

**ЛИТИЙ-ИНДУЦИРОВАННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГЛУТАТИОНОВОГО
ЗВЕНА В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*****Г.П. Зубрицкая, И.А. Дремук, Е.И. Слобожанина***ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, petro371@mail.ru*

Литий является микроэлементом с малоизученной биологической ролью, он влияет на многие метаболические процессы. Отклонение в содержании этого элемента в организме человека часто приводит к нарушениям в состоянии здоровья. Известно, что соли лития используются в качестве психотропных и других лекарственных средств, а также входят в состав кормовых добавок в животноводстве, литий широко применяется и для изготовления литиевых аккумуляторов. В связи с этим возникла опасность неконтролируемого накопления лития в организме человека. Физиологическая роль и механизмы влияния лития на клеточные мембраны до конца не выяснены [1]. В связи с тем, что ионы лития транспортируются в организме в основном кровью, а также тем, что кровь является основным индикатором элементного статуса в медицинской практике, представляет интерес изучение механизмов влияния лития на лимфоциты периферической крови человека. Стоит отметить, что соли лития имеют узкое терапевтически/токсическое соотношение, поэтому их нельзя назначать при отсутствии средств для проведения мониторинга концентрации лития в плазме крови. Ионы лития обладают «пороговым» эффектом воздействия, т.е. ниже определенной концентрации они не воздействуют на патологический процесс. Минимальная терапевтическая концентрация в крови составляет 0,6 ммоль/л, а предельно допустимая – 1,6 ммоль/л. На практике не рекомендуется превышать концентрацию 1,2 ммоль/л [2]. Период полувыведения лития составляет примерно сутки. При передозировке литий действует прежде всего на центральную нервную систему и на почки, что может заканчиваться летальным исходом, который может наступить, когда концентрация лития в плазме достигает 4-6 ммоль/л. Длительное применение лекарственных средств с литием приводит также и к побочным эффектам: диспептическим расстройствам, тремору пальцев рук, головокружению, сонливости, реже – увеличению массы тела, кожным реакциям и др. Главная проблема, возникающая при использовании лития в клинической практике, связана с необходимостью контроля за его концентрацией в плазме крови, т.к. в отдельных случаях токсические проявления наблюдаются даже при терапевтических концентрациях лития в крови. Что касается действия различных солей лития на лимфоциты, из литературы известно, что инкубация их в среде RPMI с сукцинатом, фумаратом, пируватом и аскорбатом лития приводила к однонаправленному изменению репертуара поверхностных рецепторов лимфоцитов в сравнении с карбонатом лития. Все соли лития в терапевтических концентрациях не оказывали

негативного влияния на лимфоциты [3], а при концентрациях, превышающих терапевтические, получен негативный ответ.

Данная работа посвящена выявлению параметрам, отражающих токсическое действие ионов лития на лимфоциты человека *in vitro* с целью разработки способа оценки его токсичности в клетках крови. Для достижения данной цели нами были исследованы активность глутатионтрансферазы, уровень восстановленного глутатиона, а также проведена оценка действия ионов лития на продукцию активных форм кислорода в лимфоцитах человека.

Материалы и методы. В работе была использована кровь доноров в консерванте «гепарин», полученная из РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий МЗ Республики Беларусь. Лимфоциты периферической крови человека изолировали в градиенте плотности гистобака-1077 путем центрифугирования крови (300x g, 30 мин) и последовательных отмывок в натрий-фосфатном буфере (PBS-буфер). Отмытые лимфоциты подвергались воздействию сульфата лития в фармакологических (0,5 мМ - 3 мМ) и токсичных (6 мМ; 10 мМ) концентрациях в течение 2 ч при 37°C. Активность глутатион-S-трансферазы (GST) и уровень восстановленного глутатиона (GSH) в лимфоцитах определяли как в работах [4] и [5] (соответственно) в нашей модификации.

Оценку уровня активных форм кислорода (АФК) в лимфоцитах проводили с использованием флуоресцентного зонда 5-хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (CM-H₂DCFDA) по интенсивности флуоресценции конечного продукта 5-хлорметил -2',7' дихлорфлуоресцеин на проточном цитофлуориметре как в работе [6].

Результаты и их обсуждение. Значительная роль в клеточных редокс-зависимых процессах принадлежит GST, образующей суперсемейство изоформ, катализирующих конъюгацию глутатиона с широким рядом неполярных соединений эндогенного и экзогенного происхождения, содержащих электрофильные атомы углерода, серы, азота и фосфора, что вносит важный вклад в защиту клетки от возможного токсического действия этих соединений. GST играет двойную роль в защите клетки от окислительного стресса: восстановление АФК (кроме H₂O₂), фосфолипидов, белков, нуклеиновых кислот и конъюгирование с GSH вторичных метаболитов окислительного стресса (альдегидов и т.д.) [7]. Известно, что глутатион является основным низкомолекулярным антиоксидантом клеток. Он существует в организме в двух формах: окисленной (GSSG, неактивной) и восстановленной (GSH, активной). Снижение соотношения концентраций GSH / GSSG является маркером окислительного стресса. При избыточной продукции свободных радикалов наблюдается резкое истощение запасов GSH.

Ионы лития оказывают влияние на гомеостаз лимфоцитов в организме. К сожалению, физиологические и токсические диапазоны концентраций лития в крови остаются практически не исследованными. Для выяснения вопроса о возможном влиянии ионов лития на окислительно-восстановительные процессы в лимфоцитах периферической крови, подвергшихся воздействию сульфата лития *in vitro*, нами изучены активности GST, уровень GSH в лимфоцитах до и после инкубации их в средах, содержащих сульфат лития в фармакологических (0,25, 0,5 и 2 мМ), так и в токсических (6 и 10 мМ) концентрациях.

Было установлено, что среднее значение активности GST в лимфоцитах человека после воздействия Li₂SO₄ в концентрациях 1 и 2 мМ достоверно снижалась по сравнению с контролем (клетками, которые не подвергались воздействию солей лития, p<0,05). При воздействии токсических концентраций (6 и 10 мМ Li₂SO₄) на лимфоциты обнаружено полное ингибирование активности GST (таблица 1).

Как известно, GSH является коферментом GST и кроме защитной функции выполняет ряд физиологических функций, например, оказывает влияние на биохимические превращения витаминов С, Е, липоевой кислоты, а также, воздействуя на лимфоциты, обеспечивает иммунный ответ организма. Нами было показано, что при воздействии сульфата лития в концентрациях 0,5, 1 и 2 мМ на лимфоциты наблюдалась тенденция к снижению уровня GSH в зависимости от концентрации соли, а при воздействии токсических концентраций (6 и 10 мМ Li₂SO₄) на лимфоциты обнаружено достоверное снижение среднего значения концентрации GSH примерно на 20 и 50% соответственно (по сравнению с контролем (p<0,05) (таблица 1).

Полученные результаты позволяют заключить, что после воздействия на лимфоциты человека *in vitro* сульфата лития в фармакологических концентрациях (до 3 мМ) активность GST снижается доза-зависимым образом, а при концентрациях 6 мМ и выше происходит полное ингибирование активности этого фермента. После воздействия на лимфоциты человека *in vitro* сульфата лития в фармакологических концентрациях уровень GSH имеет тенденцию к снижению, а при токсических – происходит достоверное снижение концентрации GSH в клетках по сравнению с контро-

лем. Так как токсические концентрации ионов лития ингибируют активность фермента глутатионтрансферазы в лимфоцитах, можно говорить об индуцированном ионами лития изменении редокс-статуса лимфоцитов.

Таблица – Уровень активности цитоплазматической глутатион-S-трансферазы и концентрация восстановленного глутатиона в лимфоцитах, подвергшихся воздействию сульфата лития в различных концентрациях

Концентрация Li ₂ SO ₄ (мМ)	Активность GST (мкмоль/мг белка)	Концентрация GSH (нмоль/млн. кл.)
Контроль (лимфоциты, не подверженные воздействию лития)	1,41±0,07	3,0±0,03
0,5	0,79±0,07	2,80±0,04
1	0,58±0,05*	2,77±0,05
2	0,19±0,07*	2,65±0,023
6	0	2,37±0,052*
10	0	1,55±0,022*

Примечание –* достоверность различия по сравнению с контролем (p< 0,05).

В литературе имеются противоречивые данные о влиянии Li⁺ на продукцию АФК в различных клетках. Так в работе, [8] показано, что воздействие Li⁺ на кардиомиоциты приводит к повышению уровня АФК и последующему окислительному стрессу. С другой стороны, обнаружен протективный эффект Li⁺ на нейроны клеточной линии PC5 в условиях окислительного стресса, вызванного диабетической гипергликемией [9].

Можно предположить, что воздействие лития на лимфоциты будет влиять на протекание свободнорадикальных процессов в клетках. Измерение уровня АФК с помощью флуоресцентного зонда H₂DCFDA в лимфоцитах, подвергшихся воздействию фармакологической (1 мМ) и токсической (10 мМ) концентраций сульфата лития позволило установить лишь незначительное снижение (а не увеличение, как предполагалось) уровня АФК на 10-15% по сравнению с контрольными клетками.

Таким образом, из полученных данных следует, что ингибирование активности глутатионтрансферазы и низкий уровень восстановленного глутатиона в лимфоцитах свидетельствуют о токсическом действии ионов лития и могут быть потенциальными параметрами при создании клеточной тест-системы для определения токсичности лития в организме.

Работа поддержана грантом БРФФИ (договор № Б 23-107).

Список использованных источников

1. Bekker, R.A., Bykov Yu.V. Lithium Preparations in Psychiatry, Addiction Medicine and Neurology. Part II. Biochemical mechanisms of its action / R.A. Bekker, Yu.V. Bykov // Acta biomedical scientifica. –2019. –Vol.14, –N2. –P. 82–102.
2. Towards a Unified Understanding of Lithium Action in Basic Biology and its Significance for Applied Biology / E. Jakobsson [et. al.] // J. Membr Biol. –2017. –Vol.250, –N 6. – P. 587–604.
3. Влияние солей лития на экспрессию поверхностных рецепторов лимфоцитов больных алкоголизмом в опытах in vitro/ Т.П. Велугина [и др.]// Междун. Журнал прикл. И фундам. Исследований. –2019. –№ 2. – С. 38–42.
4. Habig, W. H. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation / W. H. Habig, M. J. Pabst, W. B. Jakoby// J. Biol. Chem. – 1974. – Vol. 249, – № 22. –P. 7130–7139.
5. Sedlak, J. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent / J. Sedlak, R.H. Lindsay // Anal. Biochem., –1968. –Vol.25,–N. 1. – P. 192–205.
6. Enhanced suicidal erythrocyte death in acute cardiac failure / P. Attanasio [et al.] // Eur. J. Clin. Invest. –2015. – Vol. 45, –N 12. – P. 1316–1324.
7. Tew, K.D. Glutathione-s-transferases as determinants of cell survival and death / K.D. Tew, D.M. Townsend // Antioxidants & Redox Signaling, –2012. – Vol. 17. – P. 1728–1737.

8. Lithium chloride promotes lipid accumulation through increased reactive oxygen species generation. / Y. Lee [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids.* –2019.– Vol. 1865, –N 2. – P. 1–27.

9. 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, –N 8. – P. 1143–1150.