МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНІЙ УНІВЕРСИТЕТ ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

 Факультет Хімічних та біофармацевтичних технологій

 (повна назва факультету)

 Кафедра\_\_\_\_\_\_\_\_\_Промислової фармації\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

 (повна назва кафедри)

РЕФЕРАТ

до дипломної магістерської роботи (проєкту)

на тему

«Дослідження активності L- фенілаланіну в якості перспективного нейропротектора»

Виконав студент групи \_\_\_МгЗХФ-19\_\_\_

спеціальності

\_\_\_226 Фармація, промислова фармація\_\_

 (шифр і назва спеціальності)

\_\_\_Пономаренко Наталія Олександрівна\_\_

 (прізвище та ініціали)

Керівник\_\_\_\_Кулик В.Б.\_\_\_\_

 (прізвище та ініціали)

Рецензент Нікітіна О.О.\_\_\_

 (прізвище та ініціали)

Київ – 2020 рік

**Актуальність теми.**

Найбільш перспективними у розробці нових нейропротекторів, на теперешній час, вважаються речовини, які впливають на динаміку ураження декількома шляхами. Зокрема, відомо про множинність дії ароматичних амінокислот, і саме, L-фенілаланіну. Електрофізіологічі дослідження, проведені на дисоційованих культурах гіпокампу показали, що в ішемічних умовах L-фенілаланін здатен послаблювати вивільнення глутамату, бути конкурентним антагоністом глутаматних рецепторів та, припустимо, має антиоксидантні властивості. Однак невідомо, як L-фенілаланін впливає на морфо-функціональний стан нейронів в умовах ішемічного ушкодження, що створюють потребу додаткового вивчення дії L-фенілаланіну.

 Адекватною моделлю для вивчення механізмів нейропротекторних властивостей L-фенілаланіну є органотипова культура гіпокампу. На відміну від дисоційованих, тканинні органотипові культури зберігають характерну для нервової системи архітектоніку та організацію міжнейронних зв’язків, та є найбільш наближеними до умов організму .

Вивчення дії L-фенілаланіну в умовах моделювання ішемічного пошкодження мозку на органотиповій культурі гіпокампу становить великий інтерес у пошуку нових засобів для його можливого застосування в медичній практиці.

Мета дослідження. розробити модель ішемічного ушкодження мозку in vitro та виявити нейропротекторну дію L-фенілаланіну в цих умовах.

**Завдання дослідження**

1. Одержати органотипову культуру гіпокампу та охарактеризувати її життєздатність та морфологічний стан;
2. Розробити модель ішемічного ушкодження мозку на органотиповій культурі гіпокампу та визначити критерії її оцінки;
3. Вивчити деякі механізми, які задіяні у розвитку ішемічного ушкодження мозку на органотиповій культурі гіпокампу;
4. Вивчити дію L-фенілаланіну при моделюванні ішемічного ушкодження мозку;
5. Вивчити окремі механізми дії L-фенілаланіну при моделюванні ішемічного ушкодження на органотиповій культурі гіпокампу.

**Об’єкт дослідження** – культивовані зрізи гіпокампу щурів (органотипова культура). Для одержання культур використовувались семиденні щури лінії Вістар.

**Предмет дослідження** – Морфо-функціональний стан культивованих зрізів гіпокампу, які вирощувалися за методом Stoppini.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше проведено комплексні дослідження по вивченню морфо-функціонального стану культивованих зрізів гіпокампу при КГД різної тривалості.

Розроблена система оцінки морфо-функціонального стану культивованих зрізів гіпокампу за характеристикою їх життєздатності (вимірювання кількості цитозольного ферменту лактатдегідрогенази, визначення концентрації малонового діальдегіду в культуральному середовищі, забарвлення клітин вітальним барвником трипановим синім) та морфологічного аналізу органотипової культури гіпокампу.

Вперше запропоновано можливість застосування моделі короткотривалої КГД на органотиповій культурі гіпокампу для вивчення механізмів нейропротекторних властивостей хімічних речовин.

Вперше виявлено протекторний вплив ароматичної амінокислоти L-фенілаланіну в дослідах на органотиповій культурі гіпокампу в умовах КГД.

Вперше показано, що в умовах короткотривалої КГД на моделі органотипової культури гіпокампу у пошкодженні клітин задіяні вільно-радикальні механізми, а механізм протективного впливу L-фенілаланіну пов’язаний з його антиоксидантною дією.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати дослідження мають фундаментальне значення для поглиблення відомостей про ішемічне ушкодження мозку. В прикладному аспекті одержані дані вказують на наявність нейропротекторних властивостей у L-фенілаланіну, розширюють уяву про механізми його дії на клітини гіпокампу та припускають потенційну можливість використання ароматичних амінокислот у медичній практиці з метою запобігання ішемічних ушкоджень мозку.

**Матеріали і методи дослідження.** Для отримання зрізів гіпокампу використовували щурів 7-денного віку.

Для моделювання ішемічних умов використовували киснево-глюкозну депривацію (КГД), яка створювалась у спеціальній камері. Після необхідного періоду КГД (10, 30 та 60 хвилин) зрізи поверталися до нормальних умов культивування в середовище для експерименту на 1, 4 або 24 години (нормоксична реоксигенація).

Загальну життєздатність культивованих зрізів гіпокмапу оцінювали за зміною кількості лактат-дегідрогенази (ЛДГ) у культуральному середовищі колориметричним методом. Життєздатність нейронів СА1 зони гіпокампу оцінювали за методом виключення вітального барвника трипанового синього.

Активність перекисного окислення ліпідів оцінювали по накопиченню в культуральному середовищі одного з його кінцевих продуктів – малонового діальдегіду (МДА) – колориметричним методом в мікромодифікації.

Для морфологічної оцінки культивовані зрізи, зафіксовані у суміші 2,5% формальдегіду та 2,5% глютаральдегіду, заключали у епоксидну смолу за загальноприйнятою методикою. Напівтонкі зрізи забарвлювали метиленовим синім.

Статистичну обробку даних проводили за t-критерієм Стьюдента. Представлені дані є результатом, що найменше, трьох незалежних експериментів, з врахуванням даних по 3-4 зрізам в кожному.

**Результати дослідження.**

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 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. Протягом 4 та 24 годин розвивалося ушкодження і рівень ЛДГ досягав 32,1±8,2 % (р<0,05) та 60,1±1,5 % (p<0,001), відповідно. Вплив 30- та 60-хвилинної КГД проявлявся вже протягом першої години. Рівень ЛДГ складав 45,4±9,6 % (p<0,01) і 62,1±9,9 % (p<0,01), відповідно. Через 4 та 24 години показники кількості ферменту значно збільшувалися: до 60,8±12,4 і 90,5±1,9 % (p<0,001) після 30-хв КГД; та до 64,2±8,7 і 98,6±1,4 % (p<0,001) після 60-хв.

Аналогічні тенденції мали і результати підрахунку числа ушкоджених нейронів СА1 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.

При морфологічному аналізі контрольних зрізів СА1 зону гіпокампу складали неушкоджені клітини. Через одну годину після проведеної 10-хвилинної КГД нами виявлена наявність ушкоджених СА1 нейронів: приблизно 20 % від загальної кількості нейронів – конденсованих, та незначна кількість набряклих. Через чотири години - кількість ушкоджених клітин досягала 75 %. Треба відмітити, що в умовах, використаної нами моделі переважна кількість ушкоджених клітин була конденсованими. Оцінка забарвлених трипановим синім СА1 нейронів, 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 СА1 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.

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 (Sullivan B.L., 2002; Nikonenko I., 2003 Jones P.A., 2004; Woo R.S., 2002). 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. Механізм дії лазароїдів пояснюється перешкоджанням окисненню полієнових ліпідів мембран, подібно до природного антиоксиданту α-токоферола. Лазароїди мають великий мембрано-стабілізуючий ефект, завдяки власній високій спорідненості до ліпідного бішару та здатності вбудовуватись у клітинну мембрану, знижуючи тим самим її плинність. За літературними даними U-74389G використовувався на моделях нейронального ушкодження in vitro з метою інгібування процесів перекисного окиснення ліпідів. В наших дослідженнях МК-801 (10 мкМ) та U-74389G (25 мкМ) додавалися до культурального середовища за 30 хвилин до КГД. Оцінка життєздатності проводилась через 4 години після 10 хвилинної КГД.

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

Аналогічні тенденції мали результати обчислення СА1 нейронів, забарвлених трипановим синім та визначення в культуральному середовищі МДА. Дані результати свідчать, що глутамат і вільні радикали задіяні у пошкодження клітин в умовах нашої моделі.

Для вивчення нейропротекторної дії L-фенілаланіну використовувалась наступна схема: 1) внесення L-фенілаланіну в концентрації 100 мкМ до культурального середовища за 30 хвилин до КГД; 2) 10 хвилинна КГД; 3) повернення зрізів до культурального середовища з 100 мкМ L-фенілаланіну; 4) морфо-функціональна оцінка зрізів (ЛДГ, трипановий синій, морфологія) через 1 та 4 години.

Результати оцінки життєздатності культивованих зрізів гіпокампу (за даними ЛДГ) та зокрема СА1 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. У контролі кількість ЛДГ була незначною. Через 1 годину рівень ферменту у культуральному середовищі зрізів, які знаходились в умовах КГД, становив 10,0±2,9 % (2,7±0,7 % у контролі), а через 4 години – 25,8±4,4 % (у контролі цей показник був 3,5±0,5 %). В присутності L-фенілаланіну показники вмісту ЛДГ у культуральному середовищі були значно меншими - 5,5±2,1% та 14,6±2,4% відповідно (p<0,01).

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±0,4. Через 4 години після 10-хвилинної КГД цей показник збільшувався до 28,9±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±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. Показано, що за першу годину після 10 хв. КГД кількість нормальних СА1 нейронів становила 79,6±0,3 відносно загальної кількості клітин у зоні підрахунку (97,4±0,9 у контролі, р<0,001), кількість конденсованих клітин збільшувалася з 2,7±0,9 у контролі до 18,0±0,3 після КГД (р<0,001), з’являлася незначна кількість набряклих клітин. Після 4 годин зміни у співвідношенні різних типів клітин були ще більш виражені: 25,5±3,6 - нормальні (р<0,001), 58,8±1,6 - конденсовані (р<0,001) та 15,7±1,6 – набряклі (р<0,01) СА1 нейрони.

Обробка культур L-фенілаланіном за 30 хв. до КГД призвела до того, що після 1 години реоксигенації неушкоджених, нормальних нейронів виявляється більше - 88,1±1,6 (p<0,001); а ушкоджених (конденсованих і набряклих) менше – 10,4±1,1 (p<0,001) та 1,6±0,8 (p<0,01).

Нейропротекторний вплив L-фенілаланіну виявлений також при додаванні його у середовище на різних стадіях ушкодження. Показано, що L-фенілаланін, внесений у середовище культивування під час КГД та відразу після 10 хв. КГД, проявляє протективну властивість.

Пошкодженні клітин в умовах нашої моделі задіяний не тільки глутамат, а й вільні радикали. З літератури відомо, що L-фенілаланін має, крім антиглутаматних, антиоксидантні властивості. З цією метою нами проводилася оцінка рівня перекисного окиснення ліпідів за даними кількості малонового диальдегіду у культуральному середовищі при дії L-фенілаланіну в нормі та в умовах КГД. Рівень МДА в контролі дорівнював 12,8±0,8 одиниць екстинції. Після КГД та 4-х годин реоксигенації цей параметр зростав до 47,6±5,9 (p<0,001). Присутність L-фенілаланіну у культуральному середовищі в умовах КГД запобігало підвищенню перекисного окиснення ліпідів, а рівень МДА був меншим 32,6±2,4 (p<0,05).

Отже механізм протективної впливу L-фенілаланіну в певній мірі пов’язаний з його антиоксидантною дією.

Таким чином, аналіз впливу L-фенілаланіну на морфо-функціональний стан культивованих зрізів гіпокампу в умовах експериментально викликаної 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.

**Висновки.**

В магістерській роботі короткотривала киснево-глюкозна депривація була використана для моделювання ішемічного ушкодження мозку на органотиповій культурі гіпокампа. Ця модель застосовувалась для дослідження особливостей розвитку та механізмів ураження нервових клітин, а також для тестування нейропротекторних властивостей L-фенілаланіну.

На підставі аналізу морфо-функціональних змін нервових клітин органотипової культури гіпокампу в умовах киснево-глюкозної депривації за допомогою оцінки життєздатності зрізів (за рівнем цитозольного ферменту лактат-дегідрогенази у культуральному середовищі та забарвленням зрізів трипановим синім) та морфологічних змін СА1 нейронів гіпокампу (світлова мікроскопія) встановлено залежність життєздатності нейронів культивованих зрізів гіпокампу від тривалості киснево-глюкозної депривації та часу, що минає з моменту її припинення.

З’ясовано, що короткотривала (10 хвилин) киснево-глюкозна депривація є найбільш слушною для вивчення особливостей і механізмів ішемічного ушкодження нервової тканини при дефіциті кисню і глюкози та для виявлення нейропротекторної дії L-фенілаланіну.

Показано, що L-фенілаланін, у використаній концентрації, має виражену нейропротекторну дію в умовах моделювання ішемічного ушкодження на органотиповій культурі гіпокампу при додаванні його як за 30 хвилин до киснево-глюкозної депривації, так і при його введенні у культуральне середовище під час або відразу після киснево-глюкозної депривації.

Встановлено, що в умовах киснево-глюкозної депривації L-фенілаланін здійснює свій нейропротекторний вплив, частково через конкурентне зв’язування глутаматних рецепторів, а частково завдяки антиоксидантним властивостям.

**Рекомендації щодо використання одержаних результатів.**

Дипломна магістерська робота (проект) складається із вступу, чотирьох розділів і загальних висновків та списку використаних джерел. Загальний обсяг магістерської роботи (проекту) містить 109 сторінок комп’ютерного тексту, 27 рисунків. Список використаних джерел становить 159 найменувань.

**Апробація результатів дослідження та публікації.**

Основні результати дипломної магістерської роботи:

- опубліковані у статті Пономаренко Н.О. , Кулик В.Б. «ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ L-ФЕНІЛАЛАНІНУ В ЯКОСТІ ПЕРСПЕКТИВНОГО НЕЙРОПРОТЕКТОРА»/ Збірник наукових праць «Фізико-органічна хімія, фармакологія та фармацевтична технологія біологічно активних речовин» [Стаття прийнята до друку]

**Ключові слова:** киснево-глюкозна депривація, культивовані зрізи гіпокампу, L-фенілаланін.