

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092.9

Черпаков Р.А.^{1,2}, Кузовлев А.Н.¹, Макаревич Д.Г.³, Лобанов А.В.⁴, Ершов А.В.^{1,5}, Гребенчиков О.А.^{1,6}

Влияние различных концентраций хлорида лития на уровень р-GSK-3β в модели ишемического инсульта

¹ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», 107031, Москва, Россия, ул. Петровка, д. 25, стр. 2;

²ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского», 129010, Москва, Россия, Большая Сухареvская площадь, д. 3;

³ГБУЗ «ГКБ им. В.П. Демикова» ДЗМ, 109263, Москва, Россия, ул. Шулева д. 4, стр. 13;

⁴ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;

⁵ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский институт им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченоvский Университет),

119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2;

⁶ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», 129110, Россия, Москва, ул. Щепкина, д. 61/2

Введение. В современном мире проблема инсультов постепенно выходит на лидирующие позиции. Отсутствие эффективных медикаментозных методов коррекции острого нарушения мозгового кровообращения приводит к необходимости поиска новых препаратов с нейропротекторным потенциалом, способных если не предотвратить, то значительно минимизировать последствия и тяжесть ишемического инсульта. **Цель исследования** – оценка влияния различных доз хлорида лития на фосфорилирование GSK-3β и выживаемость животных на модели ишемического инсульта.

Методика. В исследовании были использованы беспородные крысы – самцы, разделенные на 5 групп: ложнопериорванные ($n=9$), контрольная группа (ишемический инсульт с введением раствора NaCl 0,9% в объеме, эквивалентном вводимым лекарственным средствам в других группах, $n=5$), и группы с введением хлорида лития в дозах 4,2 мг/кг ($n=5$), 21 мг/кг ($n=5$) и 63 мг/кг ($n=5$). Ишемический инсульт моделировали по методу Лонга. По истечении 7 сут от начала эксперимента животные подвергались гуманной эвтаназии с извлечением головного мозга и дальнейшим определением уровня фосфорилированной формы GSK-3β (p-GSK-3β) методом вестерн-блоттинга. Нейропротекторный эффект солей лития реализуется благодаря прямому ингибированию ключевой киназы аптотического механизма клеточной сигнализации – гликоген-синтазы киназы-3β (GSK-3β) с переводом её в фосфорилированную форму (p-GSK-3β). На 7-е сут также был проведен анализ показателей летальности в группах. Для множественных сравнений рассчитывали критический уровень значимости при использовании поправки Бонферрони.

Результат. Хлорид лития в дозе 4,2 мг/кг оказывал минимальное влияние как на уровень p-GSK-3β ($p=0,8$), так и на летальность по отношению к контрольной группе ($p>0,017$). Доза 21 мг/кг, в свою очередь, значительно повышала уровень p-GSK-3β ($p=0,008$), но не снижала летальность ($p>0,017$) по отношению к группе контроля. При использовании дозировки 63 мг/кг уровень p-GSK-3β был максимально приближен к группе ложнопериорванных животных ($p=0,007$), а летальность на 7 сут была значительно ниже ($p>0,017$).

Заключение. Хлорид лития обладает отчётливым дозозависимым нейропротекторным эффектом. Нейропротекторный эффект солей лития реализуется благодаря прямому ингибированию ключевой киназы аптотического механизма клеточной сигнализации – гликоген-синтазы киназы-3β (GSK-3β) с переводом её в фосфорилированную форму (p-GSK-3β). Реализация нейропротекторного эффекта данного препарата потенциально способна улучшить прогнозы течения ишемического инсульта.

Ключевые слова: хлорид лития; нейропротекция; ишемический инсульт; GSK-3β

Для цитирования: Черпаков Р.А., Кузовлев А.Н., Макаревич Д.Г., Лобанов А.В., Ершов А.В., Гребенчиков О.А. Влияние различных концентраций хлорида лития на уровень p-GSK-3β в модели ишемического инсульта. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(4): 26-33.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.26-33

Для корреспонденции: Черпаков Ростислав Александрович, e-mail rcherpakov@fnkcr.ru

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Гребенчиков О.А., Ершов А.В., Черпаков Р.А.; сбор и обработка материала – Кузовлев А.Н., Черпаков Р.А., Макаревич Д.Г.; подготовка иллюстративного материала – Гребенчиков О.А., Ершов А.В., Черпаков Р.А.; статистическая обработка результатов – Лобанов А.В. и Ершов А.В.; написание текста – Черпаков Р.А., Гребенчиков О.А., Ершов А.В., Макаревич Д.Г.; редактирование – Черпаков Р.А., Кузовлев А.Н., Макаревич Д.Г., Лобанов А.В., Ершов А.В., Гребенчиков О.А.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки
Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Поступила 24.03.2021
Принята к печати 02.11.2021
Опубликована 20.12.2021

Cherpakov R.A.^{1,2}, Kuzovlev A.N.¹, Makarevich D.G.³, Lobanov A.V.⁴, Ershov A.V.^{1,5}, Grebenchikov O.A.^{1,6}

Effect of different concentrations of lithium chloride on p-GSK-3 β content in a model of ischemic stroke

¹Federal Scientific and Clinical Center for Resuscitation and Rehabilitation, Petrovka St. 25, Bld. 2 Moscow 107031, Russian Federation;

²N.N. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care, Bolshaya Sukharevskaya Ploshchad 3, Moscow 129010, Russian Federation;

³V.P. Demikhov State Clinical Hospital, Shkuleva St. 4, Bld. 13, Moscow 109263, Russian Federation;

⁴Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation;

⁵I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya St. 8, Bld. 2, Moscow 119991, Russian Federation;

⁶M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Shchepkina St. 61/2, Moscow 129110, Russian Federation

Background. Ischemic stroke is becoming a major medical concern worldwide. Reasons for this include the aging population, which experiences an increasing frequency of cardiovascular problems. Additionally, social factors, e.g., smoking, fatigue, substance abuse, lead to strokes in young and middle-aged people. The lack of effective medical methods for correcting acute cerebral circulatory disorders underscores the need for new drugs whose neuroprotective potential can prevent or significantly minimize the consequences and severity of ischemic stroke. **Aim.** To evaluate the effect of different doses of lithium chloride on GSK-3 β phosphorylation and on animal survival in a model of ischemic stroke.

Methods. 29 male rats were divided into five groups: Sham-operated ($n=9$); control, ischemic stroke with administration of a volume of 0.9% NaCl solution equivalent to the volume of the administered drugs in other groups ($n=5$); and groups with administration of lithium chloride at doses of 4.2 mg/kg ($n=5$), 21 mg/kg ($n=5$), and 63 mg/kg ($n=5$). Ischemic stroke was produced by the Long method. After 7 days, the animals were subjected to humane euthanasia. The brain was excised, and the phosphorylated form of GSK-3 β (p-GSK-3 β) was measured by Western blotting. The neuroprotective effect of lithium salts occurs due to a direct inhibition of the key kinase of the apoptotic mechanism of cell signaling, glycogen-synthase kinase (GSK-3 β), that is transformed into a phosphorylated form. Also, the group mortality rates were analyzed on day 7. For multiple comparisons, a critical level of significance was calculated using the Bonferroni correction.

Results. Lithium chloride, 4.2 mg/kg, had a minimal effect on both p-GSK-3 β ($p=0.8$) and mortality compared to the control group ($p>0.017$). A dose of 21 mg/kg significantly increased p-GSK-3 β ($p=0.008$), but did not reduce mortality ($p>0.017$), relative to the control group. At a dose of 63 mg/kg, p-GSK-3 β was similar to that of the sham operated animals ($p=0.007$), and the mortality on day 7 was significantly lower ($p>0.017$).

Conclusion. Lithium chloride produces a dose-dependent, neuroprotective effect. This protective effect occurs due to a direct inhibition of the key kinase of the apoptotic mechanism of cell signaling, glycogen-synthase kinase (GSK-3 β), that is transformed into a phosphorylated form. This neuroprotection is potentially able to improve the prognosis of ischemic stroke.

Key words: lithium chloride; neuroprotection; ischemic stroke; GSK-3 β

For citation: Cherpakov R.A., Kuzovlev A.N., Makarevich D.G., Lobanov A.V., Ershov A.V., Grebenchikov O.A. Effect of different concentrations of lithium chloride on p-GSK-3 β content in a model of ischemic stroke. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(4): 26-33. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.26-33

For correspondence: Rostislav A. Cherpakov, Researcher, «Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology», 107031, Moscow, Russia, Petrovka str., 25, p. 2, e-mail cherpakov@fnkcr.ru

Contribution: research concept and design – Grebenchikov O. A., Ershov A. V., Cherpakov R. A.; collection and processing of material – Kuzovlev A.N., Cherpakov R.A., Makarevich D.G.; preparation of illustrative material – Grebenchikov O.A., Ershov A.V. and Cherpakov R.A.; statistical processing – Lobanov A.V. and Ershov A.V.; text writing – Cherpakov R.A., Grebenchikov O.A., Ershov A.V., Makarevich D.G.; editing – Cherpakov R.A., Kuzovlev A.N., Makarevich D.G., Lobanov A.V., Ershov A.V., Grebenchikov O.A.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Information about the authors:Cherpakov R.A., <https://orcid.org/0000-0002-0514-2177>Kuzovlev A.N., <https://orcid.org/0000-0002-5930-0118>Makarevich D.G., <https://orcid.org/0000-0001-7913-3946>Lobanov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-5159-3227>Ershov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-5758-8552>Grebenschikov O.A., <https://orcid.org/0000-0001-9045-6017>

Received 24.03.2021

Accepted 02.11.2021

Published 20.12.2021

Введение

Ишемический инсульт, наряду с другими церебро-вазкулярными заболеваниями, последнее время начинает занимать одно из лидирующих мест в структуре причин как смертности, так и инвалидизации пациентов всех возрастов [1, 2]. Поиск эффективных методов лечения инсульта на ранних этапах является приоритетным в рамках минимизации последствий церебральной ишемии [3].

Препараты лития были одобрены к применению ещё в 1970 г. [4], что позволило накопить обширный клинический опыт его применения. В 2007 г. в работе Н. Lin и соавт. было отмечено практически двукратное увеличение риска развития инсультов у пациентов с биполярными расстройствами (2,97% в группе психических заболеваний против 1,5% в группе пациентов, перенесших аппендэктомия, $p < 0,05$) [5]. Позже, в статье С. Lan и соавт., в рамках ретроспективного анализа риска инсультов у пациентов с биполярными расстройствами было отмечено почти двукратное снижение частоты инсультов ($p < 0,05$) у пациентов, получавших терапию на основе лития (2,8%) по отношению к пациентам, получавших терапию антипсихотическими препаратами и антидепрессантами (5,4%) [6]. В экспериментальной работе М. Ren и соавт. [7] эффект лития при ишемическом инсульте оценивался путем сравнения объема поражения в зависимости от вводимой дозы препарата. Однако наиболее эффективной оказалась доза 127 мг/кг, что практически в 4 раза превышало токсическую концентрацию для человека [8].

Нейропротекторный эффект солей лития реализуется благодаря прямому ингибированию ключевой киназы аптотического механизма клеточной сигнализации – гликоген-синтазы киназы-3 β (GSK-3 β) с переводом её в фосфорилированную форму (p-GSK-3 β) [9]. В предыдущих работах, однако, не оценивалось влияние различных доз лития на уровень p-GSK-3 β в очаге ишемического инсульта, а также и на летальность.

Учитывая имеющуюся на сегодняшний день информацию о нейропротекторных эффектах лития, а также роли клеточных киназ в патогенезе повреж-

дения тканей головного мозга и была сформулирована цель данного исследования.

Цель исследования – оценка влияния различных доз хлорида лития на фосфорилирование GSK-3 β и выживаемость животных на модели ишемического инсульта.

Методика

Исследование выполнено в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными европейским научным фондом и Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным. Протокол проведения эксперимента утвержден локальным Этическим комитетом ФГБНУ НИИОПП. В работе использовались беспородные крысы самцы массой $315 \pm 11,5$ г. С целью моделирования фокальной ишемии использована классическая модель ишемии Лонга [10]. С целью исключения субъективных предпочтений на формирование экспериментальных групп, распределение животных осуществляли методом модифицированной блочной рандомизации [11]. Все животные, включенные в исследование, случайным образом размещались в ячейках блока рандомизации (число ячеек блока рандомизации кратно числу групп в эксперименте). Далее, пользуясь генератором случайных чисел, составлялся перечень данных, включающий номера ячеек с животными и соответствующие им номера групп, куда были помещены животные [12]. На каждом этапе каждое животное было маркировано нанесением перманентного маркера на основание хвоста. В соответствии с нанесённой отметкой каждому животному был присвоен индивидуальный номер.

Животные были разделены на 5 групп. Группа I ($n=9$, средняя масса $311,3 \pm 12,4$ г) состояла из ложнооперированных животных, которым был выполнен срединный разрез кожи по линии проекции трахеи с дальнейшим выделением общей сонной артерии, после чего рана была послойно ушита и обработана антисептиком. Группа II являлась контрольной ($n=5$, средняя масса $307 \pm 11,3$ г). Животным выполнялась окклюзия среднемозговой артерии с целью моделирования

фокальной церебральной ишемии. В данной группе на протяжении 7 сут ежедневно однократно внутривенно вводился раствор NaCl 0,9% из расчета 1,5 мл/кг, что было сопоставимо с объёмом вводимого препарата в остальных группах. Группа III ($n=5$, средняя масса $308 \pm 12,6$ г) – животным после моделирования фокальной ишемии однократно ежедневно вводился хлорид лития в дозе 4,2 мг/кг внутривенно. В группах IV и V ($n=5$ в каждой группе, средняя масса 304–308 г) животным после окклюзии ежедневно, так же на протяжении 7 сут, однократно внутривенно вводился хлорид лития в дозе 21 и 63 мг/кг соответственно.

В завершающее исследование входили животные, выжившие в течении 7 сут. Изначально в каждую группу было включено большее количество животных. Исходное количество животных было сформировано исходя из поправок на предполагаемую летальность. При расчете дозировок хлорида лития учитывались полученные ранее данные о хронической и острой токсичности препарата [8]. В ряде работ [13, 14] авторы указывают дозу карбоната лития 45 мг/кг (1,5 ммоль/кг) как предельно-допустимую. Эквивалентная доза хлорида лития составляет 63 мг/кг, которая и являлась максимальной в рамках проводимого эксперимента. При использовании как карбоната лития в дозе 45 мг/кг, так и хлорида лития в дозе 63 мг/кг, количество активного вещества (Li) составляет 8,6 мг/кг. Доза хлорида лития 21 мг/кг была эквивалента 0,5 ммоль/кг, а 4,2 мг/кг была эквивалентна 0,1 ммоль/кг и взята для определения возможности качественной реализации нейропротекторного эффекта.

На 7-е сут крысы подверглись гуманной эвтаназии с применением диоксида углерода CO₂ с последующим обескровливанием из полостей сердца. Данный метод осуществлялся в соответствии с Директивой Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях от 22 сентября 2010 г. [15].

Вестерн-блоттинг выполнялся по следующей схеме [16]. Образцы ткани мозга в количестве 500 мг были забраны в перифокальной зоне ишемического инсульта у 20 (по 5 образцов из группы контроля, а так же групп с введением хлорида лития в дозах 4,2 мг/кг, 21 мг/кг и 63 мг/кг) животных, а так же у 9 животных из ложнооперированной группы. Определение сигнальной киназы было выполнено методом вестерн-блоттинга с антителами против p-GSK-3 β (все антитела производства – Cell Signaling, США) на спектрофотометре Hitachi-557 (Hitachi Ltd., Япония), с блоттинг-панелью SuperSignal West Pico (ThermoFisher, США).

Мозг крыс лизировали в горячем буфере (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 10% глицерина; 50 mM ДТТ, 0,01% бромфенолового синего) в течение 4 мин при 94 °C. Белки разделяли в 12%-ном ПААГ и переносили на PVDF-мембраны (Amersham, США). Далее 5% БСА в буфере ТБСТ (25 mM Tris pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween20) блокировали сайты неспецифического связывания. Затем мембраны инкубировали в течение ночи при температуре +4 °C с антителами в 5% растворе БСА/ТБСТ (антитела против β -актина, ГАФД, p-38, фосфо-p38, p-ERK1/2, p-GSK-3 β , все – Cell Signaling, США). Со вторыми антителами (против мышинных или кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированных с пероксидазой хрена и разведенных в 5% растворе БСА/ТБСТ) мембраны инкубировали в течение 1 ч. Визуализацию проводили набором SuperSignal West Pico (ThermoFisher, США). Для денситометрического анализа использовали программу ImageJ. Содержание фосфорилированной формы GSK-3 β выражали в условных единицах хемиллюминесценции (у.е.л).

Для статистического анализа использовали программы Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.) и MedCalc 12.5.0.0 (MedCalc Software bvba). Описательные статистики представлены медианой с межквартильным интервалом (для количественных переменных) и абсолютными частотами с указанием относительных частот в процентах (для категориальных переменных). Межгрупповые различия количественных показателей оценивали при помощи Н-критерия Краскела–Уоллиса с дальнейшим попарным сравнением U-критерием Уитни–Манна, точный критерий Фишера использован для сравнения частот. Различия принимались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$, использованный критический уровень значимости при использовании поправки Бонферрони для множественных сравнений указан в таблицах.

Результаты

Исследование показало, что концентрация хлорида лития 4,2 мг/кг оказывала минимальное влияние на уровень фосфорилированной формы GSK-3 β по отношению к контрольной группе. При дозе 21 мг/кг эффект был более отчетливым, а при введении препарата в дозе 63 мг/кг уровень p-GSK-3 β был максимально приближен к группе ложнооперированных животных, что свидетельствовало о высоком адаптивном потенциале головного мозга. В контрольной группе уровень p-GSK-3 β снизился на 69,28% относительно группы ложнооперированных животных, что косвенно позволяет предположить выраженное

снижение адаптивного потенциала в зоне поражения и, как следствие, увеличение как объёма инсульта, так и тяжести последствий. В группе III (LiCl 4,2 мг/кг) уровень p-GSK-3β по отношению к ложнооперированным животным был ниже на 58,12%, что было значимым отличием, а тенденция к снижению уровня данного фермента также свидетельствовала об истощении адаптивных механизмов головного мозга. По отношению к контрольной группе уровень p-GSK-3β был выше на 36%, что не было статистически значимо. В группе IV (LiCl 21 мг/кг) по отношению к группе ложнооперированных животных уровень p-GSK-3β был ниже на 29%, однако с учетом поправки на множественные сравнения нельзя сделать вывод об эффективности данной дозы в рамках реализации механизмов нейропротекции. По отношению к контрольной группе уровень p-GSK-3β был выше на 130,83%, что было расценено как значимое повышение адаптивного потенциала головного мозга. В группе V (LiCl 63 мг/кг) был отмечен уровень фермента p-GSK-3β максимально приближенный к группе ложнооперированных животных (снижение на 16,65%), а также наиболее существенное увеличе-

ние по отношению к контрольной группе (уровень p-GSK-3β был выше на 171%). Полученные результаты позволяют говорить об отчетливом дозозависимом влиянии хлорида лития на уровень p-GSK-3β и, как следствие, пониженной толерантности к повреждению при ишемическом инсульте (табл. 1).

Помимо уровня p-GSK-3β нами также оценивалась летальность к 7-м суткам с определением значимости полученных различий с использованием точного критерия Фишера. Различие считалось статистически значимым при $p < 0,017$ (с учетом поправки Бонферрони). Полученные результаты представлены в табл. 2.

Обсуждение

Уровень фосфорилированной формы GSK-3β напрямую указывал на реализацию защитного эффекта хлорида лития. Данная киназа была открыта еще в 1979 г. [17], а её роль в механизмах апоптоза впервые была описана в 2000 году, когда была отчётливо показана взаимосвязь ингибирования данного фермента и гибели нейронов [18]. В более поздних работах авторы уже

Таблица 1/ Table 1

Результаты определения фосфорилированной формы GSK-3β в тканях мозга лабораторных животных. Уровень содержания p-GSK-3β в группе I принимался за 100%, в группах II-V указан % от группы I. Межгрупповые различия показателей оценивались при помощи U-критерия Уитни-Манна. Для проведения множественного сравнения между группами использовался дисперсный анализ согласно критерию Краскела-Уоллиса

Brain phosphorylated p-GSK-3β. Data are Me (Q1;Q3). p-GSK-3β in Group I was taken as 100%. For Groups II-V, values are % of Group I. Intergroup differences were assessed with the Whitney-Mann U-test. Multiple comparisons between groups were made according to the Kruskal-Wallis test for normality

| Группа | Содержание фосфорилированной киназы GSK-3β (у.е.л.) | % | p, значимость относительно ложнооперированных животных (U-критерий) ¹ | p, значимость относительно контрольных животных (U-критерий) ² |
|--|---|-----|--|---|
| Группа I (ложнооперированные) n=10 | 1558917 [1334828–1787225] | 100 | | |
| Группа II (Инсульт + 0,9% p-p NaCl) n=5 | 478798 [412786–499434] | 31 | 0,001* | |
| Группа III (Инсульт + LiCl 4,2 мг/кг) n=5 | 652799 [598344 – 878444] | 41 | 0,007* | 0,8 |
| Группа IV (Инсульт + LiCl 21 мг/кг) n=5 | 1105472 [1005400 – 1277338] | 71 | 0,04 | 0,008* |
| Группа V (инсульт + LiCl 63 мг/кг) n=5 | 1299323 [1187 556– 1375121] | 83 | 0,04 | 0,007* |
| p-value (I – V, критерий Краскела-Уоллиса) | H-Краскела-Уоллиса: 21,5 p < 0,001 | | | |

Примечание. * – различия статистически значимы. ¹Использована поправка Бонферрони (4 пары сравнений: критический p-value = 0,0125). ²Использована поправка Бонферрони (3 пары сравнений: критический p-value = 0,0167)

Note.*Significant differences. ¹Bonferroni correction was used (4 pairs of comparisons: critical p-value = 0.0125). ²Bonferroni correction was used (3 pairs of comparisons: critical p-value = 0.0167).

Показатель летальности в группах

Group mortality rate

| Индукция патологии | Препараты | Доза, мг/кг | Исход (умело/всего) |
|--------------------------|-------------------------|---------------|---------------------|
| Нет (ложнооперированные) | нет | 0 | 0/9 (0%) |
| Есть | (контроль) NaCl 0,9% | эквивалентная | 13/22 (59%) |
| | Лития хлорид | 4,2 | 8/14 (57%) |
| | «-----» | 21 | 6/15 (40%) |
| | «-----» | 63 | 4/15 (27%)* |

Примечание. * – значимая разница по отношению к контрольной группе ($p < 0,017$). Межгрупповые различия показателей оценивались при помощи точного критерия Фишера.

Note. * – significantly different from the control group ($p < 0.017$). Intergroup differences were evaluated with Fisher's exact test.

достаточно часто опирались на уровень p-GSK-3 β , когда речь шла о поиске органопротекторных эффектов у различных препаратов [19]. В результате проведенных исследований было отчетливо показано, что ингибирование GSK-3 β (перевод в фосфорилированную форму) предотвращало открытие гигантской митохондриальной поры с дальнейшим выходом проапоптотических ферментов в цитозоль клетки и, как следствие, препятствовало цитолизу [20, 21].

В ранее опубликованных исследованиях на моделях тотальной ишемии головного мозга [22, 23] и геморрагического инсульта [24] хлорид лития также продемонстрировал отчетливые нейропротекторные эффекты. Кроме того, реализация универсального цитопротекторного механизма путём прямого фосфорилирования GSK-3 β была показана на примере инфаркта миокарда [25] и гентамициновой нефротоксичности [26] у крыс. Универсальность цитопротекторного эффекта хлорида лития в целом, и нейропротекторного эффекта в частности, осуществляется благодаря 3 основным механизмам. Первый – ингибирование основного фермента в реализации механизма ишемического и фармакологического прекодиционирования GSK-3 β с переводом его в фосфорилированную форму [19]. Второй – инактивация NMDA-рецепторов, что приводит к снижению активности проапоптотического белка p53 и повышение активности анти-апоптотических белков Bcl2 [8]. Третий механизм – активация сигнального пути PI3K/Akt, отвечающего за выживание клетки [23].

Закключение

Полученные результаты в рамках проведенного исследования позволили сделать несколько важных выво-

дов: 1 – нейропротекторный эффект лития напрямую связан с вводимой дозой; 2 – реализация нейропротекции осуществляется за счет прямого ингибирования GSK-3 β , уровень которого в пораженном участке головного мозга, возможно, являлся маркером адаптивных механизмов клеток; 3 – концентрация 63 мг/кг, являющаяся пороговой при определении токсичности, оказывала наиболее выраженный эффект, что потенциально может способствовать дальнейшему изучению использования лития как нейропротектора; 4 – дозы в 4,2 мг/кг и 21 мг/кг не оказывали существенного влияния на итоговую летальность, в отличие от дозы 63 мг/кг, при применении которой она была значимо ниже по отношению к контрольной группе.

Литература

(п.п. 1-7; 9-14; 16-22; 24 см. References)

- Плотников Е.Ю., Силачев Д.Н., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Янкаускас С.С., Зоров С.Д. и др. Соли лития – простые, но магические (обзор). *Биохимия*. 2014; 79(8): 932–43. <https://doi.org/10.1134/S0006297914080021>
- Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях* / пер. с англ. Под ред. М.С. Красильщиковой, И.В. Белозерцевой. 2012. URL: <https://docplayer.ru/49033909-Direktiva-2010-63-eu-evropeyskogo-parlamenta-i-soveta-evropeyskogo-soyuza.html>
- Острова И.В., Гребенчиков О.А., Голубева Н.В. Нейропротективное действие хлорида лития на модели остановки сердца у крыс. *Общая реаниматология*. 2019; 15(3): 73–82. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2019-3-73-82>
- Гребенчиков О.А., Лобанов А.В., Шайхутдинова Э.Р., Кузовлев А.Н., Ершов А.В., Лихванцев В.В. Кардиопротекторные свойства хлорида лития на модели инфаркта миокарда у крыс. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2019; 23(2): 43–9. <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2019-2-43-49>

26. Черпаков Р.А., Гребенчиков О.А., Плотников Е.Ю., Лихванцев В.В. Сравнительная эффективность фармакологического preconditionирования на основе Даларгина и лития на модели гентамициновой нефротоксичности. *Анестезиология и реаниматология*. 2015; 60(1): 58–63.

References

- Roth G.A., et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update from the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol*. 2020; 76(25): 2982-3021. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>
- Cucchiara B., Elm J., Easton J.D., Coutts S.B., Willey J.Z., Biros M.H., et al. Disability After Minor Stroke and Transient Ischemic Attack in the POINT Trial. *Stroke*. 2020; 51(3): 792-9. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.119.027465>
- Muresanu D.F., Strliciu S., Stan A. Current Drug Treatment of Acute Ischemic Stroke: Challenges and Opportunities. *CNS Drugs*. 2019; 33(9): 841–7. <https://doi.org/10.1007/s40263-019-00663-x>
- Johnson G., Gershon S. Early North American research on lithium. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*. 1999; 33: 48–53. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1614.1999.000668.x>
- Lin H.C., Tsai S.Y., Lee H.C. Increased risk of developing stroke among patients with bipolar disorder after an acute mood episode: A six-year follow-up study. *Journal of Affective Disorders*. 2007; 100(1-3): 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2006.09.016>
- Lan C.C., Liu C.C., Lin C.H., Lan T.Y., McInnis M.G., Chan C.H., et al. A reduced risk of stroke with lithium exposure in bipolar disorder: a population-based retrospective cohort study. *Bipolar Disorders*. 2015; 17(7): 705–14. <https://doi.org/10.1111/bdi.12336>
- Ren M., Senatorov V.V., Chen R.W., Chuang D.M. Postinsult treatment with lithium reduces brain damage and facilitates neurological recovery in a rat ischemia/reperfusion model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; 100(10): 6210–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0937423100>
- Plotnikov E.Y., Silachev D.N., Zorova L.D., Pevzner I.B., Jankauskas S.S., Zorov S.D., et al. Lithium salts – simple but magic. *Biochemistry (Mosc)*. 2014; 79(8): 932–43. (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0006297914080021>
- Li X., Bijur G.N., Jope R.S. Glycogen synthase kinase-3beta, mood stabilizers, and neuroprotection. *Bipolar Disord*. 2002; 4(2): 137-44. <https://doi.org/10.1034/j.1399-5618.2002.40201.x>
- Longa E.Z., Weinstein P.R., Carlson S., Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989; 20(1): 84–91. <https://doi.org/10.1161/01.str.20.1.84>
- Altman D.G., Bland J.M. How to randomize. *BMJ*. 1999; 11(319): 703-4. <https://doi.org/10.1136/bmj.319.7211.703>
- Bland M. An Introduction to Medical Statistics (3rd edition). *Oxford Medical Publications*. 2000.
- Izsak J., Seth H., Iljin M., Theiss S., Ågren H., Funa K., et al. Differential acute impact of therapeutically effective and overdose concentrations of lithium on human neuronal single cell and network function. *Transl Psychiatry*. 2021 May 12; 11(1): 281. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01399-3>
- Van Deun K., Hatch H., Jacobi S., Köhl W. Lithium carbonate: Updated reproductive and developmental toxicity assessment using scientific literature and guideline compliant studies. *Toxicology*. 2021 Sep; 461: 152907. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152907>
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union on the protection of animals used for scientific purposes. [Direktiva 2010/63/EU Evropejskogo Parlamenta i Soveta Evropejskogo Soyuza po okhrane zivotnykh, ispol'zuemykh v nauchnykh tselyakh] / Ed. M.S. Krasil'shchikovoy, I.V. Belozertsev. 2012; 48. (in Russian) URL: <https://docplayer.ru/49033909-Direktiva-2010-63-eu-evropejskogo-parlamenta-i-soveta-evropejskogo-soyuza.html>
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America journal*. 1979; 76(9): 4350 – 4. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
- Itarte E., Huang K.P. Purification and properties of cyclic AMP-independent glycogen synthase kinase 1 from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1979; 254(10): 4052-7.
- Hetman M., Cavanaugh J.E., Kimelman D., Xia Z. Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci*. 2000; 20(7): 2567-74. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-07-02567.2000>
- Juhaszova M., Zorov D.B., Kim S.H., Pepe S., Fu Q., Fishbein K.W., et al. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest*. 2004; 113(11): 1535-49. <https://doi.org/10.1172/JCI19906>
- Kelly S., Zhao H., Hua Sun G., Cheng D., Qiao Y., Luo J., et al. Glycogen synthase kinase 3beta inhibitor Chir295 reduces neuronal death resulting from oxygen-glucose deprivation, glutamate excitotoxicity, and cerebral ischemia. *Exp Neurol*. 2004; 188(2): 378-86. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.04.004>
- Plotnikov E.Y., Grebenchikov O.A., Babenko V.A., Pevzner I.B., Zorova L.D., Likhvantsev V.V., et al. Nephroprotective effect of GSK-3β inhibition by lithium ions and δ-opioid receptor agonist dalargin on gentamicin-induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett*. 2013; 220(3): 303-8. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.04.023>
- Yan X.B., Wang S.S., Hou H.L., Ji R., Zhou J.N. Lithium improves the behavioral disorder in rats subjected to transient global cerebral ischemia. *Behav Brain Res*. 2007; 177(2): 282-9. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.11.021>
- Ostrova I.V., Grebenchikov O.A., Golubeva N.V. Neuroprotective Effect of Lithium Chloride in Rat Model of Cardiac Arrest. *General Reanimatology*. 2019; 15(3): 73-82. (in Russian). <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2019-3-73-82>
- Liu Z., Li R., Jiang C., Zhao S., Li W., Tang X. The neuroprotective effect of lithium chloride on cognitive impairment through glycogen synthasekinase-3β inhibition in intracerebral hemorrhage rats. *Eur J Pharmacol*. 2018; 840: 50-9. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.10.019>
- Grebenchikov O.A., Lobanov A.V., Shayhutdinova E.R., Kuzovlev A.N., Ershov A.V., Likhvantsev V.V. Cardioprotective effect of lithium chloride on a rat model of myocardial infarction. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokirurgiya*. 2019; 23(2): 43-9. (in Russian). <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2019-2-43-49>
- Cherpakov R.A., Grebenchikov O.A., Plotnikov E.JU., Likhvantsev V.V. Comparison of pharmacological renal preconditioning with dalargin and lithium ions in the model of gentamycin-induced acute renal failure. *Russian Journal of Anaesthesiology and Reanimatology*. 2015; 60(1): 58-63. (in Russian)

Сведения об авторах:

Черпаков Ростислав Александрович, науч. сотр. лаб. органопротекции при критических состояниях ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», врач анестезиолог-реаниматолог ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского», e-mail: rcherpakov@fnkcrf.ru;

Кузовлев Артём Николаевич, доктор мед. наук, заместитель директора — руководитель НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского;

Макаревич Дмитрий Геннадьевич, канд. мед. наук, зав. отд-нием анестезиологии—реаниматологии, врач-анестезиолог-реаниматолог ГБУЗ «Городская клиническая больница им. В.П. Демикова» Департамента здравоохранения города Москвы»;

Лобанов Александр Владимирович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИОПП;

Ершов Антон Валерьевич, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. экспериментальных исследований ФНКЦ РР; проф. каф. паталогической физиологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);

Гребенчиков Олег Александрович, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. органопротекции при критических состояниях ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии»; вед. науч. сотр. отд-ния реаниматологии ГБУЗ МО МОНИКИ ИМ. М.Ф. Владимирского.