

Механизмы нейропротективного эффекта компонента зеленого чая – L-теанина

¹Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

²Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург
e-mail: tvlasov@yandex.ru

Реферат

В последнее время появились исследования посвященные изучению действия L-теанина (γ-глутамилэтиламида) при ишемии головного мозга, так как доказано, что эта аминокислота легко проникает через гематоэнцефалический барьер и вызывает нейропротекторный эффект. Однако механизмы его действия изучены недостаточно. В настоящем исследовании рассматриваются эффекты L-теанина при ишемическом повреждении головного мозга крысы, вызванного окклюзией среднемозговой артерии (СМА). L-теанин вводился в боковой желудочек головного мозга микроинъектором в дозе 800 мкг/кг в объеме 20 мкл. Внутривентрикулярно вводились агонисты глутаматных рецепторов (NMDA в дозе 35 мг/кг через 3 и 24 часа после начала реперфузии; каиновая кислота в дозе 1,2 мг/кг через 3 часа после начала реперфузии). Введение агонистов глутаматных рецепторов вызывало увеличение выраженности повреждения головного мозга крысы. Введение L-теанина достоверно оказывало нейропротективное действие во всех группах животных. L-теанин оказывает нейропротективное действие при ишемии головного мозга, которое связано с угнетением ишемической эксайтотоксичности посредством уменьшения NMDA-зависимого и каинатзависимого повреждения.

Ключевые слова: L-теанин, ишемия головного мозга, крысы, нейропротекция.

Zuhurova M. A.¹, Barkovskaya A. A.¹, Tsverina V. M.¹,
Vlasov T. D.^{1, 2}

Mechanisms of neuroprotective effect of a component of green tea – L-theanine

¹ Saint-Petersburg State Medical University named after acad. Pavlov

² The Federal centre of the heart, blood and endocrinology named after V. A. Almazov
e-mail: tvlasov@yandex.ru

Abstract

Some studies have appeared recently that are devoted to the action of L-theanine (γ-glutamylethylamid) during cerebral ischemia, since it had been proved that this amino acid easily passes the blood-brain barrier and possesses a neuroprotective effect. However, the mechanisms of its action are not well understood. In the present study we examined the effects of L-theanine in ischemic brain injury in rats that was caused by occlusion of the middle cerebral artery (MCA). L-theanine was introduced into the side brain ventricle with the use of a micro injector in a dose of 800mg/kg and the volume of 20 μl. The agonists of glutamate receptors (NMDA in a dose of 35 mg/kg) were introduced intraperitoneally 3 and 24 hours after the beginning of the reperfusion; kainic acid at a dose of 1,2 mg/kg 3 hours after reperfusion. Introduction of the glutamate receptor agonists made the brain injury worse. The introduction of L-theanine displayed the neuroprotective effect in all groups of animals. L-theanine has a neuroprotective effect during cerebral ischemia, which is associated with the inhibition of the ischemic excitotoxicity by reducing the NMDA-dependent and kainat-dependent injury.

Keywords: L-theanine, cerebral ischemia, rat, neuroprotection.

Введение

В последнее время в различных исследованиях было показано, что зеленый чай и компоненты листьев зеленого чая, такие как катехины, кофеин и гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), имеют физиологическое и фармакологическое действия, вследствие чего внимание исследователей стало уделяться ингредиентам зеленого чая. L-теанин (γ-глутамилэтиламид) является важной аминокисло-

той, которая входит как компонент в состав зеленого чая. Введение L-теанина в боковые желудочки или внутривентрикулярно дозозависимо предотвращает вызванную ишемией гибель нейронов в гиппокампе СА1-региона крыс [4, 9]. Предполагается, что L-теанин действует как антагонист глутаматных рецепторов [10, 11], хотя сродство L-теанина с глутаматными рецепторами достаточно низкое.

В то же время детальный механизм нейропротективного эффекта L-теанина остается неясным.

Цель исследования

Изучение механизмов нейропротекторного действия L-теанина в опытах на модели фокальной ишемии головного мозга крысы.

Материал и методы исследования

В экспериментах использовались крысы-самцы линии Вистар, возраст — 14–16 недель, массой 220–260 г. Животные размещались в клетках по пять крыс со свободным доступом к еде и питьевой воде.

В помещении для содержания животных поддерживалась управляемая температура и влажность (24° С и 55 % относительной влажности) и соблюдался световой режим с искусственным освещением с 07.00 до 20.00.

Все эксперименты проводились под анестезией хлоралгидратом в дозе 430 мг/кг.

L-теанин (γ-глутамилэтиламид, производство *Taiyo Kagaku*, Япония) в дозе 800 мкг/кг вводился в объеме 20 мкл физиологического раствора по методике А. Ф. Якимовского [2] с помощью микроинъектора в область рострального отдела неостриатума по стереотаксическим координатам (ростральнее брегмы на 1,8–2,0 мм, латеральнее средней линии черепа на 2,0–2,5 мм и вентральнее его поверхности на 6,0–6,5 мм). Микроинъектор полностью заполнялся L-теанином (γ-глутамилэтиламид), наружное отверстие запаивалось, и микроинъектор вводился в ткань головного мозга. Оперированные животные содержались в отдельных клетках для предотвращения удаления вживляемых канюль друг у друга.

Через 2 дня после постановки микроинъектора, после прохождения стандартного срока воспалительного процесса в костной и мозговой ткани, проводилась следующая часть эксперимента.

У всех животных была воспроизведена ишемия головного мозга методом эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии (СМА), которая выполнялась по методике Koizumi [13] в модификации Longa [15] и Belayev [3] путем введения полипропиленовой нити (4-00) с окончанием, обработанным силиконом и поли-L-лизинном, в левую наружную сонную артерию, с последующим ее проведением к устью СМА через внутреннюю сонную артерию. Были выбраны стандартные сроки ишемии (30 мин) и реперфузии (48 часов).

Микроинъекции L-теанина производились трижды: через 30 мин, 3 часа и 24 часа после начала реперфузии. NMDA (N-метил-D-аспартат, производство *Sigma-Aldrich*), как агонист глутаматных NMDA-рецепторов, вводился в дозе 35 мг/кг внутривентриально через 3 часа и 24 часа после начала реперфузии; Каиновая кислота (производство *Sigma-Aldrich*) как агонист глутаматных K-рецепторов, вводилась в дозе 1,2 мг/кг внутривентриально однократно, через три часа после начала реперфузии.

Через 48 часов выводили животных из опыта. После декапитации мозг извлекался, и после отсе-

чения от большого мозга мозжечка и обонятельных луковиц его рассекали на 5 частей для получения стандартных фронтальных срезов толщиной 2 мм. Фронтальные срезы мозга окрашивались с помощью TTC (трифенилтетразолия хлорид) для выявления зоны повреждения (некроза). Кроме размера зоны некроза, у животных оценивалось неврологическое состояние с использованием шкалы Гарсия [6].

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программного пакета SPSS Statistics 13.0. Значимость различий измеряемых параметров оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни для независимых выборок. Значения P менее чем 0,05 рассматривались как значимые.

Результаты исследования и их обсуждение

Наблюдались шесть групп животных:

1. контроль (введение через микроинъектор физраствора в указанные выше сроки);
2. L-теанин (введение через микроинъектор L-теанина);
3. NMDA+физраствор (введение через микроинъектор физраствора и внутривентриальное введение NMDA);
4. NMDA+L-теанин (введение через микроинъектор L-теанина и внутривентриальное введение NMDA);
5. каиновая кислота+физраствор (введение через микроинъектор физраствора и внутривентриальное введение каиновой кислоты);
6. каиновая кислота+теанин (введение через микроинъектор L-теанина и внутривентриальное введение каиновой кислоты).

Результаты исследований представлены в табл. 1, 2.

В контрольной группе животных окклюзия средней мозговой артерии на 30 минут вызывала развитие ишемического повреждения головного мозга, которое в среднем составляло 32 % от площади среза поврежденного полушария (табл. 1). Этот показатель был несколько больше, чем тот, который был получен нами ранее (24 %) [1]. Однако мы предполагаем, что увеличение размера некроза в данной группе животных связано с тем, что всем животным была поставлена канюля в боковой желудочек контрлатерального полушария головного мозга за 2 дня до моделирования ишемии. Смертность в этой группе животных достоверно не отличалась от смертности, традиционно сопровождающей манипуляции по моделированию ишемии головного мозга. Оценка неврологического состояния крыс (табл. 2) показала, что все крысы имели выраженный неврологический дефицит на вторые сутки после операции транзиторной окклюзии СМА. Наблюдалось достоверное нарушение неврологического состояния животных: нарушалась ориентация в пространстве, симметричность движений конечностей и отмечалось уменьшение силы мышц на стороне ишемического повреждения головного мозга. Это привело к уменьшению суммы баллов по шкале Гарсия с 18 до 11,17.

Таблица 1

Показатель	Количество прооперированных животных	Общая смертность	Количество животных, использованных для анализа	Коэффициент асимметрии $S_{пп}/S_{общ}$	Размер некроза	
					$S_{повр}/S_{общ}$	$S_{повр}/S_{пп}$
Контроль (физраствор)	7	1 (14 %)	6	53,19±1,05	17,31±2,65	32,61±4,87
L-теанин	6	0	6	50,13±1,87	5,91±2,34*	11,88±4,92*
NMDA+ физраствор	14	8 (57 %)	6	53,50±1,21	28,33±4,95*#	52,76±8,18*#
NMDA+ L-теанин	9	3 (33 %)	6	52,64±0,91	16,61±2,14#^	31,45±3,59#^
Каиновая кислота+ физраствор	12	6 (50 %)	6	54,73±1,91	37,48±2,33*#	68,33±5,30*#
Каиновая кислота+ L-теанин	8	2 (25 %)	6	53,00±2,05	21,13±7,0#>	39,69±11,85#>

Здесь и далее: *— $p < 0,05$ по сравнению с группой 1 (контроль); #— $p < 0,05$ по сравнению с группой 2; ^ — $p < 0,05$ по сравнению с группой 3; > — $p < 0,05$ по сравнению с группой 5.

При введении L-теанина в желудочек мозга у животных размер некроз достигал 11,88 % от площади поврежденного полушария, т. е. уменьшался в три раза по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о выраженном нейропротективном эффекте L-теанина. Кроме того, надо отметить, что в этой группе смертность животных не отмечалась. Данные оценки по шкале Гарсия полностью соответствовали данным морфологии: у животных этой группы наблюдался достоверно менее выраженный неврологический дефицит по сравнению с контрольной группой (табл. 2). При проведении теста у животных этой группы наблюдалось активное исследовательское свойство к окружающей среде (клетке), что не отличалось от поведения интактных крыс. Кроме того, наблюдалось восстановление симметричности движений, нормальная выраженность реакции на прикосновение к туловищу и вибриссам.

Внутрибрюшинная инъекция NMDA 35 мг/кг, напротив, приводила к увеличению размера зоны некроза на 60 % по сравнению с контрольной группой, и объем повреждения занимал почти половину левого полушария, при том что вводимая доза NMDA была несколько меньше, чем в работах других исследователей [21]. В данной группе опытов после первой инъекции NMDA у 57 % животных наблюдались непрекращающиеся судороги, заканчивавшиеся гибелью животных, что послужило необходимостью увеличения количества прооперированных крыс. Повторное введение NMDA не сопровождалось фатальными последствиями. В этой группе животных отмечались также наиболее плохие неврологические показатели (по шкале Гарсия). И хотя они достоверно не отличались от группы контроля, средние значения были на 1,5 балла ниже, чем в контрольной группе.

Введение L-теанина почти вдвое снизило связанную с инъекциями NMDA высокую смертность животных и вызывало уменьшение размера зоны некроза, которая в этой группе приблизилась к таковой в группе контроля. Кроме того, L-теанин также достоверно улучшил неврологическое состояние крыс. У животных контрольной группы по отношению к группе NMDA+физраствор улучшалась двигательная активность и отмечались лучшая ориентация и менее выраженные нарушения глубокой чувствительности.

Выраженное повреждение головного мозга также отмечалось на фоне введения каиновой кислоты [5; 19]. Через 10–15 мин после внутрибрюшинной инъекции каиновой кислоты у крыс отмечалась гипервозбудимость, которая проявлялась в виде гипердинамии, и данное состояние продолжалось в течение 45–60 мин, после чего животные либо самостоятельно выходили из этого состояния, либо погибали. Смертность в данной группе животных составила 50 %, что также потребовало увеличения количества прооперированных животных. У выживших крыс отмечалось увеличение размера зоны некроза в два раза по сравнению с группой контроля. При проведении теста по шкале Гарсия у животных наблюдались нарушения симметричности движений. Кроме того, в отличие от других групп, отмечалось сильное нарушение глубокой чувствительности.

Введение L-теанина достоверно снизило повреждающее действие каиновой кислоты, уменьшив смертность животных в два раза, а также уменьшив размер зоны некроза (на 57 %), что достоверно не отличалось от показателей группы контроля. При проведении теста по шкале Гарсия также наблюдалось значительное улучшение параметров состояния

Таблица 2

Показатель	шкала Гарсия (у. е.)	
	до операции	после операции
Контроль (n=6)	18,00±0,0	11,17±1,7
L-теанин (n=6)	18,00±0,0	17,33±0,5*
NMDA+физраствор (n=6)	18,00±0,0	9,67±2,33
NMDA+L-теанин (n=6)	18,00±0,0	13,33±1,6^
Каиновая кислота+физраствор (n=6)	18,00±0,0	8,5±1,64*
Каиновая кислота +L-теанин (n=6)	18,00±0,0	14,33±3,72>

животных по отношению к контрольной группе и каиновая кислота+физраствор (табл. 2).

Таким образом, введение L-теанина достоверно уменьшало размер зоны некроза и смертность во всех группах крыс, что свидетельствует о его нейропротективном действии. Результаты исследования неврологического состояния крыс полностью подтвердили морфологические данные (табл. 2). Постановка канюли в правый боковой желудочек мозга крысы не сопровождалась нарушением неврологического состояния, и через двое суток после постановки неврологический статус животных достоверно не отличался от такового у интактных крыс.

На фоне введения NMDA и каиновой кислоты отмечалось дальнейшее ухудшение неврологического состояния крыс, что сопровождалось уменьшением суммы баллов по шкале Гарсия. Введение L-теанина приводило к значительному и достоверному улучшению неврологического статуса животных во всех группах, и итоговая оценка по шкале Гарсия увеличилась на 4–7 баллов (табл. 2).

Нейропротективное действие L-теанина было ранее показано в некоторых работах. Так, 3-минутная ишемия головного мозга у песчанок вызывала гибель CA1-нейронов гиппокампа, которая на 60 % и 90 % предотвращалась введением L-теанина в желудочки головного мозга в объеме 1 мкл в концентрации 125 и 500 мМ соответственно [8]. Похожие данные о нейропротективном действии теанина были получены на моделях ишемии головного мозга крысы при внутрибрюшинном введении теанина в дозах 0,3, 1 и 4 мг/кг [1; 4].

Хорошо известно, что одним из основных механизмов повреждения головного мозга при ишемии является эксайтотоксичность, которая связана с глутаматными рецепторами нескольких типов, в том числе NMDA [7; 18] и K-рецепторов (каинатных) [17]. L-теанин обладает способностью связываться со всеми типами глутаматных рецепторов с IC50 от 25 до 350 мМ [9] и, таким образом, может являться антагонистом всех типов глутаматных рецепторов. Так,

каиновая кислота при внутрибрюшинном введении в дозе 8 мг/кг вызывала гибель нейронов гиппокампа у песчанок, которая предотвращалась внутрибрюшинным введением L-теанина [9]. Прямых данных о предотвращении NMDA-зависимого повреждения нейронов L-теанином нам не удалось найти в доступной литературе, однако L-теанин способен быть также антагонистом NMDA-рецепторов [9].

В нашей работе мы использовали относительно небольшие концентрации NMDA и каиновой кислоты, поскольку главной задачей их введения в настоящем исследовании было усиление эксайтотоксичности, вызванной ишемией, через соответствующие NMDA и каинатные рецепторы. И NMDA, и каиновая кислота, введенные внутрибрюшинно через три часа после начала реперфузии, значительно увеличивали постишемическое повреждение головного мозга, что сопровождалось увеличением смертности животных и увеличением размера зоны некроза. Введение L-теанина в желудочек мозга достоверно уменьшало эксайтотоксичность, вызванную введением каиновой кислоты или NMDA, что хорошо согласуется с литературными данными.

Не исключено, что эффекты L-теанина связаны не только с прямым воздействием, как антагониста, на NMDA- и каинатные рецепторы. Возможно, что L-теанин вызывает изменение концентрации тормозных медиаторов, что также может являться его важным механизмом действия. Так, имеются данные, что при введении L-теанина в область стриатума у крыс в головном мозге увеличивается концентрация дофамина до 300 % от основного значения [22], а также происходит увеличение концентрации глицина, что связано с его непосредственным воздействием на AMPA/каинатные рецепторы. Также имеются данные, что через 30 мин после внутрибрюшинного введения L-теанина у крыс увеличивается уровень γ-аминомасляной кислоты (ГАМК) в желудочках головного мозга [12]. Известно, что глицин вместе с ГАМК являются тормозными нейротрансмиттерами и могут уменьшать эксайтотоксичность, вызванную

ишемией [14; 16]. Следовательно, можно сделать предположение, что, кроме непосредственного блокирующего воздействия на глутаматные рецепторы, еще одним протективным механизмом при введении L-теанина является увеличение выделения тормозных нейромедиаторов, что также может препятствовать глутаматной эксайтотоксичности.

Таким образом, L-теанин вызывал достоверное угнетение ишемической эксайтотоксичности, что сопровождалось уменьшением ишемического/реперфузионного повреждения головного мозга крыс.

Выводы

1. Введение L-теанина в боковой желудочек мозга в дозе 800 мкг/кг уменьшает ишемическое и реперфузионное повреждение головного мозга крыс на модели транзиторной окклюзии средней мозговой артерии.

2. Механизмы нейропротективного действия L-теанина связаны с угнетением ишемической эксайтотоксичности посредством уменьшения NMDA-зависимого и кайнатзависимого повреждения.

Авторы благодарят ЗАО «Вертекс» за помощь в выполнении данной работы.

Литература

1. Зухурова, М. А. Нейропротективный эффект L-теанина (гамма-глутамилэтиламида) при экспериментальной ишемии головного мозга у крыс / М. А. Зухурова [и др.] // Вестник Авиценны. — 2010. — № 1. — С. 119–125.
2. Якимовский, А. Ф. Функциональная специализация медиаторных систем как основа полифункциональности неостриатума / А. Ф. Якимовский // Рос. физиол. журн. — 1998. — № 84 (9). — С. 906–912.
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. — № 833 (2). — P. 181–190.
4. Egashira, N. Phytother. Res. / N. Egashira [et al]. — 2008. — № 22. — P. 65–68.
5. Filippo, S. Mosh?e Effects of Status Epilepticus Early in Life on Susceptibility to Ischemic Injury in Adulthood / S. Filippo [et al] // Epilepsia. — 2005. — № 46 (4). — P. 490–498.
6. Garcia, J. H. Early reperfusion as a rationale from of therapy in ischemic stroke / J. H. Garcia // Rev. Neurol. — 1995. — № 23 (123). — P. 1067–1073.
7. Hardingham, G. E. The Yin and Yang of NMDA receptor signaling / G. E. Hardingham, H. Bading // Trends. Neurosci. — 2003. — № 26. — P. 81–89.
8. Kakuda, T. Protective effect of γ -glutamylethylamide (theanine) on ischemic delayed neuronal death in gerbils / T. Kakuda [et al] // Neurosci. Lett. — 2000. — № 289. — P. 189–192.
9. Kakuda, T. Neuroprotective Effects of the Green Tea Components Theanine and Catechins / T. Kakuda // Biol. Pharm. Bull. — 2002. — № 25 (12). — P. 1513–1518.
10. Kakuda, T. Inhibition by theanine of [3H] AMPA, [3H] kainate, and [3H]MDL105,519 to glutamate receptors / T. Kakuda [et al] // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 2002. — № 66. — P. 2683–2686.
11. Kakuda, T. Inhibiting effects of theanine on caffeine stimulation evaluated by EEG in the rat / T. Kakuda [et al] // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 2000. — № 64. — P. 287–293.
12. Kimura, R. Influence of alkylamides of glutamic acid

and related compounds on the central nervous system I. Central depressant effect of theanine / R. Kimura [et al] // Chem. Pharm. Bull. — 1971. — № 19. — P. 1257–1261.

13. 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. — № 8. — P. 1–8.

14. Legendre, P. The glycinergic inhibitory synapse / P. Legendre // Cell. Mol. Life Sci. — 2001. — № 58. — P. 760–793.

15. Longa, E. Z. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats / E. Z. Longa [et al] // Stroke. — 1989. — № 20 (1). — P. 84–91.

16. Lopez-Corcuera, B. Glycine neurotransmitter transporters : an update / B. Lopez-Corcuera [et al] // Mol. Membr. Biol. — 2001. — № 18. — P. 13–20.

17. O'Neill, M. J. LY377770, a novel iGlu5 kainate receptor antagonist with neuroprotective effects in global and focal cerebral ischaemia / M. J. O'Neill [et al] // Neuropharmacology. — 2000. — № 39 (9). — P. 1575–1588.

18. Perez-Otano, I. Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking / I. Perez-Otano, M. D. Ehlers // Trends. Neurosci. — 2005. — № 28. — P. 229–238.

19. Reissa, J. I. Chronic activity wheel running reduces the severity of kainic acid-induced seizures in the rat : Possible role of galanin / J. I. Reissa // Brain. Research. — 2009. — P. 54–63.

20. Yamada, T. Theanine, γ -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. — P. 21–27.

21. Yadid, G. Glycine stimulates striatal dopamine release in conscious rats / G. Yadid [et al] // Br. J. Pharmacol. — 1993. — № 110. — P. 50–53.

22. Yokogoshi, H. Effect of theanine, γ -glutamylethylamide, on brain monoamines and striatal dopamine release in conscious rats / H. Yokogoshi [et al] // Neurochem. Res. — 1998. — № 23. — P. 667–673.