

Пронин А.В.<sup>1</sup>, Громова О.А.<sup>1,2</sup>, Торшин И.Ю.<sup>2</sup>, Стельмашук Е.В.<sup>3</sup>, Александрова О.П.<sup>3</sup>, Генрихс Е.Е.<sup>3</sup>, Хаспеков Л.Г.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия», Иваново, Россия; <sup>2</sup>ФГБУ «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» РАН, Москва, Россия;

<sup>3</sup>ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

<sup>1</sup>153000, Иваново, Шереметевский пр., 8; <sup>2</sup>119333, Москва, ул. Вавилова, 40; <sup>3</sup>125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80

## О нейропротективных свойствах солей лития в условиях глутаматного стресса

Органические соли лития — перспективное направление поиска эффективных и безопасных нейропротекторов. На моделях хронической двусторонней окклюзии общих сонных артерий ранее нами установлено, что глюконат лития и цитрат лития являются эффективными средствами профилактики неврологического дефицита при ишемических или нейродегенеративных повреждениях головного мозга. Применение органических солей лития при ишемическом повреждении мозга приводит к таргетному накоплению его в лобных долях головного мозга и спинномозговой жидкости, нормализует элементный гомеостаз мозга.

**Цель исследования** — сравнение нейропротекторных эффектов хлорида, карбоната, аскорбата и цитрата лития.

**Материал и методы.** Проведено нейроцитологическое исследование на модели глутаматного стресса в культурах зернистых нейронов (КЗН). Состояние КЗН контролировали ежедневно и на каждом этапе эксперимента путем просмотра в инвертированном микроскопе при фазовом контрасте. Конечные концентрации исследуемых веществ в среде культивирования составили 0,1; 0,2; 0,5; 1 мМ. Количественную оценку выживаемости КЗН проводили с помощью прямого подсчета нейронов с неизменной морфологией в 5 полях зрения. Для каждого вещества было выполнено 5 экспериментов. Количество нейронов с неизменной морфологией в контрольных культурах принимали за 100% выживаемости.

**Результаты.** В исследованном диапазоне концентраций хлорид лития и карбонат лития не проявляли достоверных нейропротективных свойств. Аскорбат лития и цитрат лития, напротив, достоверно повышали выживаемость нейронов в условиях слабого, умеренного и сильного глутаматного стресса. В концентрации 0,2 мМ цитрат лития увеличивал выживаемость КЗН в среднем на 30% ( $p < 0,003$ ). Показано, что действующими нейропротективными началами цитрата лития являются ион лития, и цитрат-анион. Эти положительные качества исследованных органических солей лития объясняются прежде всего тем, что аскорбат- и цитрат-анионы способствуют усилению транспорта ионов лития внутрь клеток посредством соответствующих ионных каналов для транспорта органических кислот (SLC13A5 и др.).

**Заключение.** Подтверждено непосредственное нейропротективное действие аскорбата лития и цитрата лития, оказываемое на КЗН мозжечка. При обработке КЗН цитратом лития выживаемость клеток в условиях глутаматного стресса повышалась на 30%.

**Ключевые слова:** нейропротекция; нейроцитология; соли лития.

**Контакты:** Ольга Алексеевна Громова; [unesco.gromova@gmail.com](mailto:unesco.gromova@gmail.com)

**Для ссылки:** Пронин АВ, Громова ОА, Торшин ИЮ и др. О нейропротективных свойствах солей лития в условиях глутаматного стресса. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2017;9(3):111–119.

### *Neuroprotective properties of lithium salts during glutamate-induced stress*

*Pronin A.V.<sup>1</sup>, Gromova O.A.<sup>1</sup>, Torshin I.Yu.<sup>2</sup>, Stelmashuk E.V.<sup>3</sup>, Aleksandrova O.P.<sup>3</sup>, Genrikhs E.E.<sup>3</sup>, Khaspekov L.G.<sup>3</sup>*

*<sup>1</sup>Ivanovo State Medical Academy, Ivanovo, Russia; <sup>2</sup>Federal Research Center «Informatics and Control», Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; <sup>3</sup>Research Center of Neurology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*<sup>1</sup>8, Sheremetevsky Pr., Ivanovo 153000; <sup>2</sup>40, Vavilov St., Moscow 119333; <sup>3</sup>80, Volokolamskoe Shosse, Moscow 125367*

Organic lithium salts are a promising area for searching for effective and safe neuroprotective drugs. By using chronic bilateral common carotid artery occlusion models, the authors have previously found that lithium gluconate and lithium citrate are effective agents to prevent a neurological deficit in brain ischemic or neurodegenerative damages. The use of organic lithium salts in brain ischemia leads to their targeted accumulation in the frontal lobes of the brain and in the cerebrospinal fluid, normalizing trace elemental homeostasis in the brain

**Objective:** to compare the neuroprotective effects of different lithium salts (chloride, carbonate, ascorbate, and citrate).

**Material and methods.** A neurocytological study was performed using a glutamate-induced stress model in cultured granular neurons (CGNs). The state of CGNs was monitored daily and at each experimental stage, by viewing in an inverted phase contrast microscope. The final concentrations of the test substances in the culture medium were 0.1, 0.2, and 0.5, and 1 mM. The survival of CGNs was quantified by directly counting the neurons with intact morphology in 5 fields of vision. Five experiments were carried out for each substance. The number of neurons with intact morphology in the control cultures was taken as 100% survival.

**Results.** Lithium chloride and lithium carbonate in the studied range of concentrations did not show significant neuroprotective properties. Lithium ascorbate and lithium citrate, on the contrary, significantly increased the survival of neurons in mild, moderate and severe glutamate-induced stress. Lithium citrate at a concentration of 0.2 mM increased the survival rate of CGNs by an average of 30% ( $p < 0.003$ ). The active neuroprotective principles of lithium citrate were shown to be both lithium ion and citrate anion. These positive qualities of the test organic lithium salts are explained primarily by the fact that ascorbate and citrate anions contribute to the enhanced transport of lithium ions into the cells

through appropriate ion channels for the transport of organic acids (SLC13A5, etc.).

**Conclusion.** Lithium ascorbate and lithium citrate were confirmed to have an immediate neuroprotective effect on cerebellar CGNs. Treatment of CGNs with lithium citrate showed a 30% increase in cell survival during glutamate-induced stress.

**Keywords:** neuroprotection; neurocytology; lithium salts.

**Contact:** Olga Alekseevna Gromova; unesco.gromova@gmail.com

**For reference:** Pronin AV, Gromova OA, Torshin IYu, et al. Neuroprotective properties of lithium salts during glutamate-induced stress. *Nevrologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika = Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics.* 2017;9(3):111–119.

**DOI:** <http://dx.doi.org/10.14412/2074-2711-2017-3-111-119>

Новым актуальным направлением в создании нейропротективных препаратов является использование низко-кисичных солей лития с органическими анионами. Потенциал применения препаратов на основе органических солей лития в неврологии обусловлен прежде всего нейропротективными и нейротрофическими эффектами иона лития и преимущественной компартиментализацией лития в головном мозге (в лобной доле и др.) [1].

Эффекты ионов лития проявляются путем активации нейропротективных и нейротрофических клеточных каскадов, в частности ингибирования киназы гликоген синтетазы 3β (GSK3β) и инозитол монофосфатазы (IMPA1). GSK3β – негативный регулятор каскада Wnt, который необходим для роста аксонов. Ингибирование GSK3β литием способствует активации нейротрофического каскада Wnt и ускоряет дифференциацию нейрональных клеток-предшественников [2], стимулирует дифференциацию астроцитов и синтез миелина [3], поддерживает выживание нейронов, экспрессию нейротрофических факторов и др. [4–7].

Фермент GSK3β (ген GSK3β) непосредственно ингибируется ионами лития [8], что является одним из основных механизмов осуществления фармакологических эффектов препаратов лития. GSK3β фосфорилирует более 40 белков, среди которых бета-катенин, аксины (модулируют взаимодействия бета-катенина [6]), сигнальные белки MAP1B, MAP2, CREB, фактор ответа на гипоксию HIF1, тау-белок, субстрат рецептора инсулина (IRS1), основной белок миелина, фактор роста нервов (NGF), рецептор провоспалительного фактора транскрипции NF-κB (p65 и p105), сигнальный белок Notch [7].

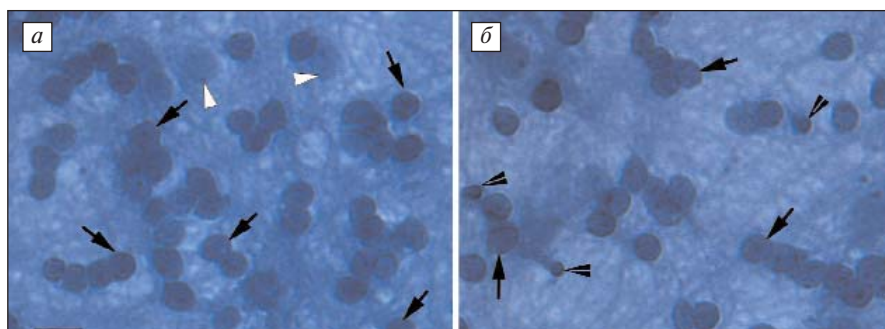
Попадая внутрь нейронов, ионы лития ингибируют GSK3β посредством конкурентного вытеснения ионов магния [9], причем данный эффект характерен исключительно для ионов лития и не наблюдается для ионов других щелочных металлов (натрий, калий, цезий, рубидий). Систематический анализ координационной химии ионов лития и магния в активных центрах целевых белков иона лития показал, что уникальные конфигурации активных центров ферментов GSK3β и IMPA1 гарантируют ионом лития ингибирование именно этих, а не других (зависимых от ионов магния) ферментов [10].

Для осуществления фармакологических эффектов иона лития последний должен попадать в клетку в концентрациях, достаточных для ингибирования целевых белков

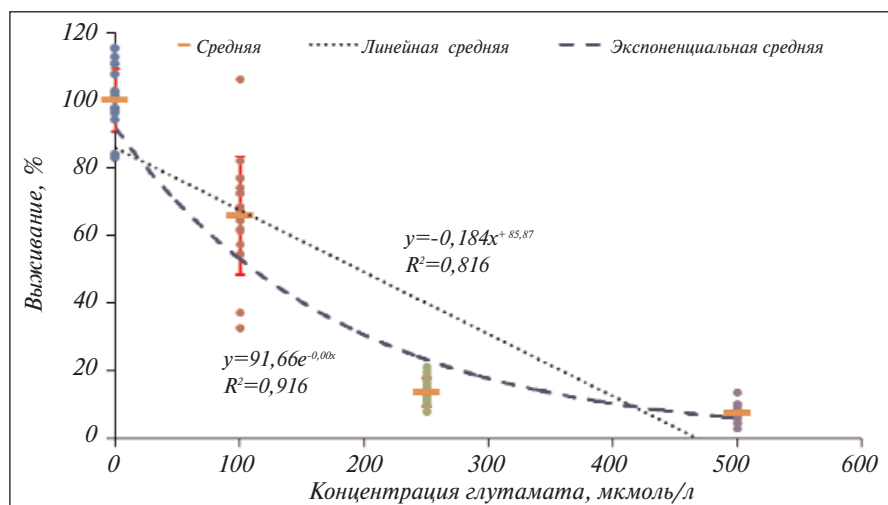
GSK3β и IMPA1. Очевидно, что внутриклеточные концентрации лития зависят не только от его внеклеточного уровня, но и от эффективности транспорта ионов лития внутрь клетки. Эффективность транспорта ионов металлов определяется, в частности, анионом соли [11].

Подавляющее большинство экспериментальных и клинических исследований нейропротективных эффектов лития проведено с использованием неорганических солей лития. Так, экспериментальные исследования выполняют, как правило, с использованием хлорида лития в концентрациях 1 мМ и выше. Клинические исследования проводятся с использованием карбоната лития, причем терапевтические концентрации ионов лития в плазме крови также составляют около 1 мМ [5].

В то же время при ишемическом повреждении мозга нейропротективный эффект определенных органических солей лития (цитрата лития, глюконата лития и др.) проявляется при весьма умеренных дозах (30–100 мкг/кг), что соответствует гораздо более низким концентрациям ионов лития в плазме крови (0,01–0,1 мМ). На моделях хронической двусторонней окклюзии общих сонных артерий нами было установлено, что глюконат лития и цитрат лития являются эффективными средствами профилактики неврологического дефицита при ишемических или нейродегенеративных повреждениях головного мозга [5, 12]. Применение органических солей лития при ишемическом повреждении мозга приводит к целевому накоплению его в лобных долях головного мозга и спинномозговой жидкости, нормализует элементный гомеостаз мозга [12]. Эти результаты позволяют предположить, что эффективность органических солей лития в более низких концентрациях связана именно с анионами используемых солей.



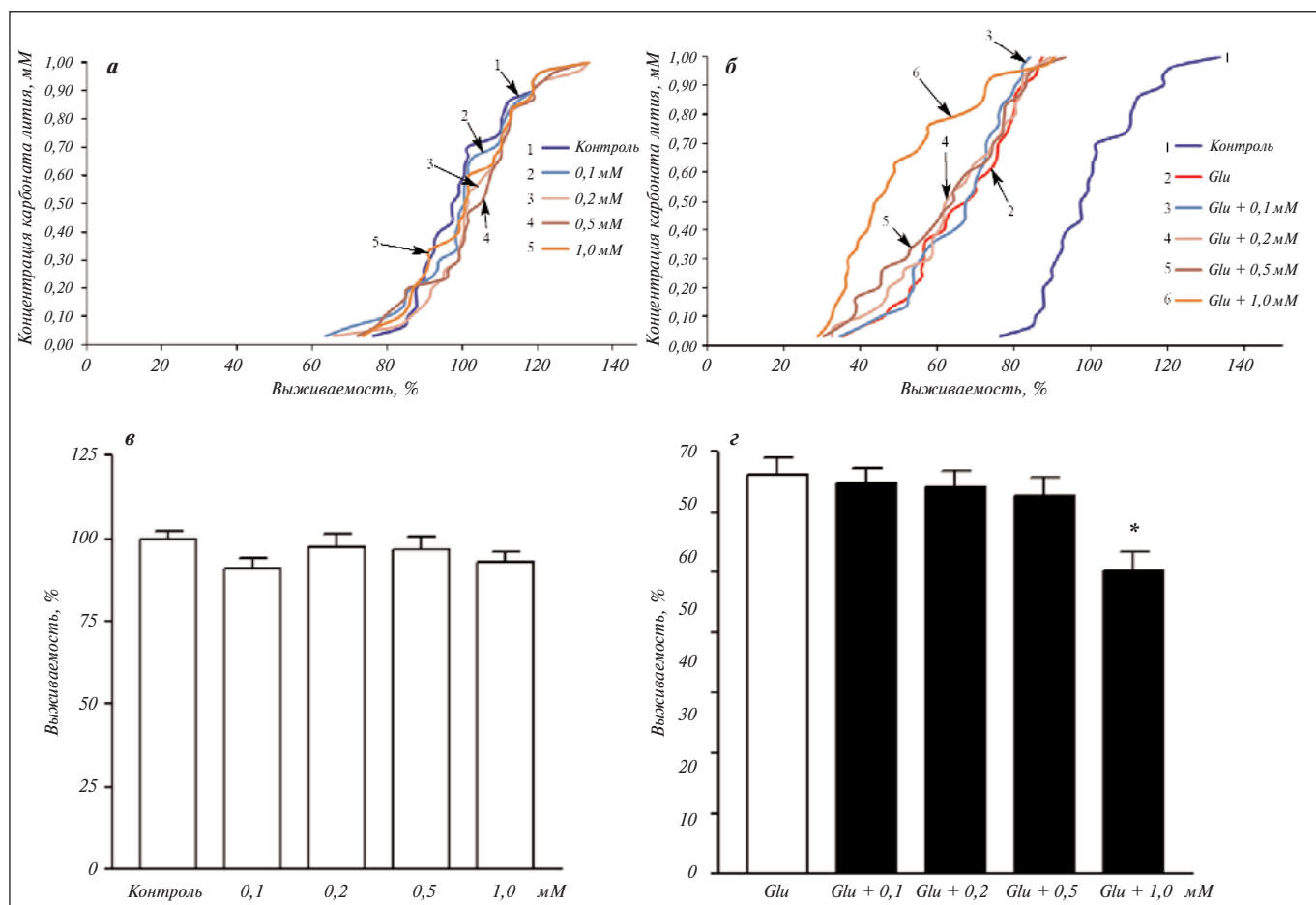
**Рис. 1.** Первичная диссоциированная фиксированная культура клеток мозжечка, окрашенная трипановым синим: контроль (а) и обработка в течение 24 ч глутаматом (б). Черные стрелки – зернистые нейроны с нормальной морфологией, белые стрелки – ядра глиальных клеток, черные короткие стрелки – пикнотические ядра погибших нейронов. Масштаб – 15 мкм



**Рис. 2.** Выбор концентраций глутамата. Точки – результаты экспериментов, жирные горизонтальные линии – количество клеток (в % от контроля, средние значения), выживших при данной концентрации глутамата. Прерывистые линии – результаты линейной и экспоненциальной аппроксимации экспериментальных данных.  $R^2$  – квадрат коэффициента корреляции

**Цель** настоящей работы – сравнительное исследование воздействия солей лития с различными анионами на нейропротекцию. В настоящей работе продемонстрированы результаты экспериментальной валидации прямого нейропротективного влияния различных солей лития на культивированные зернистые нейроны (КЗН) мозжечка. Исследованы эффекты четырех солей: двух неорганических (карбонат лития, хлорид лития) и двух органических (аскорбат лития, цитрат лития).

**Материал и методы.** В работе использовали 7–8-суточные культуры, полученные методом ферментно-механической диссоциации клеток мозжечка 7-дневных крыс по ранее описанной методике [13]. Культивирование проводили в 96-луночных пластиковых планшетах в течение 7 дней в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе, запол-



**Рис. 3.** Выживаемость КЗН при различных концентрациях карбоната лития. ЭФР значений выживаемости: без добавления глутамата – Glu (холостой эксперимент; а) и в условиях глутаматного стресса (100 мкМ глутамата; б). Анализ выживаемости КЗН с использованием теста Данна (в, г): белые столбики – в отсутствие глутамата, черные – при добавлении глутамата (здесь и на рис. 5). Количество просчитанных полей зрения – 15–30; \* –  $p < 0,01$  при добавлении 100 мкМ глутамата по сравнению с действием глутамата без добавок

ненном газовой смеси (95% воздуха + 5% CO<sub>2</sub>), при температуре 35,5 °С и относительной влажности 98%. К этому сроку КЗН достигают морфологической и нейрохимической зрелости.

Растворы солей лития готовили из сухих безводных солей. Использовали неорганические соли лития: Lithium carbonate (Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), 1.05671.1000, сертификаты Ph Eur, BP, USP; Lithium chloride (LiCl), 1.05679.0100, сертификаты Reag. Ph Eur (Merck, Германия) и органические соли лития: аскорбат лития (LiC<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>6</sub>; ООО «Нормофарм», Россия) и цитрат лития (Li<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>). Высокоочищенные формы цитрата лития и цитрата натрия с рекордно низким содержанием примесей были синтезированы в ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» МЗ РФ.

Сухие соли растворяли в деионизованной воде в концентрации 10 мМ, затем стерилизовали ультрафильтрацией и добавляли в среду культивирования на 2-е сутки *in vitro* на весь срок культивирования (до 7 сут).

Состояние культур контролировали ежедневно и на каждом этапе эксперимента путем просмотра в инвертированном микроскопе при фазовом контрасте. Конечные концентрации исследуемых веществ в среде культивирования составили 0,1; 0,2; 0,5; 1 мМ. Использовали стандартную, описанную ранее схему экспериментов [14]. Глутамат натрия (L-Glutamic acid monosodium salt 99–100%, Sigma, USA, N.G-1626) добавляли к культурам в трех различных концентрациях (50, 100 и 150 мкМ) для определения среднего токсического эффекта. Выживаемость КЗН при нейротоксическом действии глутамата должна составлять 30–70% контрольной, принимаемой за 100%, чтобы была возможность оценить нейропротективные свойства исследуемых веществ.

Количественную оценку выживаемости клеток проводили с помощью прямого подсчета нейронов с неизменной морфологией в 5 полях зрения [15]. Такой подсчет дает адекватное представление о выживаемости нейронов по всему диаметру 96-луночного планшета. Были выбраны следующие концентрации солей лития: 0,1; 0,2; 0,5; 1 мМ. Клетки-зерна легко идентифицировать прижизненно как небольшие, 7–10 мкм в диаметре, округлые или овальные нейроны. При окраске фиксированных культур трипановым синим хорошо видны ядра КЗН, занимающие большую часть тел нейронов и окруженные тонким ободком цитоплазмы (рис. 1).

Для каждого вещества было выполнено 5 экспериментов, при этом на каждую точку брали не менее 3 культур, в каждой из которых фотографировали и просчитывали по 5 последовательных полей. Количество нейронов с неизменной морфологией в контрольных культурах принимали за 100% выживаемости.

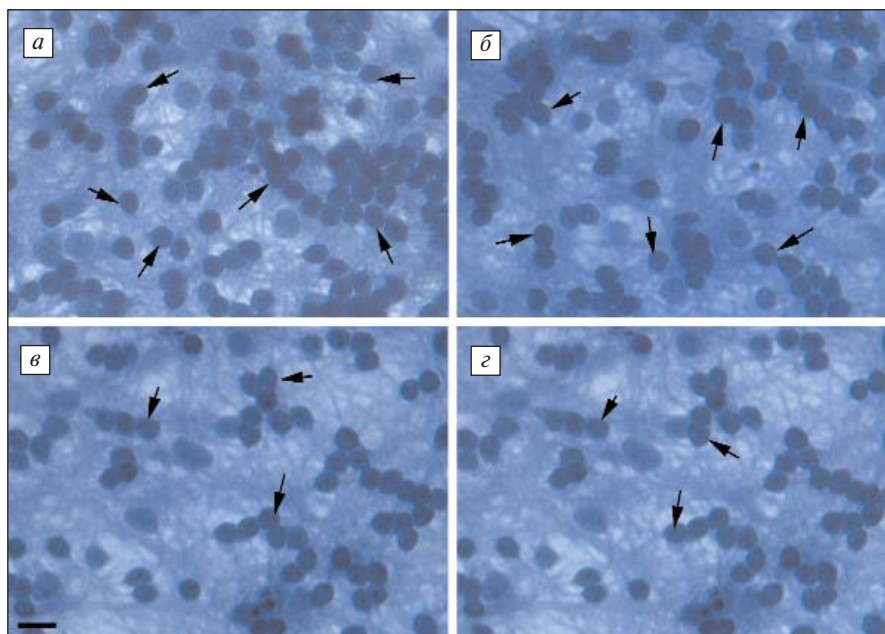


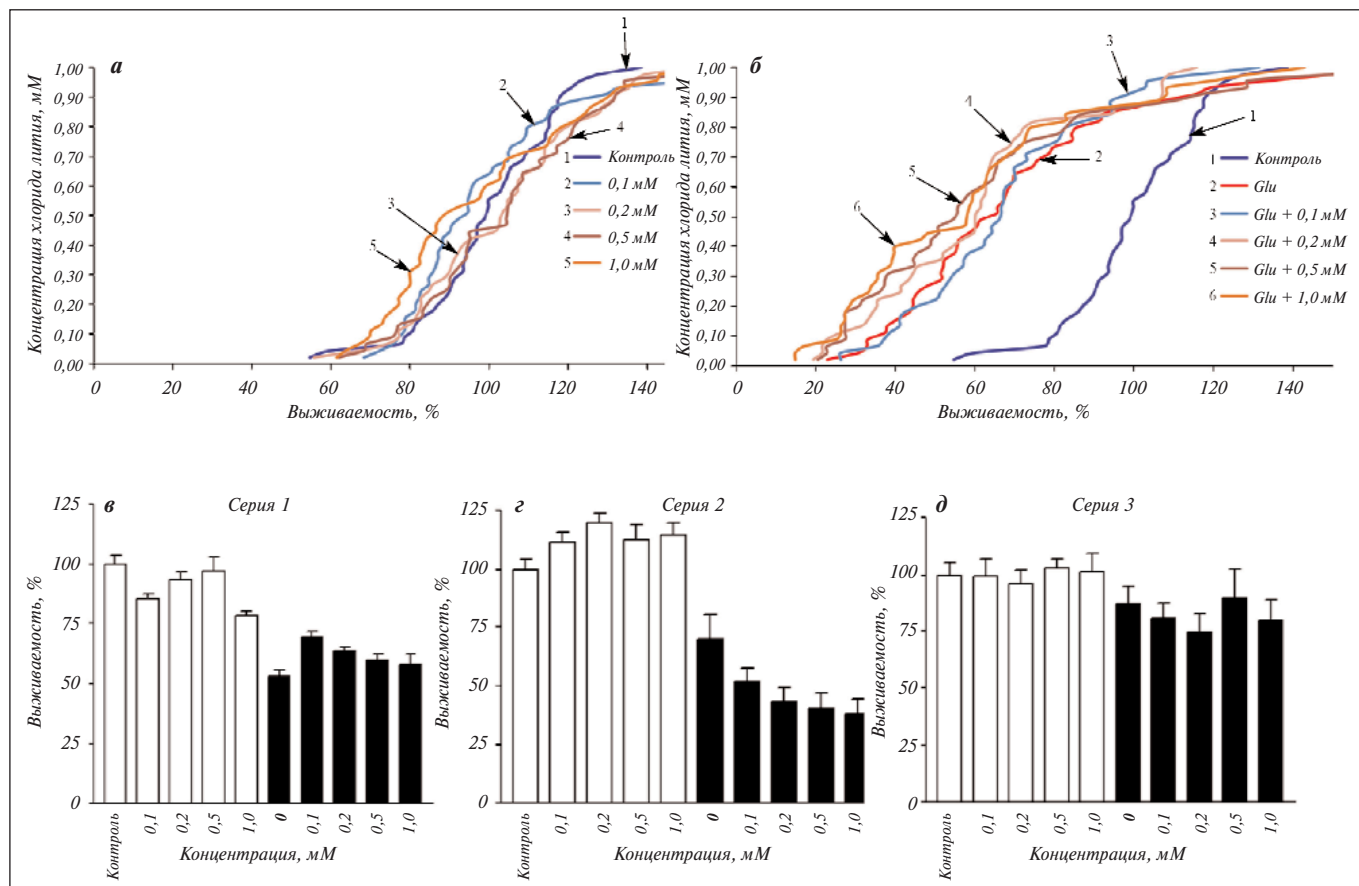
Рис. 4. КЗН мозжечка крыс в контроле (а) и после культивирования с карбонатом лития в течение 5 сут: 0,20 мМ (б); 0,5 мМ (в); 1 мМ (з). Фиксированные культуры, окрашенные трипановым синим. Стрелками указаны интактные КЗН. Масштаб – 15 мкм

Для статистического анализа использовали тест ANOVA с поправкой Бонферрони и тест Данна. Различия между группами считали достоверными при  $p < 0,05$ . Результаты выражали как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Дополнительно анализировали эмпирические функции распределения (ЭФР) значений выживаемости нейронов с использованием статистического критерия Колмогорова–Смирнова.

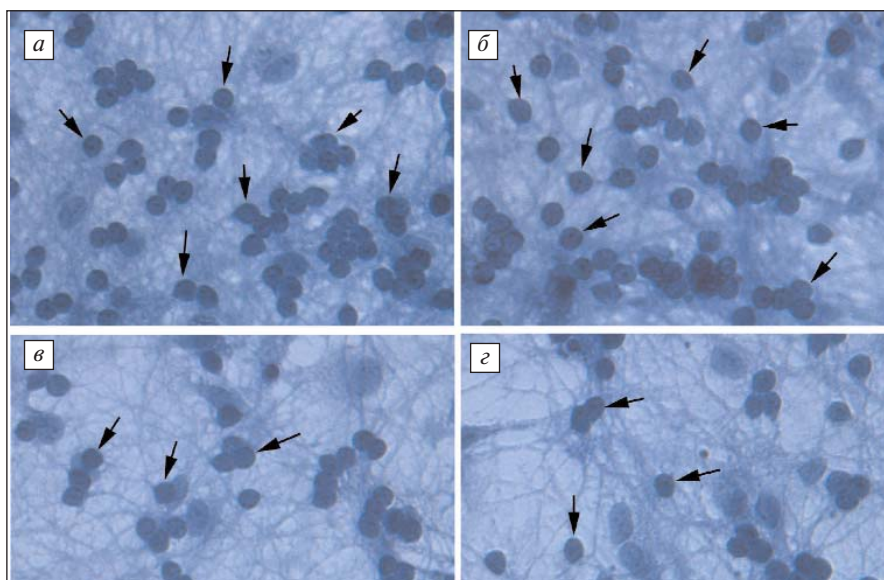
**Результаты и обсуждение.** По данным экспериментальных исследований, нейропротективные свойства солей лития проявляются при достаточно длительном применении (несколько суток, неделя). Поэтому в использованной схеме эксперимента исследуемые вещества вносили в среду культивирования на 2-е сутки *in vitro* и оставляли до 7-х суток, когда проявлялось токсическое действие глутамата [14].

Выживаемость КЗН при нейротоксическом действии глутамата должна составлять 30–70% от контроля, чтобы была возможность оценить нейропротективные свойства исследуемых веществ. Исследование зависимости выживаемости культур нейронов от концентрации глутамата показало, что оптимальные концентрации глутамата лежат в диапазоне от 100 до 150 мкМ (рис. 2). По данным экспоненциальной аппроксимации, увеличение концентрации глутамата на каждые 100 мкМ приводит к падению выживаемости нейронов на 30% (см. рис. 2). Для сравнительного анализа эффектов различных солей лития была использована концентрация глутамата 100 мкМ.

Исследование эффектов каждой соли проводили в два этапа: 1) холостой эксперимент, в котором изучали воздействие различных концентраций соли лития на выживаемость нейронов без добавления глутамата и 2) основной эксперимент, в котором нейроны культивировали при раз-



**Рис. 5.** Выживаемость культур нейронов (в % от контроля) при различных концентрациях хлорида лития. ЭФР значений выживаемости нейронов при различных концентрациях хлорида лития: без добавления глутамата (холостой эксперимент, **а**); в условиях глутаматного стресса (100 мкМ глутамата, **б**). Анализ выживаемости КЗН с использованием теста Данна (**в–д**): результаты совместного действия глутамата и хлорида лития на выживаемость КЗН в трех независимых сериях экспериментов. 0 — воздействие глутамата без добавления хлорида лития



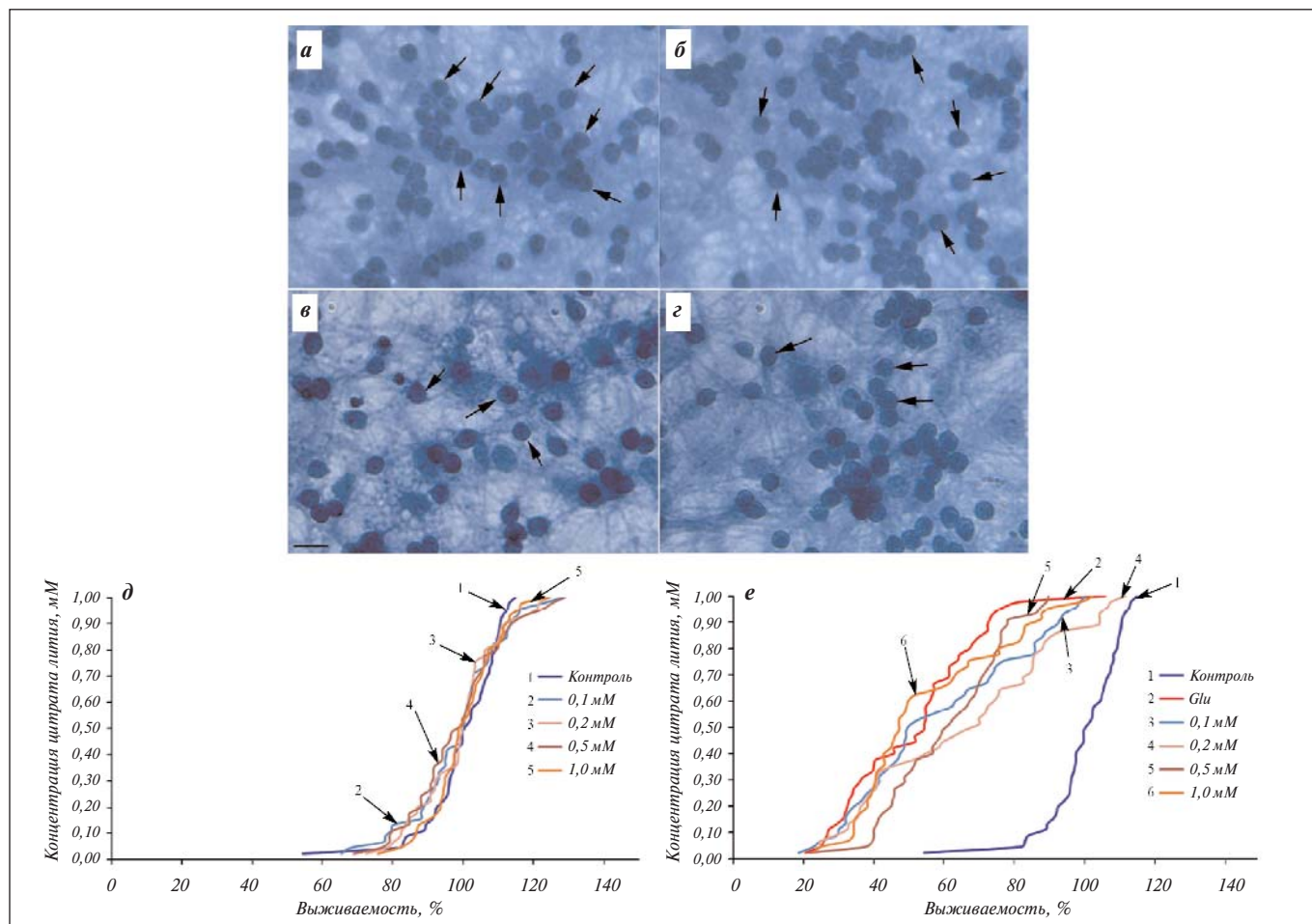
**Рис. 6.** КЗН мозжечка крыс в контроле (**а**) и после культивирования с хлоридом лития в течение 5 сут: 0,20 мМ (**б**); 0,5 мМ (**в**); 1 мМ (**г**). Фиксированные культуры, окрашенные трипановым синим. Стрелками указаны интактные КЗН. Масштаб — 15 мкм

личных концентрациях солей лития в течение 1 сут, затем регистрировали выживаемость нейронов в условиях глутаматного стресса.

Результаты исследований для каждой соли представлены в виде соответствующих ЭФР значений выживаемости нейронов при различных условиях, затем более подробно рассматриваются отдельные серии экспериментов. Вычисление ЭФР позволяет обобщать результаты независимых серий экспериментов и применять один из наиболее чувствительных критериев статистической значимости — критерий Колмогорова–Смирнова.

#### Влияние карбоната лития на выживаемость КЗН

В соответствии с анализом ЭФР методом Колмогорова–Смирнова добавление карбоната лития только в концентрации 0,5 мМ достоверно повыша-



**Рис. 7.** КЗН мозжечка крыс в контроле (а) и после культивирования с цитратом лития в течение 5 сут: 0,20 мМ (б); 0,5 мМ (в); 1 мМ (г). Фиксированные культуры, окрашенные трипановым синим. Стрелками указаны интактные КЗН.

Масштаб – 15 мкм. Обобщение результатов экспериментов: эмпирические функции распределения значений выживаемости нейронов при различных концентрациях цитрата лития – без добавления глутамата (холостой эксперимент, д); в условиях глутаматного стресса (100 мкМ глутамата, е)

ло выживаемость нейронов в холостом эксперименте (максимальное уклонение (D) – 0,21;  $p < 0,01$ ; рис. 3, а); использование других концентраций не приводило к достоверным различиям в выживаемости. В условиях глутаматного стресса карбонат лития в концентрациях 0,1–0,5 мМ не проявлял достоверного влияния на выживаемость, а в концентрации 1 мМ, наоборот, приводил к достоверному снижению выживаемости нейронов (в среднем на 25%;  $D = 0,52$ ;  $p < 0,0001$ ; рис. 3, б).

Анализ выживаемости КЗН с использованием теста Данна показал, что в холостом эксперименте (рис. 3, в) выживаемость КЗН достоверно не изменяется. Более того, в условиях глутаматной токсичности карбонат лития в концентрации 1 мМ достоверно уменьшал выживаемость КЗН (рис. 3, г). Таким образом, при непосредственном воздействии раствора карбоната лития на КЗН отмечается скорее нейротоксический, чем нейропротективный эффект этой соли.

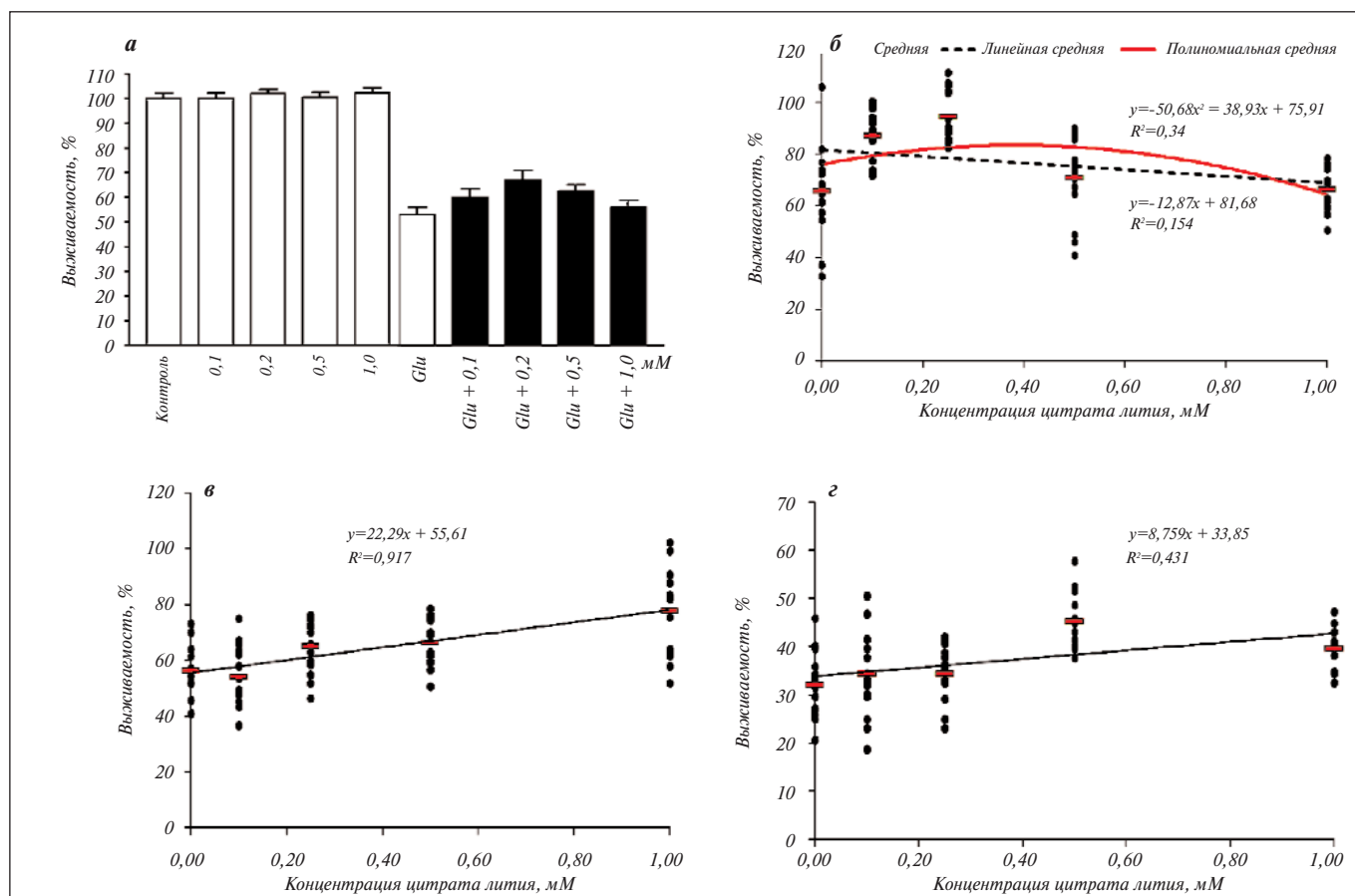
На микрофотографиях фиксированных культур нейронов при различных концентрациях карбоната лития видно, что число выживших нейронов в культуре резко снижается под воздействием концентраций карбоната лития 0,5 и 1 мМ (рис. 4, в, г).

#### Влияние хлорида лития на выживаемость КЗН

В соответствии с тестом Колмогорова–Смирнова добавление хлорида лития в концентрации 1 мМ в холостом эксперименте достоверно уменьшало выживаемость нейронов ( $D = 0,32$ ;  $p < 0,001$ ; рис. 5, а). В условиях глутаматного стресса хлорид лития в концентрации 1 мМ также приводил к достоверному снижению выживаемости нейронов (в среднем на 9%;  $D = 0,24$ ;  $p < 0,005$ ; рис. 5, б), что иллюстрирует рис. 6. При анализе отдельных серий экспериментов с использованием критерия Данна установлено, что защитное действие хлорида лития (16%;  $p < 0,05$ ) проявилось только в первой серии экспериментов (в концентрации 0,1 мМ; рис. 5, в). В других сериях хлорид лития не продемонстрировал достоверного нейропротективного эффекта и не изменял выживаемость КЗН.

#### Повышение аскорбатом лития выживаемости КЗН

Результаты нейробиологических исследований аскорбата лития опубликованы ранее [16]. В соответствии с анализом ЭФР методом Колмогорова–Смирнова добавле-



**Рис. 8.** Регрессионный анализ дозозависимого влияния цитрата лития на выживаемость нейронов (в % от контроля). Горизонтальные непрерывные линии указывают расположение средних значений выживаемости нейронов при заданной концентрации цитрата лития. Приведены уравнения регрессии и значения  $R^2$ . Слабый глутаматный стресс, анализ с использованием критерия Данна (а); слабый глутаматный стресс, регрессионный анализ (б); умеренный глутаматный стресс (в); сильный глутаматный стресс (г)

ние аскорбата лития в концентрациях 0,5 и 1 мМ несколько снижало выживаемость нейронов в холостом эксперименте (например, для концентрации 1 мМ  $D=0,25$ ;  $p<0,03$ ). В условиях глутаматного стресса аскорбат лития в концентрации 0,2–1,0 мМ достоверно и дозозависимо повышал выживаемость КЗН. Наиболее выраженный нейропротективный эффект наблюдался при концентрации аскорбата 1 мМ: выживаемость нейронов повышалась в среднем на 11% ( $D=0,45$ ;  $p<0,001$ ).

#### Повышение цитратом лития выживаемости КЗН

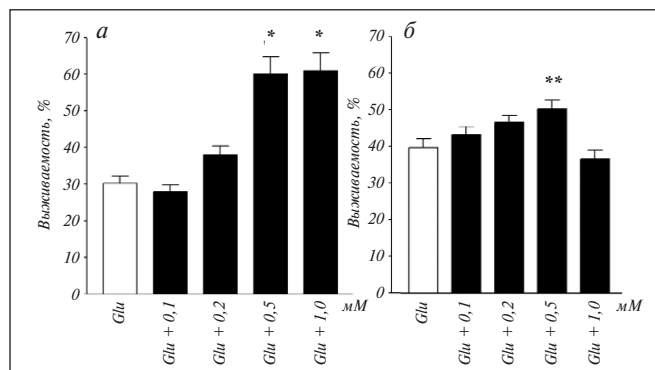
В фиксированных культурах нейронов при всех исследованных концентрациях цитрата лития наблюдается высокое число выживших нейронов (рис. 7, а–г). По данным анализа ЭФР методом Колмогорова–Смирнова, добавление цитрата лития во всем исследованном диапазоне концентраций не изменяло выживаемость нейронов в холостом эксперименте ( $D=0,10$ ;  $p>0,05$ ; рис. 7, д). В условиях глутаматного стресса цитрат лития в концентрации 0,1–1 мМ достоверно увеличивал выживаемость КЗН, причем наибольший эффект наблюдался при концентрации 0,2 мМ: выживаемость повышалась в среднем на 30% ( $D=0,35$ ;  $p<0,003$ ; рис. 7, е).

Анализ отдельных серий экспериментов показал, что нейропротективный эффект цитрата лития проявляется в

условиях слабого, умеренного и тяжелого глутаматного стресса. Хотя во всех экспериментах использовалась одна концентрация глутамата (100 мкМ), культуры клеток в индивидуальных сериях экспериментов несколько различались по чувствительности к воздействию этой концентрации глутамата. В результате одна серия экспериментов с цитратом лития соответствовала условиям слабого глутаматного стресса (выживало в среднем 70% нейронов по сравнению с интактным контролем), другая серия – условиям умеренного глутаматного стресса (выживало 50% нейронов), а третья серия – условиям тяжелого глутаматного стресса (выживало в среднем только 30% нейронов).

Регрессионный анализ дозозависимого влияния цитрата лития на выживание нейронов показал, что при слабом глутаматном стрессе цитрат лития существенно повышал выживание нейронов (на 21% при концентрации 0,2 мМ), причем зависимость имела куполообразный характер с максимумом в диапазоне концентраций 0,2–0,5 мМ (рис. 8, а, б).

При умеренном глутаматном стрессе наблюдалось дозозависимое нарастание нейропротективного эффекта цитрата лития. Наибольший эффект выявлен при концентрации 1 мМ: выживаемость КЗН повышалась в среднем на 24% ( $p<0,04$ ). Регрессионный анализ показал, что возрастание концентрации цитрата лития на каждые 0,1 мМ



**Рис. 9.** Результаты дополнительных серий экспериментов с цитратом лития (а) и цитратом натрия (б). Добавление цитрата лития за 24 ч до внесения глутамата. \* —  $p < 0,01$  по сравнению с действием глутамата без добавок (15 просчитанных полей зрения; а). Влияние цитрата натрия на выживаемость нейронов при культивировании КЗН с раствором соли в течение 5 сут. \*\* —  $p < 0,01$  по сравнению с действием глутамата без добавок (30 просчитанных полей зрения, б)

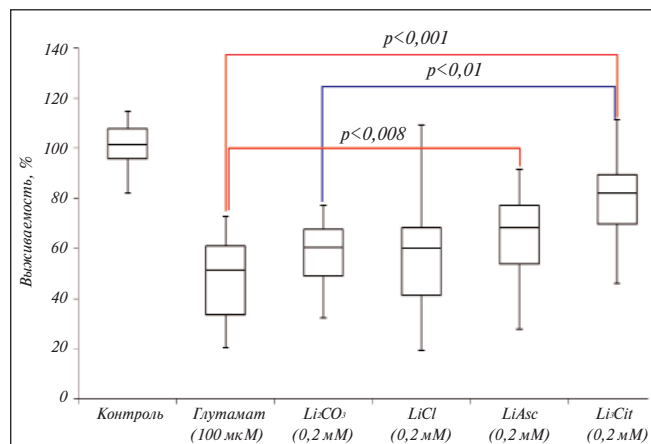
приводило к увеличению выживаемости нейронов на 2,23% (рис. 8, в).

В условиях сильного глутаматного стресса (при 100 мкМ глутамата выживало в среднем 30% нейронов) также наблюдалось дозозависимое возрастание нейропротективного эффекта цитрата лития. Наибольший эффект отмечен при концентрации 0,5 мМ (повышение выживаемости нейронов на 16%;  $p < 0,05$ ). Регрессионный анализ показал, что повышение концентрации цитрата лития на каждые 0,1 мМ приводило к увеличению выживаемости нейронов на 0,88% (рис. 8, з).

Таким образом, добавление цитрата лития в течение 5 сут сопровождалось достоверным нейропротективным эффектом. Дополнительно была проведена серия опытов, в которых цитрат лития был добавлен на 6-е сутки культивирования КЗН, т. е. за 24 ч до токсического воздействия глутамата. В этом случае также выявлен достоверный нейропротективный эффект цитрата лития в концентрациях 0,5 и 1 мМ ( $p < 0,01$ ; рис. 9, а).

Важно отметить, что в условиях глутаматного стресса действующими нейропротективными началами цитрата лития являются и ион лития, и цитрат-анион. Это подтверждают результаты нейробиологического исследования эффектов цитрата натрия (рис. 9, б). Ион натрия не способствует повышению выживания нейронов в условиях глутаматного стресса. В серии экспериментов с цитратом натрия при умеренном глутаматном стрессе выживало в среднем 43% нейронов. Добавление цитрата натрия в концентрациях 0,1, 0,2, 0,5, 1 мМ повышало выживаемость до 45, 48, 52 и 38% соответственно. Таким образом, цитрат натрия в концентрации 0,5 мМ незначительно (на 9%), но способствовал повышению выживаемости КЗН (см. рис. 9, б).

В то же время, как показано выше, в более жестких условиях глутаматного стресса (при концентрации глутамата 100 мкМ выживало в среднем 30% нейронов) цитрат лития в концентрации 0,5 мМ повышал выживаемость нейронов на 16% ( $p < 0,05$ ). Следовательно, и ион лития, и цитрат-анион в составе соли проявляют синергизм в нейропротекции при глутаматном стрессе.



**Рис. 10.** Сравнение нейропротективной эффективности различных солей лития (в концентрации 0,2 мМ) в условиях умеренного глутаматного стресса (выживало в среднем 50% нейронов при добавлении 100 мкМ глутамата). Li:CO<sub>3</sub> — карбонат лития; LiCl — хлорид лития; LiAsc — аскорбат лития; Li:Cit — цитрат лития

Итак, результаты настоящего исследования показали, что в исследованном диапазоне концентраций (0,1–1 мМ) неорганические соли лития (хлорид лития и карбонат лития) не обладают нейропротективным эффектом. При этом существенный разброс значений выживаемости нейронов при использовании хлорида лития (см. рис. 5, в–д, рис. 10) не позволяет наблюдать статистически значимые корреляции. Иначе говоря, достаточно большой разброс значений может маскировать возможные нейропротективные эффекты хлорида лития в нейробиологических экспериментах. В то же время аскорбат лития и цитрат лития способствуют достоверному повышению выживаемости нейронов в субмиллимолярных концентрациях (например, 0,2 мМ; см. рис. 10).

Положительные качества исследованных органических солей лития объясняются прежде всего тем, что такие анионы эндогенных органических кислот, как аскорбат, цитрат лития и др., способствуют усилению транспорта ионов лития внутрь клеток посредством соответствующих ионных каналов для транспорта органических кислот (SLC6A5, SLC36A2, SLC5A8, SLC16A1, SLC13A5 и др.). Ион лития, переносимый внутрь нейронов посредством цитрат-аниона, специфически взаимодействует с целевыми белками, влияющими на молекулярные каскады выживания нейронов (в первую очередь каскады PKB/GSK3 $\beta$  и катенин/Wnt) [17–19].

Эти механизмы действия цитрата лития были продемонстрированы экспериментально. Например, длительный (4 нед) курсовой прием низких доз цитрата лития (100 мкг/кг/сут элементарного лития, т. е. 0,016 мМ) достоверно снижал активность двух основных целевых белков лития — GSK3 $\beta$  и IMPA1 — в гидролизатах головного мозга крыс по сравнению с группой плацебо [1].

**Заключение.** Ион лития оказывает нейропротективное действие прежде всего посредством ингибирования внутриклеточного сигнального белка GSK3 $\beta$ . Транспорт ионов лития внутрь нейронов зависит от аниона соли лития. Результаты настоящего исследования подтвердили непосред-



венное нейропротективное действие цитрата лития и аскорбата лития, оказываемое на КЗН мозжечка. При обработке нейронов в культуре цитратом лития повышалась выживаемость клеток в условиях глутаматного стресса, причем данный эффект практически не наблюдался для неорганических солей лития (карбонат, хлорид) в том же диапазоне

концентраций (0,1–1,0 мМ). Максимальный нейропротективный эффект отмечен для цитрата лития в концентрации 0,2 мМ: выживаемость КЗН повышалась в среднем на 30% ( $p < 0,003$ ). Результаты исследования позволяют предположить, что аскорбат- и цитрат-анионы способствуют более эффективному транспорту ионов лития внутрь нейронов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Торшин ИЮ, Громова ОА, Майорова ЛА, Волков АЮ. О таргетных белках, участвующих в осуществлении нейропротекторных эффектов цитрата лития. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2017;9(1):78–83. [Torshin IYu, Gromova OA, Maiorova LA, Volkov AYU. Targeted proteins involved in the neuroprotective effects of lithium citrate. *Nevrologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika = Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2017;9(1):78–83. (In Russ.)]. doi: 10.14412/2074-2711-2017-1-78-83
2. Bolos V, Grego-Bessa J, de la Pompa JL. Notch signaling in development and cancer. *Endocr Rev*. 2007 May;28(3):339–63. Epub 2007 Apr 4.
3. Welsh GI, Proud CG. Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem J*. 1993 Sep 15;294 (Pt 3):625–9.
4. Shim M, Smart RC. Lithium stabilizes the CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBPalpha) through a glycogen synthase kinase 3 (GSK3)-independent pathway involving direct inhibition of proteasomal activity. *J Biol Chem*. 2003 May 30;278(22):19674–81. Epub 2003 Mar 30.
5. Пронин АВ, Гоголева ИВ, Торшин ИЮ, Громова ОА. Нейротрофические эффекты лития при ишемических и нейродегенеративных поражениях мозга. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2016;(2):99–108. [Pronin AV, Gogoleva IV, Torshin IYu, Gromova OA. Neurotrophic effects of lithium in ischemic and neurodegenerative brain lesions. *Zhurnal nevrologii i psikhiiatrii im. S.S. Korsakova*. 2016;(2):99–108. (In Russ.)].
6. Jho Eh, Lomvardas S, Costantini F. A GSK3beta phosphorylation site in axin modulates interaction with beta-catenin and Tcf-mediated gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Dec 9;266(1):28–35.
7. Jope RS, Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci*. 2004 Feb;29(2):95–102.
8. Ali A, Hoeflich KP, Woodgett JR. Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. *Chem Rev*. 2001 Aug;101(8):2527–40.
9. Ryves WJ, Harwood AJ. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jan 26;280(3):720–5.
10. Dudev T, Lim C. Competition between Li+ and Mg2+ in metalloproteins. Implications for lithium therapy. *J Am Chem Soc*. 2011 Jun 22; 133(24):9506–15. doi: 10.1021/ja201985s. Epub 2011 May 31.
11. Ребров ВГ, Громова ОА. Витамины, макро- и микроэлементы. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2008. 968 с. [Rebrov VG, Gromova OA. *Vitaminy, makro- i mikroelementy* [Vitamins, macro- and micronutrients]. Moscow: GEOTAR-Media; 2008. 968 p.]
12. Гоголева ИВ. Влияние органических солей лития, магния, селена на элементный гомеостаз головного мозга на фоне экспериментальной хронической двусторонней окклюзии общих сонных артерий. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Москва; 2009. 23 с. [Gogoleva IV. The effect of organic salts of lithium, magnesium, selenium on elemental homeostasis of the brain on the background of experimental chronic bilateral occlusion of common carotid arteries. Avtoref. diss. kand. med. nauk. Moscow; 2009. 23 p.]
13. Андреева НА, Стельмашук ЕВ, Исаев НК и др. Нейропротекторные эффекты ноотропного дипептида ГВС-111 при кислородно-глюкозной депривации, глутаматной токсичности и оксидативном стрессе in vitro. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2000;130(10):418–21. [Andreeva NA, Stel'mashuk EV, Isaev NK, et al. Neuroprotective properties of nootropic dipeptide GVS-111 in vitro oxygen-glucose deprivation, glutamate toxicity and oxidative stress. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*. 2000;130(10):418–21. (In Russ.)].
14. Громова ОА, Торшин ИЮ, Гоголева ИВ и др. Фармакокинетический и фармакодинамический синергизм между нейропептидами и литием в реализации нейротрофического и нейропротективного действия церебролизина. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2015;115(3):65–72. [Gromova OA, Torshin IYu, Gogoleva IV, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic synergy between neuropeptides and lithium in the implementation of the neurotrophic and neuroprotective action of cerebrolysin. *Zhurnal nevrologii i psikhiiatrii im. S.S. Korsakova*. 2015;115(3):65–72. (In Russ.)].
15. Стельмашук ЕВ, Новикова СВ, Исаев НК. Влияние глутамина на гибель культивируемых зернистых нейронов, индуцированную глюкозной депривацией и химической гипоксией. *Биохимия*. 2010;75(8):1150–6. [Stel'mashuk EV, Novikova SV, Isaev NK. Influence of glutamine on the death of cultured granular neurons induced by glucose deprivation and chemical hypoxia. *Biokhimiya*. 2010;75(8):1150–6. (In Russ.)].
16. Пронин АВ, Громова ОА, Сардарян ИС и др. Адаптогенные и нейропротективные свойства аскорбата лития. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2016;(12):86–91. [Pronin AV, Gromova OA, Sardaryan IS, et al. Adaptogenic and neuroprotective properties of lithium ascorbate. *Zhurnal nevrologii i psikhiiatrii im. S.S. Korsakova*. 2016;(12):86–91. (In Russ.)].
17. Zheng J, Liu Z, Li W, et al. Lithium posttreatment confers neuroprotection through glycogen synthase kinase-3beta inhibition in intracerebral hemorrhage rats. *J Neurosurg*. 2017 Oct;127(4):716–724. doi: 10.3171/2016.7.JNS152995. Epub 2016 Oct 14.
18. Foltz DR, Santiago MC, Berechid BE, Nye JS. Glycogen synthase kinase-3beta modulates notch signaling and stability. *Curr Biol*. 2002 Jun 25;12(12):1006–11.
19. Espinosa L, Ingles-Esteve J, Aguilera C, Bigas A. Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways. *J Biol Chem*. 2003 Aug 22;278(34):32227–35. Epub 2003 Jun 6.

Поступила 7.07.2017

### Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.