

## ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ L-ФЕНІЛАЛАНІНУ В ЯКОСТІ ПЕРСПЕКТИВНОГО НЕЙРОПРОТЕКТОРА

Пономаренко Н.О., Кулик В.Б.

Київський національний університет технологій та дизайну, кафедра промислової фармації, м. Київ, Україна

---

З використанням короткотривалої киснево-глюкозної депривації в якості моделі ішемічного ушкодження мозку на органотиповій культурі гіпокампа виявлено нейропротекторні властивості L-фенілаланіну. На підставі аналізу морфо-функціональних змін нервових клітин органотипової культури гіпокампу та оцінки життєздатності зрізів СА1 зони гіпокампу встановлено залежність життєздатності нейронів гіпокампу від тривалості киснево-глюкозної депривації та часу з моменту її припинення. В умовах киснево-глюкозної депривації L-фенілаланін здійснює свій нейропротекторний вплив, частково через конкурентне зв'язування глутаматних рецепторів, а частково завдяки антиоксидантним властивостям, а ушкодження клітин культивованих зрізів гіпокампу пов'язане, як з глутаматною ексайтотоксичністю, так і з дією вільних радикалів. Доведено, що застосування L-фенілаланіну призводить до покращення функціонального стану досліджених нейронів, а отже, зазначена вище сполука може претендувати на роль майбутнього нейропротектора.

---

**Ключові слова:** киснево-глюкозна депривація, клітини гіпокампу, L-фенілаланін, нейропротекція

## STUDY OF THE ACTIVITY OF L-PHENYLALANINE AS A PROMISING NEUROPROTECTOR

Ponomarenko N.O., Kulyk V.B.

Kyiv National University of Technologies and Design, Department of Industrial Pharmacy, Kyiv, Ukraine

---

Using short-term oxygen-glucose deprivation as a model of ischemic brain damage on organotypic culture of the hippocampus revealed the neuroprotective properties of L-phenylalanine. Based on the analysis of morpho-functional changes of nerve cells of hippocampal organotypic culture and assessment of viability of CA1 sections of the hippocampal zone, the dependence of hippocampal neuron viability on the duration of oxygen-glucose deprivation and time since its cessation was established. Under conditions of oxygen-glucose deprivation, L-phenylalanine exerts its neuroprotective effect, partly due to competitive binding of glutamate receptors, and partly due to antioxidant properties, and cell damage of cultured hippocampal sections is associated as with glutamate excitotoxins. It has been proven that the use of L-phenylalanine leads

**to an improvement in the functional state of the studied neurons, and therefore, the above compound can claim the role of a future neuroprotector.**

---

**Keywords:** oxygen-glucose deprivation, hippocampal cells, L-phenylalanine, neuroprotectionthis

**Мета дослідження:** дослідження нейропротекторної дії L-фенілаланіну в умовах ішемічного ушкодження мозку *in vitro* та пошук ефективних засобів впливу на молекулярні механізми, що обумовлюють збудливість клітин.

**Матеріали і методи дослідження:** щури лінії Вістар; виділення та культивування зрізів гіпокампу, вимірювання відносної кількості цитозольного ферменту лактатдегідрогенази у культуральному середовищі, оцінка життєздатності органотипової культури гіпокампу за методом виключення барвника трипанового синього, вимірювання концентрації малонового диальдегіду (МДА) в культуральному середовищі.

#### **Результати дослідження.**

Об'єктом наших досліджень була обрана органотипова культура гіпокампу оскільки, як відомо, гіпокамп є дуже чутливий до нестачі кисню та глюкози, що виникає при ішемії. В умовах цієї культури зберігається цитоархітектоніка тканини, типи клітин та шарів, первинні міжклітинні зв'язки, синаптична організація, розташування рецепторів, які сформовані в природних умовах. Крім того, присутній прямий доступ до позаклітинного простору, що дозволяє, з одного боку, легко контролювати умови життєдіяльності тканини (склад солей та метаболітів, рН, газове насичення та т.п.), а з іншого – надає можливість прямого впливу на тканину хімічними речовинами потрібної концентрації. Протягом 12-14 днів культивування зрізи гіпокампу повністю очищувалися від клітин, пошкоджених під час виділення, та досягали стабільного стану[1]. Оцінка органотипових зрізів гіпокампу проводилась шляхом визначення ферменту ЛДГ, забарвлення зрізів вітальним барвником трипановим синім та з допомогою

морфологічного аналізу напівтонких зрізів. Морфо-функціональна оцінка, як усіх нервових клітин культивованих зрізів гіпокампу, так і CA1 нейронів гіпокампу, продемонструвала високу якість та життєздатність органотипових культур гіпокампу, що дозволяло нам використовувати цей об'єкт у подальших дослідженнях.

Найчастіше для моделювання ішемічних умов *in vitro* використовують киснево-глюкозну депривацію (КГД). У своїй роботі для визначення оптимального терміну КГД, що дозволило б проводити тестування та дослідження механізмів дії ароматичної амінокислоти L-фенілаланіну, ми окремою серією експериментів визначили вплив КГД різної тривалості (10, 30 та 60-хвилин) на життєдіяльність органотипової культури гіпокампу. Динаміку розвитку ішемічного пошкодження спостерігали відразу після завершення КГД, через 1, 4 та 24 години. Життєздатність нервових клітин культивованих зрізів оцінювали за допомогою цитозольного ферменту лактатдегідрогенази (ЛДГ) та вітального барвника трипанового синього. Відразу після КГД рівень ЛДГ у культуральному середовищі достовірно не відрізнявся від контролю. Через одну годину реоксигенації кількість ЛДГ в культуральному середовищі від зрізів, що піддавалися впливу 10-хвилинної КГД був несуттєво вищий у порівнянні з контрольними [2]. Протягом 4 та 24 годин розвивалося ушкодження і рівень ЛДГ досягав  $32,1 \pm 8,2$  % ( $p < 0,05$ ) та  $60,1 \pm 1,5$  % ( $p < 0,001$ ), відповідно. Вплив 30- та 60-хвилинної КГД проявлявся вже протягом першої години. Рівень ЛДГ складав  $45,4 \pm 9,6$  % ( $p < 0,01$ ) і  $62,1 \pm 9,9$  % ( $p < 0,01$ ), відповідно. Через 4 та 24 години показники кількості ферменту значно збільшувалися: до  $60,8 \pm 12,4$  і  $90,5 \pm 1,9$  % ( $p < 0,001$ ) після 30-хв КГД; та до  $64,2 \pm 8,7$  і  $98,6 \pm 1,4$  % ( $p < 0,001$ ) після 60-хв (рис. 1).

Аналогічні тенденції мали і результати підрахунку числа ушкоджених нейронів CA1 зони, які були забарвлені трипановим синім.

Дані результати засвідчили залежність ступеню життєздатності нейронів культивованих зрізів гіпокампу від тривалості КГД та часу, який

минає з моменту її припинення. Короткотривала 10-хвилинна КГД здійснює пошкоджуючий вплив на органотипову культуру гіпокампу м'яко та поступово, що дає можливість проводити дослідження механізмів, які приймають участь у розвитку ішемічного ушкодження, та вивчати нейропротективну дію L-фенілаланіну [3].

Оцінювали стан нейронів CA1 зони за такими критеріями: нормальні клітини (нейрони з незміненими ядром та цитоплазмою), конденсовані клітини (гіперхромні нейрони, з конденсованими ядрами та цитоплазмою) та набряклі клітини (нейрони, які мали просвітлену цитоплазму та світле набрякле ядро) [4].

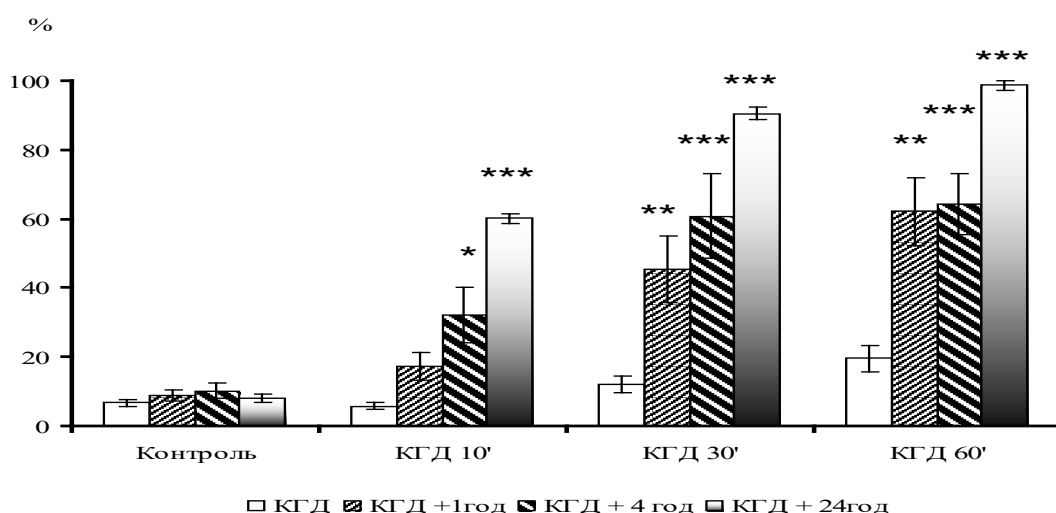


Рисунок 1. Відносна кількість ферменту ЛДГ в культуральному середовищі органотипових зрізів гіпокампу в умовах КГД різної тривалості (10, 30 та 60 хв.) та подальшої реоксигенації (1, 4 та 24 год.).

При морфологічному аналізі контрольних зрізів CA1 зону гіпокампу складала неушкоджена клітина. Через одну годину після проведеної 10-хвилинної КГД нами виявлена наявність ушкоджених CA1 нейронів: приблизно 20 % від загальної кількості нейронів – конденсованих, та незначна кількість набряклих. Через чотири години - кількість ушкоджених

клітин досягала 75 %. Оцінка забарвлених CA1 нейронів трипановим синім, як було описано вище, не виявляла значних змін через 1 годину після 10 хвилинної КГД, тоді як результати мікроскопічного аналізу вже через одну годину після КГД виявили значну різницю у співвідношенні різних типів ушкодження CA1 нейронів в умовах КГД, а саме в збільшенні кількості конденсованих клітин.

Таким чином, для подальших досліджень нами була обрана експериментальна модель ішемічного ушкодження гіпокампу за такою схемою: 1) КГД - 10 хвилин; 2) культивування в нормальних умовах; 3) тестування культур через 1 та 4 години. Така модель є слушною для виявлення можливої нейропротекторної дії фармакологічних речовин при ішемічному ушкодженні мозку [5].

Відомо, що розвиток пошкодження мозку при ішемії пов'язаний з дією глутамату та вільних радикалів. Щоб оцінити вплив глутамату в нашій моделі ішемічного ушкодження на життєздатність клітин органотипової культури гіпокампу нами був використаний антагоніст глутаматних рецепторів МК-801. Він, як показано в літературі, блокує глутаматні NMDA-рецептори та зменшує деструктивні зміни нейронів в ішемічних умовах. Оцінку участі вільних радикалів в умовах нашої моделі проводили за допомогою U-74389G, речовини, яка належить до групи лазароїдів (21-аміностероїдів) та здатна знижувати перекисне окиснення ліпідів [6].

Рівень ферменту ЛДГ у культуральному середовищі в умовах КГД зростав з  $3,8 \pm 0,2$  % у контролі до  $14,9 \pm 2,1$  % ( $p < 0,001$ ) через 4 години. У присутності МК-801 та U-74389G ці показники становили  $7,6 \pm 1,4$  % ( $p < 0,05$ ) та  $8,1 \pm 1,5$  % ( $p < 0,05$ ) відповідно (рис. 2).

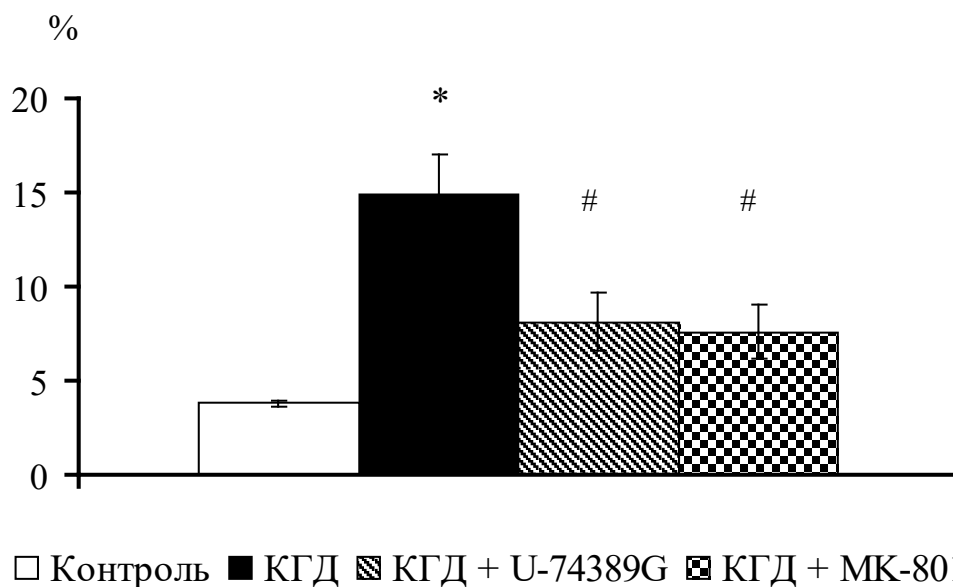


Рисунок 2. Відносна кількість ферменту ЛДГ в культуральному середовищі органотипових зрізів гіпокампу в умовах КГД (10 хв.) та подальшої реоксигенації (4 год.) в присутності U-74389G та МК-801.

Результати оцінки життєздатності культивованих зрізів гіпокампу (за даними ЛДГ) та зокрема CA1 нейронів (за даними забарвлення трипановим синім) продемонстрували, що присутність L-фенілаланіну у культуральному середовищі в значній мірі запобігає ушкодженню та загибелі клітин в умовах КГД. Через 1 годину рівень ферменту у культуральному середовищі зрізів, які знаходились в умовах КГД, становив  $10,0 \pm 2,9$  % ( $2,7 \pm 0,7$  % у контролі), а через 4 години –  $25,8 \pm 4,4$  % (у контролі цей показник був  $3,5 \pm 0,5$  %). В присутності L-фенілаланіну показники вмісту ЛДГ у культуральному середовищі були значно меншими -  $5,5 \pm 2,1$ % та  $14,6 \pm 2,4$ % відповідно ( $p < 0,01$ ) (Рис. 3.).

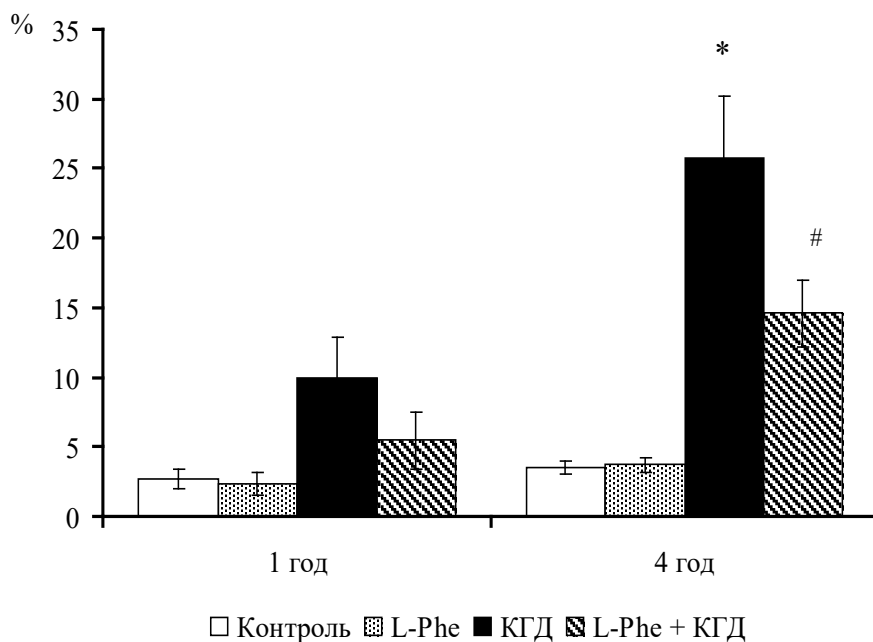


Рисунок 3. Відносна кількість ферменту ЛДГ в культуральному середовищі органотипових зрізів гіпокампу при дії L-фенілаланіну в нормальних умовах та після КГД (10 хв.) і реоксигенації (1 та 4 год.).

В результаті оцінки життєздатності нейронів СА1 зони органотипової культури гіпокампа при забарвленні трипановим синім виявлено, що у контрольних зрізах їх кількість була незначною та становила  $1,3 \pm 0,4$ . Через 4 години після 10-хвилинної КГД цей показник збільшувався до  $28,9 \pm 2,7$  ( $p < 0,001$ ). У присутності в середовищі 100 мкМ L-фенілаланіну, кількість СА1 нейронів, забарвлених трипановим синім в умовах КГД, було значно меншою -  $15,3 \pm 2,0$  ( $p < 0,001$ ).

Мікроскопічний аналіз напівтонких зрізів органотипових культур гіпокампу при дії L-фенілаланіну виявив позитивні зміни у співвідношенні нормальних, конденсованих та набряклих клітин у СА1 зоні культивованих зрізів в умовах КГД[7]. Показано, що за першу годину після 10 хв КГД кількість нормальних СА1 нейронів становила  $79,6 \pm 0,3$  відносно загальної кількості клітин у зоні підрахунку ( $97,4 \pm 0,9$  у контролі,  $p < 0,001$ ), кількість конденсованих клітин збільшувалася з  $2,7 \pm 0,9$  у контролі до  $18,0 \pm 0,3$  після

КГД ( $p < 0,001$ ), з'являлася незначна кількість набряклих клітин. Після 4 годин зміни у співвідношенні різних типів клітин були ще більш виражені:  $25,5 \pm 3,6$  - нормальні ( $p < 0,001$ ),  $58,8 \pm 1,6$  - конденсовані ( $p < 0,001$ ) та  $15,7 \pm 1,6$  – набряклі ( $p < 0,01$ ) CA1 нейрони.

Для виявлення можливих механізмів дії L-фенілаланіну в умовах КГД, було співставлено результати впливу L-фенілаланіну, отримані при КГД з результатами його впливу при дії глутамату, припускаючи, що при розвитку ушкодження в умовах КГД L-фенілаланін може діяти на глутаматну ланку [8]. Виходячи з даних літератури та на основі емпірично-підібраної концентрації глутамату, яка здійснювала на органотипову культуру гіпокампу ушкодження, адекватне тому, що ми спостерігали при КГД та маючи намір виявити ефекти L-фенілаланіну в умовах глутамату, ми провели дослідження по такій схемі: 1) L-фенілаланін у концентрації 100 мкМ додавали до культурального середовища на 30 хвилин; 2) 500 мкМ глутамату вносили у середовище на 30 хвилин; 3) повернення зрізів до культурального середовища, яке містило 100 мкМ L-фенілаланіну; 4) фіксування органотипової культури через 1 і 4 години; 5) морфологічний аналіз культивованих зрізів [9]. Показано, що протягом першої години після вилучення глутамату присутність L-фенілаланіну призводить до того, що кількість неушкоджених нейронів стає більшою ( $72,1 \pm 3,3$  ( $p < 0,001$ )) на 31 %, а конденсованих меншою ( $27,9 \pm 3,3$  ( $p < 0,001$ )) на 48 %, по відношенню до дії глутамату. У 4-годинний термін L-фенілаланін продемонстрував ще більш виражений ефект: нормальних нейронів  $56,6 \pm 6,6$  ( $p < 0,01$ ); конденсованих -  $43,4 \pm 6,6$  ( $p < 0,05$ ), на 85 та 48 % відповідно у порівнянні з дією глутамату.

Таким чином, аналіз впливу L-фенілаланіну на морфофункціональний стан культивованих зрізів гіпокампу в умовах експериментально викликаного ішемії показав, що L-фенілаланін має нейропротекторну дію, яка здійснюється через антиглутаматні та антиоксидантні механізми. Ці результати припускають потенційну можливість використання



ароматичних амінокислот у медичній практиці з метою запобігання ішемічних ушкоджень мозку [10].

**Висновки:**

1. На підставі аналізу морфофункціональних змін нервових клітин гіпокампу в умовах киснево-глюкозної депривації встановлено залежність життєздатності нейронів від тривалості депривації та часу з моменту її припинення.

2. З'ясовано, що короткотривала киснево-глюкозна депривація є найбільш слушною для вивчення особливостей і механізмів ішемічного ушкодження нервової тканини та для виявлення нейропротекторної дії L-фенілаланіну.

3. Встановлено, що в умовах експериментальної ішемії клітин гіпокампу, L-фенілаланін здійснює нейропротекторну дію шляхом конкурентного зв'язування з глутаматними рецепторами та завдяки антиоксидантним властивостям.

Список літератури.

1. Антиоксидантная терапия при ишемическом инсульте / В. А.Яворская, О. Б. Бондарь, Е. А. Ибрагимова [и др.] // Міжнар. неврол. журн. – 2010. – № 3 (33). – С. 105–111.
2. Смирнов В. А. Аминокислоты и полипептиды: учеб. пособ. Ч. I. / В. А. Смирнов, Ю. Н. Климочкин – Самара. Самар. гос. техн. ун-т.,–2007. – 110 с.
3. І.С. Зозуля, В.І. Боброва. Інтенсивна терапія гострого мозкового інсульту в умовах спеціалізованого відділення // Острые и неотложные состояния в практике врача, 2006. — №2(2).
4. Turski L., Huth A., Sheardown M. et al. ZK200775: a phosphonate quinoxalinedione AMPA antagonist for neuroprotection in stroke and trauma // Proc. Natl .Acad. Sci. USA. – 1998. - Vol. 95, № 18. – P. 10960-5.

5. Tietjen G.E., Dombi T., Pulsinelli W.A. et al. A double-blind, safety and tolerance study of single intravenous doses of fosphenytoin in patients with acute ischemic stroke // *Neurology*. – 1996. - Vol. 46. – P. 424.
6. Яворська В. О. Специфічне лікування ішемічного інсульту: нейропротекція [Електронний ресурс] / В. О. Яворська, Ю. В. Фломін // *Международ. невролог. журн.* – 2010. – № 6 (36). – Режим доступа: <http://www.mif-ua.com/archive/article/14305>.
7. Advances in stroke neuroprotection: hyperoxia and beyond / A. B. Singhal, E. H. Lo, T. Dalkara [et al.] // *Neuroimaging. Clin. North. Am.* – 2005. – Vol. 15. – P. 697–720.
8. Allan S. M. Cortical cell death induced by IL-1 is mediated via actions in the hypothalamus of the rat / S. M. Allan, L. C. Parker, B. Collins // *Proc. Natl. Sci. USA*. – 2001. – Vol. 97. – P. 5580–5585.
9. Atkinson D. E. Citrate and citrate cycle in regulation of energy metabolism / D. E. Atkinson // *The metabolic roles of citrate*. – London ; New York, 1968. – P. 23–40.
10. Bradykinin postconditioning protects pyramidal CA1 neurons against delayed neuronal death in rat hippocampus / V. Danielisova, M. Gottlieb, M. Nemethova [et al.] // *Cell Mol. Neurobiol.* – 2009. – Vol. 29. – P. 871–878.