

Экспериментальные исследования  
ДАЙНЕКО А. С., СИМАНЕНКОВА А. В.,  
ПРОСВИРНИНА М. С., ЗУХУРОВА М. А.,  
ВЛАСОВ Т. Д.

## Исследование нейропротективных эффектов теанина в различных дозах и на различных сроках введения при фокальной ишемии головного мозга у крыс

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова  
e-mail: tvlasov@yandex.ru

### Реферат

Рассматривается нейропротективный эффект гамма-глутамилэтиламида (L-теанина) при ишемическом повреждении головного мозга крыс, вызванном окклюзией левой средней мозговой артерии (ЛСМА). Теанин вводился внутривентрикулярно в дозах 1 мг/кг и 4 мг/кг за 30 минут до и через 3, 12 и 24 часа после окклюзии ЛСМА. Теанин, введенный за 30 минут до ишемии и через 3 и 12 часов после начала реперфузии, достоверно уменьшал размеры зоны некроза на 2-е сутки после ишемии. Кроме того, при оценке состояния животных на 2-й день после воспроизведения окклюзии ЛСМА отмечалось достоверное уменьшение неврологического дефицита у крыс тех же экспериментальных групп. Теанин, введенный через 24 часа после начала реперфузии, достоверно не изменял размер зоны некроза и степень выраженности неврологического дефицита. Таким образом, доказано, что применение теанина до ишемии и через 3 и 12 часов после нее обеспечивает защиту головного мозга, что потенциально может быть использовано для профилактики и терапии сосудистых заболеваний головного мозга.

*Ключевые слова:* ишемический инсульт, реперфузия, L-теанин, мозг.

Dayneko A. S., Simanenkova A. V., Prosvirnina M. S.,  
Zuhurova M. A., Vlasov T. D.

## The neuroprotective effects of theanine in different doses and protocols of administration in the rat model of focal cerebral ischemia

Saint-Petersburg Pavlov State Medical University  
e-mail: tvlasov@yandex.ru

### Abstract

This study was aimed to evaluate neuroprotective effect of gamma-glutamylethylamide (L-theanine) in brain ischemic damage in rats, caused by left middle cerebral artery occlusion. Theanine was administered intraperitoneally 1mg/kg and 4 mg/kg 30 minutes before ischemia and 3, 12, 24 hours after left middle cerebral artery occlusion. The necrosis size in rats that received theanine 30 minutes before ischemia and 3 and 12 hours after the beginning of reperfusion was significantly decreased 2 days after ischemia. Furthermore, the assessment of animal status on the second day after left middle cerebral artery occlusion revealed significant neurological deficiency reduction in the same experimental groups. Theanine, administered 24 hours after the beginning of reperfusion, failed to change necrosis size and neurological deficiency extent significantly. Thereby, it has been proved, that theanine, injected before brain ischemia and 3 and 12 hours after it, provides brain protection, that potentially might be used in prophylactic and therapy of brain vascular diseases.

*Keywords:* ischemic stroke, reperfusion, L-theanine, brain.

### Введение

Во всем мире инсульт признан второй ведущей причиной смерти больных [18]. Установлено, что порядка 1/6 всех людей переносят, по крайней мере, один инсульт в своей жизни [23]. В настоящее время именно инсульт является главной причиной инвалидизации пациентов [25]. Частота инсульта растет из года в год. В России, Индии и Китае смертность от данного заболевания особенно высока [15].

Среди различных видов острых нарушений мозгового кровообращения ведущее место занимает

ишемический инсульт. Частота его составляет 80%, остальные 20 % приходятся на геморрагический инсульт, субарахноидальное кровоизлияние и кровоизлияние в вещество мозга [4].

Такая высокая частота инсульта в целом и ишемического инсульта в частности, а также тяжесть течения данного заболевания и высочайшая степень летальности обуславливают необходимость поиска способов защиты головного мозга от ишемического и реперфузионного повреждения, уменьшения раз-

меров инфаркта мозга и степени выраженности неврологических нарушений.

В настоящее время на фармакологическом рынке существует широкий спектр различных нейропротекторов, с различным механизмом и мишенью действия. Но четких доказательств их защитных эффектов пока не получено [21]. Это может быть связано со сложностью экстраполяции экспериментальных данных в клинику или с отсутствием полноценного понимания механизмов их действия и, следовательно, с отсутствием оптимального протокола их применения. Недавно был проведен ряд исследований, изучавших нейропротективные эффекты L-теанина (гамма-глутамилэтиламида), компонента зеленого чая (*Camellia sinensis*) [5, 7]. Доказан защитный эффект L-теанина при гипоксии культуры клеток стриатума [25], а также при интравентрикулярном введении крысам (перед ишемией и через 30 минут после ишемии) [1]. Существуют также исследования, в которых показан нейропротективный эффект L-теанина при введении его мышам интраперитонеально через 3 часа после начала ишемии [6]. Есть данные, что L-теанин оказывает значимое непрямо защитное действие на головной мозг за счет повышения интрацеребральной концентрации  $\gamma$ -аминобутирата с последующей стимуляцией специфических рецепторов типа а [6, 10]. Однако отсутствуют исследования, направленные на изучение нейропротективных свойств L-теанина в отдаленном постшемическом периоде (12–24 ч), хотя, в случае эффективности, такие сроки введения могли бы с успехом применяться в клинической неврологии. Также недостаточно изучено, зависит ли выраженность нейропротективного эффекта от дозы теанина.

#### Цель исследования

Оценка защитных эффектов теанина при введении за 30 минут до ишемии, а также через 3, 12 и 24 часа после ишемии.

#### Материал и методы исследования

Исследование проводилось на самцах крыс линии Wistar массой 200–250 г, под хлоралгидратным наркозом (430 мг/кг внутривенно) и включало 6 групп животных. Во всех группах использовался один протокол операции: ишемия головного мозга воспроизводилась с помощью модели транзиторной окклюзии средней мозговой артерии (СМА) по методике Koizumi J., 1986 [11] в модификации Longa E. Z., 1989 [14], и Belayev L., 1999 [3]. Полипропиленовая нить (4–00, Ethicon) длиной 22 мм, обработанная силиконом и поли-L-лизинном, вводилась ретроградно в левую наружную сонную артерию, после чего проводилась через бифуркацию общей сонной артерии и внутреннюю сонную артерию к устью СМА, перекрывая его. Через 30 минут (продолжительность ишемии) нить извлекалась, и через 48 часов реперфузии оценивалась степень повреждения головного мозга. L-теанин вводили интраперитонеально в дозах 1 и 4 мг/кг.

Исследовались следующие группы животных:

1 группа — контрольная, моделировалась транзиторная фокальная ишемия (n=6);

2 группа — введение теанина за 30 минут до ишемии в дозе 1 мг/кг (n=8);

3 группа — введение теанина через 3 часа после ишемии в дозе 1 мг/кг (n=10);

4 группа — введение теанина через 3 часа после ишемии в дозе 4 мг/кг (n=7);

5 группа — введение теанина через 12 часов после ишемии (n=11);

6 группа — введение теанина через 24 часа после ишемии (n=5).

Через 48 часов оценивали неврологическое состояние — шкала Garcia (8) (нормальное значение — 18 баллов) и размер некроза по срезам мозга, используя окраску 0,1 %-го раствора трифенилтетразолия хлорида (Merck KGaA).

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программного пакета StatSoft Statistica v6.0 Multilingual. Значимость различий измеряемых параметров оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни для независимых выборок. Все показатели были представлены в виде «среднее±стандартное отклонение». Значения P менее чем 0,05 рассматривались как значимые.

#### Результаты исследования и их обсуждение

Введение теанина за 30 минут до ишемии в дозе 1 мг/кг, через 3 часа после ишемии в дозах 1 и 4 мг/кг, через 12 часов после ишемии в дозе 4 мг/кг уменьшало размер некроза более чем на 60 % по сравнению с контролем (p=0,0002; p=0,0004; p=0,0002 и p=0,0009 соответственно), в то время как введение теанина через 24 часа после ишемии в дозе 4 мг/кг не оказывало нейропротективного воздействия (p=0,8551) (табл. 1).

Степень неврологических нарушений при применении теанина за 30 минут до ишемии в дозе 1 мг/кг, через 3 часа после ишемии в дозах 1 и 4 мг/кг, через 12 часов после ишемии в дозе 4 мг/кг по шкале Garcia была достоверно ниже (p=0,0243; p=0,0001; p=0,0004 и p=0,0366 соответственно) по сравнению с контролем. Введение теанина через 24 часа после ишемии не уменьшало неврологического дефицита по шкале Garcia по сравнению с контролем (p=0,3075) (рис. 1).

На ранних стадиях ишемии происходит выраженный подъем концентрации глутамата, в результате чего происходит мобилизация ионов кальция из внутриклеточных депо, опосредованная как NMDA-рецепторами (рецептором N-метил-D-аспартата), так и не NMDA-рецепторами [17]. Чрезмерное накопление ионов кальция активирует различные внутриклеточные ферменты [22] и повышает концентрацию супероксидных радикалов [12], таким образом приводя к гибели нейронов [9]. L-теанин является натуральным аналогом глутамата и действует как конкурентный антагонист рецепторов альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-изоксазол-4-пропионата (AMPA) и NMDA [16]. L-теанин индуцирует высвобождение ингибиторных нейротрансмиттеров [26] и оказывает прямой защитный эффект на нервную ткань,

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Показатели повреждения головного мозга крыс (размер некроза и коэффициент асимметрии) при экспериментальной ишемии/постишемической реперфузии на фоне введения теанина

Таблица 1

Группа	Коэффициент асимметрии $S_{\text{повр}}/S_{\text{общ}}$	Размер некроза		Статистическая достоверность (p)	
		$S_{\text{повр}}/S_{\text{общ}}$	$S_{\text{повр}}/S_{\text{ип}}$	$S_{\text{ип}}$ vs. $S_{\text{общ}}$	$S_{\text{повр}}$ vs. $S_{\text{общ}}$
Контроль (n=10)	54,90±2,40	13,52±2,36	24,63±4,04	—	—
Теанин 1мг/кг за 30 мин до ишемии (n=8)	51,77±1,46*	4,69±1,99*	9,11±3,99	0,017483	0,000982
Теанин 1мг/кг через 3 часа после ишемии (n=9)	52,30±2,44	4,71±2,20*	9,07±4,44	0,097319	0,00583
Теанин 4 мг/кг через 3 часа после ишемии (n=7)	52,23±1,01*	3,19±2,09*	6,12±3,95	0,006993	0,000623
Теанин 4 мг/кг через 12 часов после ишемии (n=11)	51,94±1,26*	6,77±2,47*	13,23±4,88*	0,005	0,0009
Теанин 4 мг/кг через 24 часа после ишемии (n=5)	53,67±11,8	20,90±2,49	39,01±4,40	0,361	0,273

\* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем;  $S_{\text{ип}}$  — площадь пораженного полушария;  $S_{\text{общ}}$  — общая площадь среза;  $S_{\text{повр}}$  — площадь поврежденного участка мозга.

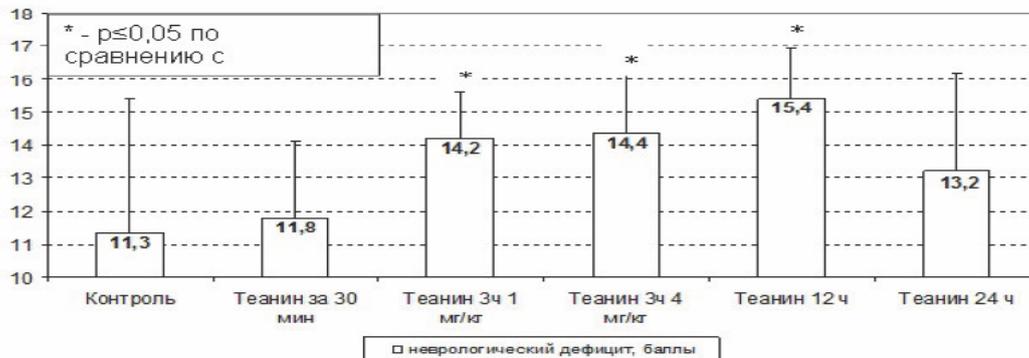


Рис. 1. Неврологический дефицит по шкале Garcia при экспериментальной ишемии/постишемической реперфузии на фоне введения теанина

уменьшая постишемическую гибель нейронов как ингибитор AMPA- и NMDA-рецепторов [5]. В наших предыдущих работах было показано, что интравентрикулярное введение L-теанина после введения агонистов глутаматных рецепторов (NMDA и каиновой кислоты) при ишемии мозга достоверно уменьшало повреждающее действие агонистов глутамата. Следовательно, L-теанин оказывает нейропротективное действие при ишемии головного мозга за счет угнетения ишемической эксайтотоксичности посредством снижения NMDA-зависимого и каинатзависимого повреждения [1].

Также предполагается, что нейропротективный эффект L-теанина может быть частично обусловлен активацией метаболитных глутаматных рецепто-

ров (mGluR), представляющих собой сцепленные с G-белком рецепторы, которые связывают глутамат и обеспечивают нервную возбудимость и синаптическую передачу в ЦНС [19, 20]. Активация mGluR проявляется повышенной экспрессией двух изоформ фосфорилаз (PC-beta1 и PC-gamma1). Эти фосфорилазы защищают нейроны от оксидативного стресса [2, 13, 24]. Однако существуют противоречивые данные о нейротоксических и нейропротективных эффектах как агонистов, так и антагонистов I группы mGluR, что обуславливает необходимость дальнейшего изучения механизмов защитного эффекта теанина [20]. Нейропротективный эффект L-теанина связан не только с уменьшением ишемического-реперфузионного повреждения, но также с инги-

бированием апоптоза в нервной ткани, который является основным путем постишемической гибели клеток [7]. Данная гипотеза подтверждается тем, что L-теанин уменьшает ишемическое-реперфузионное повреждение при введении препарата в позднем реперфузионном периоде (через 3 и 12 часов после начала реперфузии), влияя таким образом на отдаленные последствия ишемического и реперфузионного повреждения, но не на ранние.

Таким образом, снижение эксайтотоксичности во время ишемического-реперфузионного повреждения и антиапоптотический эффект, предотвращающий нейрональную гибель в позднем реперфузионном пе-

риоде, вероятно, являются основными механизмами нейропротективного действия L-теанина.

#### Выводы

1. Теанин оказывает нейропротективный эффект при введении за 30 минут до ишемии, а также через 3 и 12 часов после начала реперфузии, причем максимальный защитный эффект отмечается при введении теанина за 30 минут до ишемии в дозе 1 мг/кг и через 3 часа после начала реперфузии в дозе 4 мг/кг ( $p=0,0002$  и  $p=0,0002$  соответственно).

2. Теанин оказывает выраженный дозозависимый защитный эффект при транзиторной фокальной ишемии головного мозга.

#### Литература

1. Зухурова, М. А. Механизмы нейропротективного эффекта компонента зеленого чая — L-теанина / М. А. Зухурова [и др.] // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2010. — Т. 9. — № 4 (36). — С. 67–71.
2. Bai, X.-C. Phospholipase C-c1 is required for cell survival in oxidative stress by protein kinase C / X.-C. Bai [et al] // *Biochem. J.* — 2002. — № 363. — P. 395–401.
3. Belayev, L. Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: neurological and histological validation / L. Belayev [et al] // *Brain Res.* — 1999. — Vol. 833. — № 2. — P. 181–190.
4. Durukan, A. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia / A. Durukan, T. Tatlisumak // *Pharm. Biochem. and Behav.* — 2007. — Vol. 87. — P. 179–197.
5. Egashira, N. Neuroprotective effect of gamma-glutamylethylamide (theanine) on cerebral infarction in mice / N. Egashira [et al] // *Neurosci Lett.* — 2004. — № 363 (1). — P. 58–61.
6. Egashira, N. Involvement of GABA(A) receptors in the neuroprotective effect of theanine on focal cerebral ischemia in mice / N. Egashira [et al] // *J. Pharmacol. Sci.* — 2007. — № 105 (2). — P. 211–214.
7. Ekshyyan, O. Apoptosis in acute and chronic neurological disorders / O. Ekshyyan, T. Y. Aw // *Front. Biosci.* — 2004. — Vol. 9. — P. 1567–1576.
8. Garcia, J. H. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation / J. H. Garcia [et al] // *Stroke.* — 1995. — Vol. 26. — № 4. — P. 627–634.
9. Kakuda, T. Protective effect of gamma-glutamylethylamide (theanine) on ischemic delayed neuronal death in gerbils / T. Kakuda [et al] // *Neurosci. Lett.* — 2000. — № 289 (3). — P. 189–192.
10. Kimura, R. Influence of alkylamides of glutamic acid and related compounds on the central nervous system I. Central depressant effect of theanine / R. Kimura, T. Murata // *Chem. Pharm. Bull.* — 1971. — № 19. — P. 1257–1261.
11. Koizumi, J. Experimental studies of ischemic brain edema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area / J. Koizumi [et al] // *Jpn. J. Stroke.* — 1986. — Vol. 8. — P. 1–8.
12. Lafon-Cazal, M. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity / M. Lafon-Cazal [et al] // *Nature.* — 1993. — № 364 (6437). — P. 535–537.
13. Lee, Y. H. Overexpression of phospholipase Cbeta-1 protects NIH3T3 cells from oxidative stress-induced cell death / Y. H. Lee [et al] // *Life Sci.* — 2000. — № 67 (7). — P. 827–837.
14. Longa, E. Z. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats / E. Z. Longa [et al] // *Stroke.* — 1989. — Vol. 20. — P. 84–91.
15. Mackay, J. Atlas of Heart Disease and Stroke / J. Mackay, G. Mensah // *Nonserial Publication World Health Organization.* — 2004. — P. 16.
16. Maruyama, M. Electrophysiologically potent noncompetitive glutamate antagonists at crayfish neuromuscular junctions are also potent inhibitors of [3H] MK801 binding to synaptic membranes from rat central nervous system / M. Maruyama, K. Takeda // *Comp. Biochem. Physiol.* — 1994. — № 107C. — P. 105–110.
17. Monaghan, D. T. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system / D. T. Monaghan, R. J. Bridges, C. W. Cotman // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 1989. — № 29. — P. 365–402.
18. Murray, C. J. Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study / C. J. Murray, A. D. Lopez // *Lancet.* — 1997. — № 349. — P. 1269–1276.
19. Nagasawa, K. Possible involvement of group I mGluRs in neuroprotective effect of theanine / K. Nagasawa [et al] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2004. — № 320 (1). — P. 116–122.
20. Nicoletti, F. Group-I metabotropic glutamate receptors: hypotheses to explain their dual role in neurotoxicity and neuroprotection / F. Nicoletti [et al] // *Neuropharmacology.* — 1999. — № 38. — P. 1477–1484.
21. Peter, A. Guidelines for Management of Ischaemic Stroke and Transient Ischaemic Attack 2008 / A. Peter [et al] // *The European Stroke Organization (ESO) Executive Committee and the ESO Writing Committee* // URL: <http://www.eso-stroke.org/recommendations>.
22. Schanne, F. A. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway / F. A. Schanne [et al] // *Science.* — 1979. — № 206 (4419). — P. 700–702.
23. Seshadri, S. The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham study / S. Schanne [et al] // *Stroke.* — 2006. — № 37. — P. 345–350.
24. Wang, X.-T. Oxidative stress-induced phospholipase C-c1 activation enhances cell survival / X.-T. Wang [et al] // *J. Biol. Chem.* — 2001. — № 276. — P. 28364–28371.
25. Warlow, C. P. Epidemiology of stroke / C. P. Warlow // *Lancet.* — 1998. — № 352 (Suppl. 3). — P. SIII 1–4.
26. Yamada, T. Theanine, gamma-glutamylethylamide, a unique amino acid in tea leaves, modulates neurotransmitter concentrations in the brain striatum interstitium in conscious rats / T. Yamada [et al] // *Amino Acids.* — 2009. — № 36 (1). — P. 21–27.