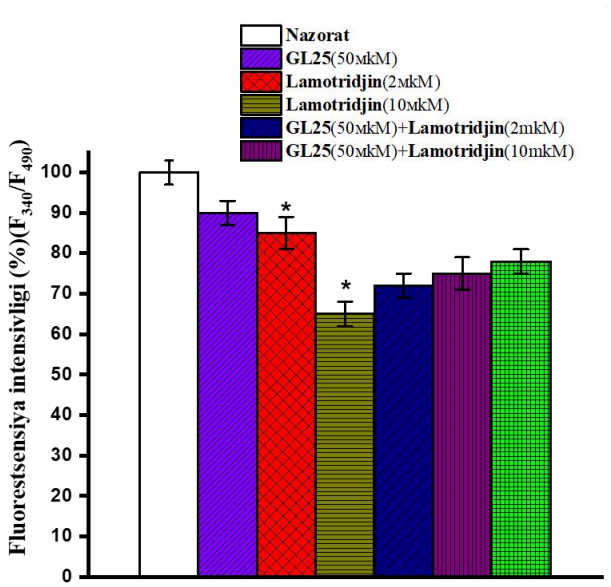
Grafik ma’lumotlariga ko‘ra, GL25 polifenolining o‘zi qo‘llanilganda ham Fluo-4 AM fluoressensiya intensivligining nazorat guruhiga nisbatan pasayishi kuzatildi. Bu holat GL25 ning sinaptosomal Ca^{2+} gomeostaziga mustaqil ravishda modulyator ta’sir ko‘rsatishi mumkinligini ko‘rsatadi. Levetirasetam bilan kombinatsiyada esa mazkur ta’sir yanada yaqqol namoyon bo‘ldi. GL25 (50 µM) + levetirasetam (5 µM) kombinatsiyasida fluoressensiya intensivligi levetirasetamning 5 µM dagi yakka ta’siriga nisbatan pastroq

bo‘ldi. GL25 (50 μM) + levetirasetam (10 μM) kombinatsiyasida esa grafikdagi eng past fluoressensiya intensivligi qayd etildi.

Mazkur natijalar GL25 polifenoli mavjud sharoitda levetirasetamning Ca^{2+} signalini kamaytiruvchi ta’siri kuchayishi mumkinligini ko‘rsatadi. Ayniqsa, levetirasetam konsentratsiyasining 5 μM dan 10 μM gacha oshirilishi GL25 fonida fluoressensiya intensivligining yanada pasayishi bilan kechgan. Bu holat kombinatsiyaning Ca^{2+} gomeostaziga ta’siri nafaqat komponentlarning alohida ta’siri bilan, balki ularning o‘zaro ta’siri bilan ham bog‘liq bo‘lishi mumkinligini kovelashtiradi. Foydalanilgan GL25 polifenolini potensialga bog‘liq natriy kanallari orqali ingibirlanishi natijasida presinaptik terminallardagi kalsiy ionlari almashinuviga ta’sirini aniqlash maqsadida lamotrijin preparatidan foydalandik. Presinaptik neyronlarning membranalarini barqarorlashtirishi orqali lamotrijin qo‘zg‘atuvchan glutamat mediatorini chiqarilishini to‘xtatadi. Glutamat chiqarilishining ushbu kamayishi turli nevrologik kasalliklar bilan bog‘liq bo‘lgan ortiqcha qo‘zg‘aluvchanlik signalizatsiyaning oldini olishga yordam beradi (Abelaira et al., 2012). Glutamat chiqarilishini modulyatsiya qilish orqali lamotrijin eksaytotoksiklikni oldini oladi va neyron tarmoqlarni barqarorlashtiradi.

Lamotrijin selektiv holatda potensialga bog‘liq natriy kanallarini ingibirlaydi. Natijada harakat potensiallarining ingibirlanishi presinaptik terminalda potensialga bog‘liq kalsiy kanallarining faollashuvini kamaytiradi. Kalsiy oqimining kamayishi glutamatning sinaptik vezikulalar yordamida sinaptik yoriqqa chiqarilishining susayishiga olib keladi (Polepally et al., 2018; Milosheska et al., 2016). Lamotrijin presinaptik mexanizmlarga ta’sir qibly, glutamat va aspartat kabi qo‘zg‘atuvchi aminokislotalarning chiqarilishini modulyatsiya qiladi.

Tajribalarimizda sinaptosoma suspenziyasida glutamat chiqarilishining ingibirlanishiga ta’sirini o‘rganish uchun Fluo-4 AM fluoressensiya zondidan foydalanib, lamotrijin fonida eksperimentlar olib borildi. Lamotrijin (2 mkM) konsentratsiyada (Fluo-4 AM)-sinaptosoma suspenziya kompleksi bilan oldindan inkubatsiya qilinishi fluoressensiyaning susayishiga olib keldi. L-glutamat (50 mkM) lamotrijin (2 mkM va 10 mkM) inkubatsiyasi sharoitida sitozoldagi kalsiy miqdori sezilarli darajada (15-25%) susayishi aniqlandi (3-rasm).



3-rasm. GL25 polifenolining (50 mkM) L-glutamat (50 mkM) bilan lamotrijin (2 mkM va 10 mkM) inkubatsiya sharoitida kalamush bosh miyasi sinaptosomalari suspenziyasida fluoressensiya intensivligiga ta'siri. Ishonchlilik darajasi: *- P<0,05; **- P<0,01 (n=6).

Tajribalarda foydalanilgan GL25 polifenolining lamotrijin fonida ta'siri o'rganildi. Tajribalarda aniqlanganidek, lamotrijin (2-10 mkM) ta'sirida fluoressensiya intensivligini 15-25% ga kamaytiradi, bu sitozolik kalsiy miqdorining susayishini ko'rsatadi, bu uning presinaptik potensialga bog'liq natriy kanallarini ingibirlashining ma'lum mexanizmiga mos keladi. Lamotrijin (2-10 mkM) + GL25 polifenoli (50 mkM) qo'shilganida fluoressensiya intensivligining susayishi 10-20% ni tashkil qiladi, bu esa birikmalar o'rtasidagi murakkab o'zaro ta'sirlarni ko'rsatadi.

Xulosa. Kalamush bosh miyasi sinaptosomalarida GL25 polifenoli va antiepileptik vositalar — levetirasetam hamda lamotrijinning kombinatsiyalangan ta'sirining Ca^{2+} gomeostaziga ta'siri Fluo-4 AM fluoresan indikatori yordamida baholandi. Tadqiqot natijalari L-glutamatning 50 µM konsentratsiyasi ta'sirida sitozolik Ca^{2+} signalining kuchayishini, levetirasetamning 5 va 10 µM konsentratsiyalarida esa fluoresans intensivligining mos ravishda 80% va 68% gacha pasayishini ko'rsatdi (P<0,01). GL25 polifenolining 50 µM konsentratsiyada levetirasetam bilan birgalikda qo'llanilishi sinaptosomal Ca^{2+} signalining yanada kamayishiga olib keldi. Bu natija GL25 polifenolining levetirasetam ta'sirini kuchaytirishi mumkinligini ko'rsatadi. Lamotrijin va GL25 kombinatsiyasi qo'llanilganda ham fluoresans intensivligining qo'shimcha 10–20% ga kamayishi kuzatildi. Mazkur natijalar GL25 polifenolining glutamat ta'sirida yuzaga keladigan kalsiy signallarini modulyatsiya qilish imkoniyatini ko'rsatadi, biroq aniqlangan o'zgarishlarning aniq molekulyar mexanizmlarini belgilash uchun qo'shimcha tadqiqotlar talab etiladi.

Taxminlarga ko'ra, GL25 polifenolining ta'siri presinaptik kuchlanishga bog'liq kalsiy kanallari (VGCC) faoliyatining modulyatsiyasi, jumladan, kanal oqsillari bilan bevosita yoki allosterik o'zaro ta'sirlar bilan bog'liq bo'lishi mumkin. Shuningdek, uning pre- va postsinaptik membranalardagi kalsiy transport mexanizmlari hamda natriy-kalsiy

almashinuviga ta’sir ko‘rsatish ehtimoli mavjud. Biroq, mazkur mexanizmlar hozircha taxminiy bo‘lib, ularni bevosita tasdiqlovchi molekulyar va elektrofiziologik dalillar zarur.

Umuman olganda, olingan natijalar GL25 polifenolining neyronal Ca^{2+} gomeostazini modulyatsiya qilish salohiyati mavjudligini va uning levetirasetam hamda lamotrijin bilan kombinatsiyada qo‘llanilishi sinaptosomal kalsiy signallarining kamayishiga olib kelishi mumkinligini ko‘rsatadi. Shu bilan birga, GL25 ning neyroprotektiv samaradorligi va antiepileptik vositalar bilan o‘zaro ta’sirining farmakologik mexanizmlarini to‘liq asoslash uchun qo‘shimcha tadqiqotlar talab qilinadi. Xususan, ushbu ta’sirning N-tipli (CaV2.2) kalsiy kanallariga selektiv bog‘liqligini aniqlash maqsadida elektrofiziologik usullar va selektiv farmakologik blokatorlardan foydalanish muhim ahamiyatga ega.

Foydalanilgan adabiyotlar

1. Buraei Z, Yang J. Structure and function of the CaV2.2 calcium channel. Biochim Biophys Acta Biomembr. 2013;1828(7):1530–1540.
2. Catterall WA. Voltage-gated calcium channels. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011;3(8):a003947.
3. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. Pharmacol Rev. 2005;57(4):411–425.
4. Dolphin AC, Lee A. Presynaptic calcium channels: specialized control of synaptic neurotransmitter release. Nat Rev Neurosci. 2020;21:17–29.
5. Simms BA, Zamponi GW. Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. Neuron. 2014;82(1):24–45.
6. Jurkovicova-Tarabova B, Lacinova L. Structure, function and regulation of CaV2.2 N-type calcium channels. Gen Physiol Biophys. 2019;38(2):101–110.
7. Adams DJ, Berecki G. Mechanisms of conotoxin inhibition of N-type (CaV2.2) calcium channels. Biochim Biophys Acta Biomembr. 2013;1828(7):1619–1628.
8. Wheeler DB, Randall A, Tsien RW. Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. Science. 1994;264(5155):107–111.
9. Mintz IM, Sabatini BL, Regehr WG. Calcium control of transmitter release at a central synapse. Neuron. 1995;15(3):675–688.
10. Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ. Exocytotic Ca^{2+} channels in mammalian central neurons. Trends Neurosci. 1995;18-24.
11. McCleskey EW, Fox AP, Feldman D, Cruz LJ, Olivera BM, Tsien RW, Yoshida S. ω-Conotoxin: direct and persistent blockage of N-type calcium channels underlying transmitter release in the mammalian brain. Proc Natl Acad Sci USA. 1987;84(12):4327–4331.
12. Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the ω-conotoxins and ω-agatoxins. Annu Rev Biochem. 1994;63:823–867.
13. Niespodziany I, Klitgaard H, Margineanu DG. Levetiracetam inhibits the high-voltage-activated Ca^{2+} current in pyramidal neurones of rat hippocampal slices. Neurosci Lett. 2001;306(1–2):5–8.