

ХУЛОСА

Тавсифи муқоисавии омилҳои хавфи бемории варикоз

**К. А. Шемеровский, З. М. Тоштемирова,
М. С. Табаров, Р. А. Саидмуродова, М. Х. Хоҷаева**

Муоинаи 64 нафар, ки дар муддати аз 1 то 10 сол мубталои бемории варикоз буданд, нишон дод, ки муқоисаи омилҳои асосии хавфи рушди бемории варикоз аз он шаҳодат медиҳанд, ки омили ҳалқунандаи пайдоиши ин беморӣ, эҳтимол брадиэнтерия, яъне қабзият мебошад.

SUMMARY

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF FACTORS OF RISK UNDER VARICOSE DISEASE

**K.A. Shemerovsky, Z.M. Toshtemirova,
M.S. Tabarov, R.A. Saidmuradova, M.H. Hojaeva**

The examination of 64 patients with varicose disease in 1-10 years showed that key factor of risk under initiation of the disease is damage of regularity of evacuator function of bowels as a brady-enteria form.

Key words: varicose disease, brady-enteria

Адрес для корреспонденции:

К.А. Шемеровский - ведущий специалист НИИ ЭМ СЗО РАМН РФ; Санкт-Петербург
Тел.: +79213234699; E-mail: contshem@yandex.ru

НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫЙ ЭФФЕКТ L-ТЕАНИНА (ГАММА-ГЛУТАМИЛЭТИЛАМИДА) ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС

М.А. Зухурова, А.Е. Байса, А.В. Симаненкова, Т.Д. Власов
Кафедра патофизиологии

**Санкт - Петербургского государственного медицинского универ-
ситета им. акад. И.П. Павлова, Российской Федерации**

В настоящем исследовании рассматривается нейропротективный эффект гамма-глутамилэтиламида (L-теанина) при ишемическом повреждении головного мозга крысы, вызванного окклюзией среднемозговой артерии (СМА). Теанин вводился внутривентрикулярно в дозах 1 мг/кг и 4 мг/кг за 30 мин. до и через 3 часа после окклюзии СМА. Во всех экспериментах теанин достоверно уменьшал размеры зоны некроза на вторые сутки после окклюзии. Кроме того, при оценке состояния животных на 2-й день после воспроизведения ишемии отмечалось достоверное уменьшение неврологического дефицита у крыс, которым вводили теанин. Таким образом, доказано, что теанин обеспечивает нейропротекцию при воспроизведении модели фокальной ишемии головного мозга, что потенциально может быть использовано для предупреждения сосудистых заболеваний головного мозга.

Ключевые слова: ишемии головного мозга у крыс, гамма-глутамилэтиламид (L-теанин)

Введение. L-теанин (гамма-глутамилэтиламид) является уникальной аминокислотой, которая содержится в зелёном чае (*Camellia sinensis*). Как компонент зелёного чая L-теанин был открыт еще в 1949г. Sakato [1] и в 1964 году одобрен как пищевая добавка в Японии. Он водорастворим, легко всасывается через ЖКТ и проходит гематоэнцефалический барьер; в почках происходит его гидролиз с помощью глутаминазы до глутаминовой кислоты и этиламина. В последние годы интенсивно изучается его кардиоваскулярный, неврологический и противоопухолевый эффект.

L-теанин является натуральным аналогом глутамата, который конкурентно связывается и блокирует глутаматные рецепторы [2]. В работах Kakuda et al. показано, что теанин связывается с глутаматными рецепторами подтипа альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-изоксазол-4-пропионат (AMPA) и N-метил-D-аспартат (NMDA) в кортикальных нейронах у крыс. Показано, что блокирующий эффект теанина на AMPA - рецептор приблизительно в 10 раз больше, чем при действии на NMDA - рецептор [3]. Антагонисты AMPA- рецептора обеспечивают защиту от ишемии, индуцированной окклюзией средней мозговой артерии у крыс [4, 5-7] и передней мозговой артерии у песчанок и у крыс [8,10]. При глобальной ишемии в экспериментах на мышях также показано, что интрацеребровентрикулярное введение теанина замедляло гибель нейронов области CA1 гиппокампа [11]. Многократная инъекция теанина интравентрикулярно уменьшала размер инфаркта головного мозга у мышей [12].

Цель исследования: изучение нейропротективного эффекта теанина при его внутрибрюшинном введении в разных дозах на модели окклюзии средней мозговой артерии у крыс.

Материалы и метод. В экспериментах использовались крысы-самцы линии Вистар, возраст 14-16 недель, массой 220-270 г. Животные размещались в клетках по пять крыс со свободным доступом к еде и питьевой воде. В лаборатории поддерживалась управляемая температура 24 С и соблюдался световой режим с искусственным освещением с 07.00 до 20.00. Все эксперименты проводились под анестезией хлоралгидратом в дозе 430 мг/кг.

Ишемия головного мозга воспроизводилась с помощью модели транзиторной окклюзии средней мозговой артерии (СМА) по методике Koizumi J. et al., 1986 [13] в модификации Longa E. Z. et al., 1989 [14] и Belayev L. et al. (1999) [15]. Полипропиленовая нить (4-00) длиной 22 мм, обработанная силиконом и поли-L-лизинном вводилась ретроградно в левую наружную сонную артерию, после чего проводилась через внутреннюю сонную артерию к устью СМА. Продолжительность ишемии составляла 30 минут с последующей реперфузией - 48 часов.

L-теанин - производство Taiyo Kagaku (Япония) растворялся в физиологическом растворе в концентрации 6,1-24,4 μM (1-4 мг/мл) и вводился внутрибрюшинно в объёме 0,25 мл.

Исследовались четыре группы животных.

1. Контрольная. Животным воспроизводилась ишемия головного мозга с последующей реперфузией.

2. Через 3 часа после операции по созданию ишемического повреждения вводился теанин в дозе 1 мг/кг.

3. Через 3 часа после операции по созданию ишемического повреждения вводился теанин в дозе 4 мг/кг.

4. Теанин в дозе 1 мг/кг вводился за 30мин до операции.

Степень повреждения головного мозга оценивалась на вторые сутки после операции с помощью морфологического метода, а также с помощью оценки параметров неврологического дефицита.

Исследование размера очага повреждения. После завершения 48-часового послеоперационного периода головной мозг извлекался, разрезался на участки толщиной 2мм. Фронтальные срезы мозга инкубировали в 0,2% растворе трифенилтетразолия хлорида (ТТС) (MP Biomed, США) при температуре 37,0 С в течение 15 минут. Затем с помощью специального аппаратного комплекса получали цифровые фотографии передней и задней поверхности сре-

зов, на которых измерялась площадь зоны повреждения. Полученные результаты были обработаны в программе ImageJ для получения относительной площади повреждения отдельной стороны каждого среза, затем вычисляли средний показатель для каждого среза, и средний показатель площади повреждения каждого мозга. Степень повреждения головного мозга оценивалась также косвенно, по коэффициенту асимметрии полушарий. Определялось процентное отношение площади повреждённого полушария (левого) (Snp) к площади всего фронтального среза мозга (Sобщ). У здорового животного отношение левого полушария к площади всего мозга равно 50%.

Оценка неврологического состояния животных производилась по шкале Garcia JH et al. (1995), которая состоит из шести критериев. По каждому из них крыса может получить максимальный балл - 3 (норма) и минимальный балл - 0-1 (тяжёлое нарушение). Таким образом, максимальное возможное количество баллов - 18. Количество баллов, данное каждой крысе по завершении испытания, представляет собой сумму результатов всех шести отдельных тестов. Тестирование проводилось - перед опытом и через день после операции в фиксированное время для исключения изменений поведения за счёт циркадного ритма и в той же клетке, в которой содержалось это животное.

Критерии:

1. Спонтанная активность - пятиминутное наблюдение за крысой в клетке, активность крысы определяется её способностью достигать всех четырёх стенок клетки. При этом, три балла - крыса двигается по периметру клетки, активное исследовательское поведение, за время наблюдения крыса достигает, как минимум, трёх стенок клетки. Два балла - неуверенность в движениях (задержка в выборе направления) крыса достигает менее трёх стенок клетки, хотя иногда пытается становиться на верхний край стенки клетки. Один балл - крыса практически не двигается и не пытается вставать на край клетки. Ноль баллов - полное отсутствие движений.

2. Симметричность движения конечностей - крыса поднимается за хвост, определяется степень движения и вовлечённость в движение контралатеральных ишемизированному полушарию конечностей. 3 балла - все конечности участвуют в движении симметрично, 2 балла - асимметрия скорости движения на контралатеральной очагу стороне, 1 балл - минимальные движения контралатеральных очагу конечностей, 0 баллов - передняя контралатеральная конечность не двигается.

3. Симметричность движения передних конечностей - крыса передвигается на передних лапах, баллы те же, что и в пункте № 2.

4. Подъём по сетчатой стенке - крыса помещается на решётку, оценивается участие конечностей в движении: норма - 3 балла, слабость и отставание контралатеральных очагу конечностей - 2 балла, неспособность подъёма -1 балл.

5. Проприорецепция тела - оценивается реакция (поворот головы) на прикосновение тупым предметом к туловищу крысы справа или слева. Баллы: 3 - норма, 2 - замедление реакции при раздражении контралатеральной стороны, 1 - отсутствие реакции.

6. Реакция на прикосновение к вибриссам - баллы проставляются аналогично пункту 5.

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 Р менее, чем 0,05, рассматривались как значимые.

Результаты и их обсуждение. Ишемия бассейна средней мозговой артерии длительностью 30 минут и последующий 48-часовой реперфузионный период приводят к формированию хорошо очерченного очага некроза в области подкорковых структур (striatum) и вызывало отёк полушария мозга на стороне повреждения. В группе с введением L-теанина (1мг/кг) через

три часа после ишемии показатель площади повреждения был в три раза меньше ($P < 0,001$), чем в контроле, асимметрия полушарий уменьшалась, но из-за разброса значений статистически не значимо ($P > 0,05$). При увеличении дозы препарата до 4 мг/кг, вводимого через три часа после ишемии, наблюдалось ещё более выраженное уменьшение площади повреждения относительно контрольной группы ($P < 0,001$) и статистически значимо снизился коэффициент асимметрии (степень отёка ткани головного мозга) ($P < 0,05$). Введение L-теанина за 30 минут до начала ишемии в концентрации 1 мг/кг также сопровождалось инфаркт-лимитирующим эффектом ($P < 0,001$), практически равному по выраженности введению L-теанина в этой же дозе через 3 часа после ишемии. В этой группе животных также отмечалось снижение выраженности отёка полушария головного мозга ($P < 0,05$) (табл.).

Таблица

Показатели повреждения головного мозга крыс при экспериментальной ишемии /постишемической реперфузии на фоне введения исследуемого препарата

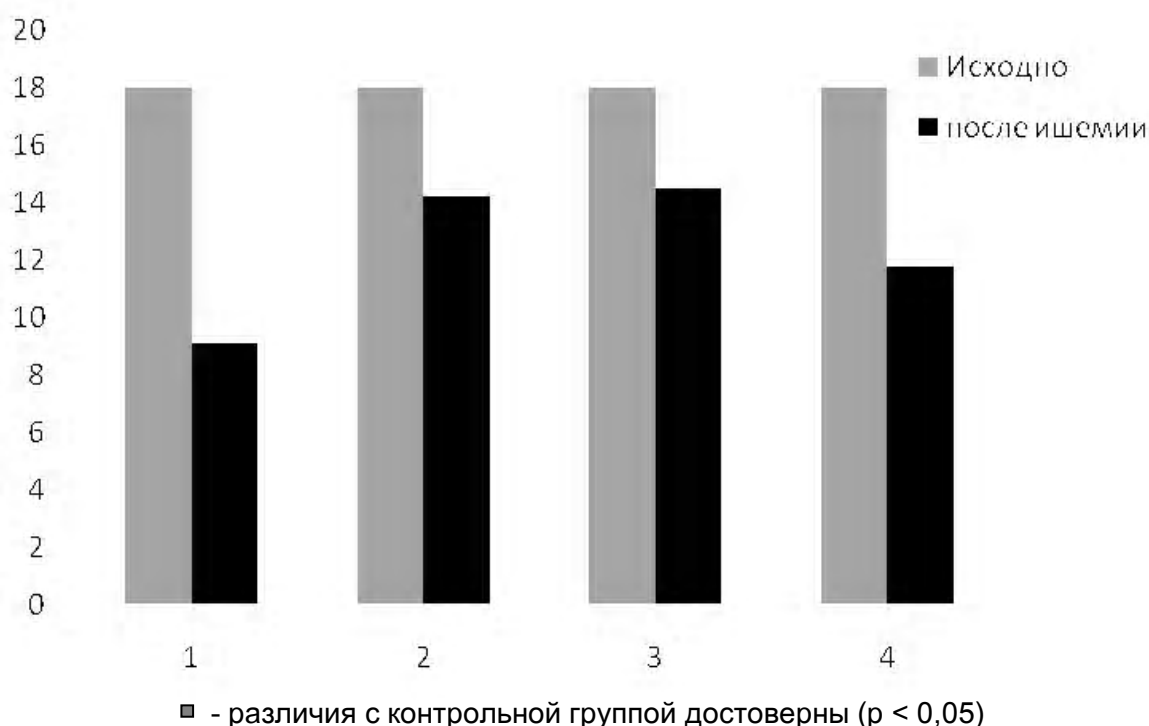
Показатель Группа	Коэфф. асимметрии Snp/Sобщ	Размер некроза		Статистическая достоверность (p)	
		Сповр/Sобщ	Сповр/Snp	Snp vs. Sобщ	Сповр vs. Sобщ
Контроль (n=10)	54,90±2,40	13,52±2,36	24,63±4,04	-	-
Через 3 часа после ишемии введён теанин по 1мг/кг (n=9)	52,30±2,44	4,71±2,20*	9,07±4,44	0,097319	0,00583
По 4 мг/кг после 3-00 (n=7)	52,23±1,01*	3,19±2,09*	6,12±3,95	0,006993	0,000623
За 30 мин до ишемии по 1мг/кг (n=8)	51,77±1,46**	4,69±1,99*	9,11±3,99	0,017483	0,000982

Примечание: статистическая достоверность (с контролем) - * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; Snp/Sобщ: процентное отношение площади повреждённого полушария (Snp) к площади всего фронтального среза мозга (коэффициент асимметрии); Сповр/Sобщ - процентное отношение площади некроза (Сповр.) к площади всего фронтального среза мозга; Сповр/Snp - процентное отношение площади некроза (Сповр.) к площади повреждённого полушария (Snp)

Таким образом, мы получили данные, что введение теанина в разных дозах и на разных сроках (до и после ишемии) достоверно уменьшают размер некроза, вызванного эндоваскулярной окклюзией СМА.

У всех крыс контрольной группы на 2-е сутки после ишемии головного мозга отмечался выраженный неврологический дефицит: по шкале Гарсия показатели составляли 9,10±1,86

баллов (рис.). Введение теанина в дозе 1 мг/кг через 3 часа после ишемического повреждения сопровождалось достоверным уменьшением выраженности неврологического дефицита (средний балл по шкале Гарсия составил $14,20 \pm 1,32$, $p=0,0001$ в сравнении с контролем). Также достоверный эффект был получен при введении теанина в дозе 4 мг/кг через 3 часа после ишемического повреждения (средний балл - $14,43 \pm 1,72$, $p=0,0002$ в сравнении с контролем), но разницы между дозами 1 и 4 мг/кг не было. т. е. увеличение дозы теанина до 4 мг/кг не сопровождалось усилением нейропротективного эффекта в отношении неврологического состояния крыс ($p=0,45$). При введении теанина в дозе 1 мг/кг за 30 мин до ишемического повреждения головного мозга у крыс также был получен достоверный эффект, но он был менее выражен, чем во второй и третьей группах (средний балл - $11,75 \pm 2,37$, $p=0,011$ в сравнении с контролем).



Таким образом, у всех крыс, которым вводился теанин, улучшалось исследовательское поведение, увеличивалась сила мышц, ориентировочное движение на проволочной клетке, симметричность движения конечностей, особенно, вовлечённость в движение контралатеральных ишемизированному полушарию конечности.

Наше исследование показало, что введение теанина достоверно предотвращало гибель нейронов от ишемии, вызванной окклюзией СМА. Возможно, нейропротективное действие теанина связано с антагонистическим эффектом на AMPA и NMDA - рецепторы, поскольку наиболее выраженный эффект получен при введении теанина через 3 часа после ишемического повреждения, что позволяет предположить, что теанин защищает нейроны от отсроченной гибели, которая преимущественно связана с эффектом эксайтотоксичности. Необходимо отметить, что по данным Arias et al. (1999) [16] нейропротективный эффект комбинации антагонистов AMPA и NMDA рецепторов выше, чем сумма эффектов индивидуальных антагонистов. Таким образом, нейропротективный эффект теанина может быть связан с антагонистическим эффектом на оба рецептора. Данные о возможном прямом нейропротективном действии теанина подтверждаются результатами работ Yokogoshi et al. (1995, 1998) [17-18], в которых показано, что теанин, при пероральном введении транспортируется через гематоэнцефалический барьер.

Вывод. Введение теанина дозо-зависимо уменьшает ишемическое и реперфузионное повреждение, вызванное окклюзией СМА у крыс и улучшает их неврологическое состояние.

Нейропротективный эффект теанина одинаково выражен при его введении через 3 часа после ишемического повреждения, и за 30 минут до окклюзии СМА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sakato Y. The chemical constituents of tea: III. A new amide theanine. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 1949; 23: 262-267
2. Maruyama M., Takeda K., 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, *Comp. Biochem. Physiol.* 1994; 107C: 105-110
3. Kakuda T., Nozawa A., Sugimoto A., Niino H., Inhibition by theanine of binding of [3H] AMPA, [3H] kainate, and [3H] MDL 105519 to glutamate receptors, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002; 66: 2683-2686
4. Kawasaki-Yatsugi S., Ichiki C., Yatsugi S.-I., Shimizu-Samata M., Yamaguchi T., YM90K, an AMPA receptor antagonist, protects against ischemic damage caused by permanent and transient middle cerebral artery occlusion in rats, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1998; 358: 586-591
5. Umemura K., Shimakura A., Nakashima M., Neuroprotective effect of a novel AMPA receptor antagonist, YM90K, in rat focal cerebral ischaemia, *Brain Res.* 1997; 773: 61-65.
6. Xue D., Huang Z.G., Barnes K., Lesiuk H.J., Smith K.E., Buchan A.M., Delayed treatment with AMPA, but not NMDA, antagonist reduces neocortical infarction, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1994; 14: 251-261
7. Yao H., Ibayashi S., Nakane H., Cai H., Uchimura H., Fujishima M., AMPA receptor antagonist, YM90K, reduces infarct volume in thrombotic distal middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats, *Brain Res.* 1997; 753: 80-85
8. Kawasaki-Yatsugi S., Yatsugi S.-I., Koshiya K., Shimizu-Sasamata M., Neuroprotective effect of YM-90K, an AMPA receptor antagonist, against delayed neuronal death induced by global cerebral ischemia in gerbils and rats, *Jpn. J. Pharmacol.* 1997; 74: 253-260
9. Sheardown M.J., Suzak P.D., Nordholm L., AMPA, but not NMDA, receptor antagonism is neuroprotective in gerbil ischemia, even when delayed 24 h, *Eur. J. Pharmacol.* 1993; 236: 347-353
10. Kakuda T., Yanase H., Utsunomiya K et al. Protective effect of ?-glutamylethylamide (theanine) on ischemic delayed neuronal death in gerbils. *Neurosci Lett* 2000; 289: 189-192
11. Egashira N., Hayakawa K., Mishima K. et al. Neuroprotective effect of L-glutamylethylamide (theanine) on cerebral infarction in mice. *Neurosci. Lett.* 2004; 363: 58-61
12. Koizumi, J., Yoshida Y., Nakazawa T., Ooneda G. 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. *Jpn. J. Stroke.* 1986; 8: 1-8
13. Longa E.Z., Weinstein P.R., Carlson S., Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989; 20(1): 84-91
14. Belayev L., Busto R., Zhao W., Fernandez G., Ginsberg M.D. Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: neurological and histological validation. *Brain Res.* 1999; 833(2): 181-90
15. Garcia J.H. Early reperfusion as a rationale from of therapy in ischemic stroke. *Rev Neurol.* 1995; 23(123): 1067-73
16. Arias R.L., Tasse J.R.P., Bowlby M.R. Neuroprotective interaction effects of NMDA and AMPA receptor antagonists in an in vitro model of cerebral ischemia. *Brain Res* 1999; 816: 299-308
17. Yokogoshi H., Kato Y., Sagesaka Y.M. et al. Reduction effect of theanine on blood pressure

and brain 5-hydroxyindoles in spontaneously hypertensive rats. Biosci Biotech Biochem 1995; 59: 615-618

18.Yokogoshi H., Kobayashi M., Mochizuki M. et al. Effect of theanine, gamma-glutamylethylamide, on brain monoamines and striatal dopamine release in conscious rats. Neurochem Res 1998; 23: 667- 673

Хулоса
Таъсири нейропротективи L-теанин ҳангоми ишемияи
таҷрибаии мағзи сар дар калламушҳо
М. А. Зухурова, Е. А. Байса,
А. В. Симаненкова, Т. Д. Власов

Дар тадқиқоти мазкур таъсири нейропротективи гамма-глутамилэтиламид (L-теанин) ҳангоми осеби ишемикии мағзи сари калламушҳо, ки бо сабаби инсидоди шараёни миёнамағзӣ (ШММ) ба вуҷуд омадааст, дида баромада шуд. Теанин бо миқдори 1 мг/кг ва 4 мг/кг дар муддати 30 дақиқа, то ва баъд аз 3 соати инсидоди ШММ бо тариқи дохилисифоқӣ ворид карда шуд. Дар ҳамаи таҷрибаҳо теанин андозаҳои доираи мавтро дар шабонарӯзи дуҷуми баъди ба вуҷӯъ омадани инсидод хеле кам намуд. Ба ғайр аз ин, ҳангоми арзёбии ҳолати ҳайвонҳо дар рӯзи дуҷуми таҷдиди ишемия хеле саҳеҳ камшавии норасоии неврологӣ дар калламушҳое, ки ба онҳо теанин ворид карда буданд, ба қайд гирифта шуд. Ҳамин тавр, исбот карда шуд, ки теанин нейтропротексияро ҳангоми таҷдиди амсилаи (моделӣ) ишемияи мавзеи мағзи сар таъмин менамояд, ки яқинан метавонад барои пешгирии бемориҳои рагии мағзи сар истифода шавад.

SUMMARY
NEUROPROTECTIVE EFFECT OF L-TEANINE DURING
EXPERIMENTAL ISCHEMIA OF BRAIN IN RATS
M.A. Zuhurova, A.E. Baisa, A.V. Simanenkova, T.D. Vlasov

In the investigation neuroprotective effect of L-teanine (gamma-glutamyl- ethylamide) during ischemic damage of rat brain, caused by occlusion of media brain artery (MBA) is studied. Teanine was injected intraperitoneumly in doses 1 and 4 mg/kg 30 min before and 3 h after occlusion of MBA. Teanine in all cases decreased sizes of necrosis zones in 2 day after occlusion. Besides, in this time neurological deficit was decreased. It was received that teanine provides neuroprotection during focal ischemia of brain. That preparation may be used for protection of vascular disease of the brain.

Key words: ischemia of brain, rat, L-teanine

Адрес для корреспонденции:

М.А. Зухурова - аспирант СПбГМУ им. И.П. Павлова; Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Толстого, д.6/8.Тел.: +79500054549