

Список литературы:

1. Дедов И.И. Сахарный диабет – глобальная медикосоциальная проблема современности/ Дедов И.И., Шестакова М.В./ Consilium Medicum. – 2010. – №11 – С. 5-8
2. Климонтов В.В. Взаимосвязь композитного состава тела с минеральной плотностью костной ткани у женщин с сахарным диабетом 2 типа в постменопаузе/ Климонтов В.В., Фазуллина О.Н./ Сахарный диабет. 2015(1). С 65-69
3. Молитвословова Н.А. Остеопороз и сахарный диабет: современный взгляд на проблему/ Молитвословова Н.А., Галстиан Г.Р./ Остеопороз и остеопатии. 2013; 16(1): 11—4

УДК 577.3

**Белевич Е.И., Тамашевский А.В., Канаш Ю.С., Гармаза Ю.М.
ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЛИТИЯ НА ПРОТЕКАНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ
ПРОЦЕССОВ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ
ЧЕЛОВЕКА**

ГНУ “Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси”
Минск, Республика Беларусь

**Bialevich E.I., Tamashevski A.V., Kanash J.S., Harmaza Y.M.
LITHIUM IONS EFFECTS ON THE FREE RADICAL PROCESSES AND
VIABILITY OF HUMAN ERYTHROCYTES**

Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences
Minsk, Republic of Belarus

E-mail: catherina_bel_@tut.by

Аннотация. Обнаружено снижение уровня активных форм кислорода и жизнеспособности эритроцитов человека, подвергшихся воздействию хлорида лития как в токсичных, так и в терапевтических концентрациях. Полученные результаты свидетельствуют как об ингибировании цитозольной эстеразной активности, так и об увеличении проницаемости клеточной мембраны при воздействии ионов лития, что в свою очередь, указывает на потенциальную токсичность данных ионов для эритроцитов человека.

Annotation. Reduction of reactive oxygen species level and viability of human erythrocytes treated with lithium chloride in toxic and therapeutic concentrations was found. These results indicate about cytosolic esterase activity inhibition and cell membrane permeability rise after erythrocytes treatment with lithium ions, which in turn indicates the potential toxicity of these ions for human red blood cells.

Ключевые слова: эритроциты, литий, активные формы кислорода, жизнеспособность.

Key words: erythrocytes, lithium, reactive oxygen species, viability.

Введение

Препараты на основе солей лития широко используются для лечения и поддерживающей терапии при различных психических расстройствах. Известно, что в ядерных клетках ионы лития (Li^+) участвуют в ряде клеточных сигнальных путей, включая аденилатциклазный путь, образование эйкозаноидов, передачу сигналов посредством фосфоинозитола и гликогенсинтазинкиназы. В клетки литий поступает посредством Na^+ -каналов и Na^+/Li^+ обменников, а его удаление происходит с помощью Na^+/K^+ АТФазой. При этом скорость выброса Li^+ из клеток достаточно низкая, что и приводит к его накоплению, что может стать причиной его токсического воздействия на клетки. Несмотря на большое количество работ, связанных с применением лития в терапии психических расстройств, механизм его действия на клетки остается не ясным. В качестве одного из возможных механизмов воздействия Li^+ на клетки рассматривают повышение уровня активных форм кислорода (АФК). Стоит отметить, что в литературе имеются противоречивые данные о влиянии Li^+ на продукцию АФК. Так, в работе [1] показано, что воздействие Li^+ на кардиомиоциты приводит к повышению уровня АФК и последующему окислительному стрессу, авторы работы [2] так же демонстрируют увеличение уровня АФК в клетках гепатоцеллюлярной карциномы (клеточная линия HepG2) и макрофагах мышей при лейкозе Авельсона (клеточная линия RAW 264.7). С другой стороны, в работе [3] обнаружен протективный эффект Li^+ на нейроны клеточной линии PC5 в условиях окислительного стресса, вызванного диабетической гипергликемией, а в исследовании [4] показано, что литий способен минимизировать побочные эффекты другого антипсихотического препарата «Оланзапина», обусловленные запуском окислительных и воспалительных реакций в клетках линии RAW 264.7, тогда как воздействие только Li^+ на данный тип макрофагов приводило лишь к краткосрочному повышению уровня АФК и супероксид аниона в клетках.

В настоящее время влияние Li^+ на изменение уровня АФК в эритроцитах остается не исследованным. Поэтому целью данной работы стало изучение влияния Li^+ в терапевтических и токсичных концентрациях на протекание свободнорадикальных процессов и жизнеспособность эритроцитов человека.

Материалы и методы исследования

В работе использована кровь здоровых доноров в консерванте "гепарин", полученная из РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий МЗ РБ. Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови при $1000g$ в течение 10 мин и трижды отмывали в 155 mM NaCl . Суспензию эритроцитов (10^8 клеток/мл) инкубировали с хлоридом лития (Sigma) в концентрациях 0,1–10 мМ в течение 3 ч при 37°C .

Оценку внутриклеточной эстеразной активности эритроцитов проводили по интенсивности флуоресценции кальцеина АМ (Sigma). Для этого 150 мкл

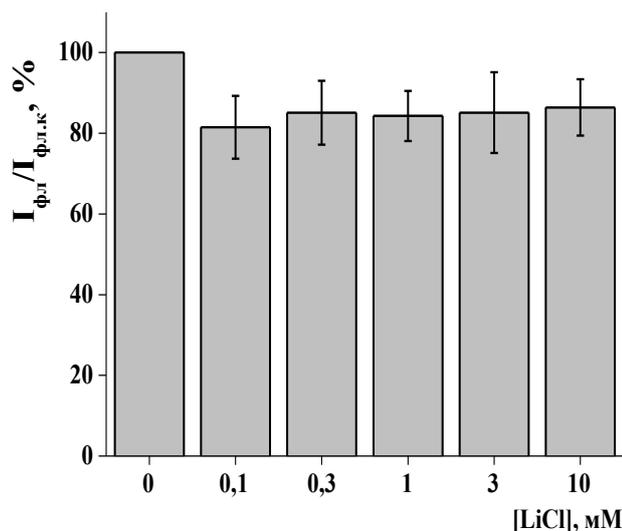
суспензии эритроцитов ($2 \cdot 10^6$ /мл), инкубировали в PBS буфере (рН 7,4), с кальцеином-АМ в концентрации 3 мкМ в течение 30 мин при 37°C в темноте и незамедлительно проводили цитофлуориметрический анализ на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (BeckmanCoulter, США) в FL-1 канале.

Протекание свободнорадикальных процессов в эритроцитах оценивали с помощью 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (H_2DCFDA , MolecularProbes) по интенсивности флуоресценции конечного продукта –DCF. Для этого 150 мкл суспензии эритроцитов ($2 \cdot 10^6$ /мл), инкубировали в PBS буфере (рН 7,4), с H_2DCFDA в концентрации 3 мкМ в течение 30 мин при 37°C в темноте. Далее клетки дважды отмывали от невстроившегося зонда в исходном буфере (2900g, 5 мин). Цитофлуориметрический анализ также проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (BeckmanCoulter, США) в FL-1 канале.

Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрических критериев Уилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. В работе представлены средние и медианные значения 5–6 независимых экспериментов.

Результаты исследования и их обсуждение

Для выяснения влияния Li^+ на протекание свободнорадикальных процессов в эритроцитах и их жизнеспособность были использованы терапевтические (0,1; 0,3 и 1 мМ) и токсичные (3 и 10 мМ) концентрации $LiCl$. На рисунке 1 представлены данные об изменении интенсивности флуоресценции зонда DCF (маркера АФК) в эритроцитах, подвергшихся воздействию Li^+ в течение 3 ч при 37°C. Из рисунка 1 видно, что обработка эритроцитов $LiCl$ в концентрациях 0,1–10 мМ приводит к снижению интенсивности флуоресценции DCF в среднем на 15–20% по сравнению с контрольными клетками. Снижение интенсивности флуоресценции DCF может быть обусловлено несколькими факторами. Во-первых, для того, что бы зонд мог вступить в реакцию с АФК, от 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (H_2DCFDA) внутриклеточные эстеразы должны отщепить ацетатные группы, если же активность внутриклеточных эстераз будет снижена, то будет снижена и продукция H_2DCF , способного вступать в реакцию с АФК. Во-вторых, в случае повышения проницаемости клеточной мембраны будет происходить выход DCF (флуоресцирующей формы зонда) из клеток в буфер, что проявляется в снижении интенсивности флуоресценции DCF в эритроцитах.



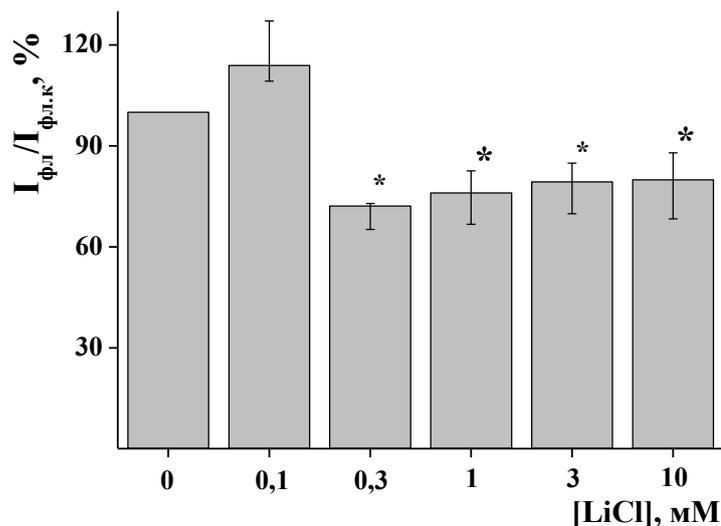
За 100% принято медианное значение интенсивности флуоресценции DCF в контрольных эритроцитах, не обработанных LiCl

Рис. 1. Отношение значений медиан интенсивностей флуоресценции зонда DCF в эритроцитах после воздействия на них LiCl в концентрациях 0,1–10 мМ к соответствующим значениям интенсивностей флуоресценции DCF в контрольных клетках

Далее была изучена жизнеспособность эритроцитов, подвергшихся воздействию LiCl. Известно, что маркером жизнеспособности является активность цитозольных внутриклеточных эстераз, которую оценивают с использованием красителя кальцеина-АМ. Данный краситель, проникая через мембрану клетки, гидролизуется внутриклеточными эстеразами до флуоресцирующего кальцеина (CAL) и удерживается внутри клеток с интактной мембраной. Проведенные эксперименты позволили выявить статистически значимое снижение жизнеспособности эритроцитов на 20–25% по сравнению с контрольными клетками при воздействии на них LiCl в концентрациях 0,3–10 мМ в течение 3 ч при 37°C (рисунок 2). Полученные нами результаты согласуются с данными работы [5], где воздействие Li⁺ на эритроциты, истощенные по глюкозе, приводило к росту содержания Ca²⁺ и АТФ в цитозоле, и увеличению экспонирования фосфатидилсерина во внешнем липидном монослое мембраны эритроцитов, что свидетельствовало о запуске запрограммированной гибели эритроцитов – эриптоза.

Выводы

Таким образом, в эритроцитах, подвергшихся влиянию хлорида лития в терапевтических и токсичных концентрациях, зафиксировано снижение уровня активных форм кислорода и жизнеспособности эритроцитов. Полученные результаты свидетельствуют как о снижении эстеразной активности в эритроцитах, так и об увеличении проницаемости клеточной мембраны при воздействии ионов лития на эритроциты, что в свою очередь указывает на их потенциальную токсичность.



*За 100% принято медианное значение интенсивности флуоресценции CAL ($I_{фл.к}$) в контрольных эритроцитах, не обработанных LiCl. * - различия внутри группы достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$)*

Рис. 2. Отношение значений медиан интенсивностей флуоресценции CAL в эритроцитах после воздействия на них LiCl в концентрациях 0,1–10 мМ к соответствующим контрольным значениям

Список литературы:

1. Toxicity of lithium on isolated heart mitochondria and cardiomyocyte: A justification for its cardiotoxic adverse effect / Salimi [et al.] // J. Biochem. Mol. Toxicol. – 2017. – Vol. 31, № 2. – P. 1-8
2. Lithium chloride promotes lipid accumulation through increased reactive oxygen species generation / Lee Y, Kim SM, Jung EH, Park J, Lee JW, Han IO. // Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids. – 2019. – Vol. 1865, № 2. – P. 1-27.
3. Lithium is able to minimize olanzapine oxidative-inflammatory induction on macrophage cells / M.S. Fernandes, [et al.] // PLoS One. – 2019. – Vol. 14, № 1. – P. 1-16
4. Investigating the protective effect of lithium against high glucose-induced neurotoxicity in PC12 cells: involvements of ROS, JNK and P38 MAPKs, and apoptotic mitochondria pathway / A. Aminzadeh [et al.] // Cell Mol. Neurobiol. – 2014. – Vol. 34, № 8. – P. 1143-1150
5. Lithium-induced suicidal erythrocyte death / J.P. Nicolay [et al.] // J. Psychopharmacol. – 2010. – Vol. 24, № 10. – P. 1533-1539

УДК:616.89-008.19+616.85)-057.875

Борзилова А.А., Минакова А.А., Мокашева Ев.Н., Мокашева Ек.Н. АНАЛИЗ ФОРМИРОВАНИЯ НЕВРОТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ У СТУДЕНТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗДЕЙСТВИЯ СТРЕССА

Кафедра патологической физиологии
Воронежский государственный медицинский университет