

УДК 636.028:57(.084+.085):546.34:616-003.96

НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ И АДАПТОГЕННЫЙ ЭФФЕКТЫ АСКОРБАТА

ЛИТИЯ: ИССЛЕДОВАНИЯ НА *in vivo* МОДЕЛЯХ И *in vitro*

¹Остренко К.С., ²Громова О.А., ²Пронин А.В., ³Торшин И.Ю., ⁴Хаспеков Л.Г.,
⁴Стельмашук Е.В., ⁴Александрова О.П., ¹Галочкина В.А., ¹Галочкин В.А.

¹ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных», Боровск Калужской обл.,;
²Ивановская государственная медицинская академия, Иваново; ³Московский физико-
технический институт (государственный университет), Москва; ⁴Научный центр
неврологии, Москва, Российская Федерация

Защитные свойства аскорбата лития (АЛ) исследованы *in vivo* в трёх экспериментах, проведенных на 5 группах двухмесячных крыс линии Вистар в условиях транспортного и иммобилизационного стресса: I группа – модель стресса, контроль (крысы получают воду); II – модель стресса, доза АЛ – 120 мг/кг веса; III – модель стресса, АЛ – 60 мг/кг; IV – модель стресса, АЛ – 30 мг/кг; V – интактные крысы (без модели стресса). В группах II-IV АЛ вводили однократно ежедневно через 2 ч после утреннего кормления в виде водного раствора через зонд, объем введения – 1,5 мл. В тесте иммобилизационного стресса животных подвешивали на 24 ч, затем производили отбор крови, производили декапитацию, вскрывали брюшную полость и подсчитывали количество язв на внутренней поверхности желудка. В тесте транспортного стресса крыс помещали в клетки, закрепленные на лабораторном шуттере, на 240 минут. По окончании теста в сыворотке крови определяли активность аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы и содержание креатинина. В исследованиях *in vitro* использовали 7-8-суточные культуры зернистых нейронов мозжечка, подвергнутых цитотоксическому действию глутамата (100 мМ). В экспериментах *in vivo* под действием АЛ уровень адреналина и норадреналина в крови снижался против контроля ($P < 0,05$) на фоне постоянства пула эозинофилов, улучшались показатели адаптации животных в тестах иммобилизационного и транспортного стресса. Показан выраженный нейропротекторный эффект АЛ при цитотоксическом действии глутамата *in vitro* во всём исследованном диапазоне концентраций (0,1-1,0 мМ). Полученные данные свидетельствуют о выраженных адаптогенных свойствах аскорбата лития при стрессовых воздействиях в условиях *in vivo* и *in vitro* и о тесной связи между стрессом и нейродеструктивными процессами на клеточном уровне. Результаты исследований расширяют представления о нейропротективном потенциале препаратов лития, показанном ранее в экспериментах на культурах клеток головного мозга.

Ключевые слова: крысы, стресс, эксайтотоксичность, клеточные культуры, аскорбат лития, нейропротекторные эффекты

Проблемы биологии продуктивных животных, 2017, 3: 37-47

Введение

Стресс – состояние повышенного напряжения организма, возникающее при отсутствии адекватной адаптивной реакции на стимулы окружающей среды (стрессоры). В норме их воздействие вызывает мобилизацию адаптационных возможностей организма. Когда вследствие тех или иных причин сопротивляемость организма снижается, наступает так называемая «стадия истощения» (дистресс по Г. Селье), длительная пролонгация которой может провоцировать развитие патологий (Селье 1979). Хронический стресс снижает жизнеспособность нейронов и ведет к нейродегенерации. Даже умеренный хронический стресс приводит к появлению таких признаков нейродегенерации, как нарушение синаптической передачи, накопление бета-амилоида и гиперфосфорилирование тау-белка (Nemanth Kumar et al., 2012; Cuadrado-

Tejedor et al., 2011, Qiao et al., 2014, AbdAlla et al., 2015). Эти эффекты реализуются на фоне избыточной активации глутаматных NMDA-рецепторов, что приводит к эксайтотоксической гибели нейронов (Hynd et al., 2004).

Одним из факторов, способствующих развитию стресса, является недостаточность микронутриентов, в частности, лития. Литий – эссенциальный микроэлемент, необходимый для нормального функционирования нервной системы. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о его нейротрофических и нейропротекторных эффектах. Применение препаратов лития повышает синтез нейротрофических факторов, препятствует гибели нейронов через модуляцию каскада апоптоза PI3K/Akt/GSK3. Литий способствует ускорению роста нейронов и повышению их устойчивости к окислительному стрессу (Allagui et al., 2009), улучшению пространственной памяти, предотвращает негативное влияние на нее хронического стресса (Sharifzadeh et al., 2007). Применение лития вызывает увеличение объема серого вещества мозга (Acheson et al., 1995; Moore et al., 2000; Lyoo et al., 2010).

Цель данного исследования – изучить нейропротекторные свойства аскорбата лития в *in vitro* моделях стресса и *in vivo*.

Материал и методы

Защитные свойства аскорбата лития (АЛ) исследованы *in vivo* на двухмесячных крысах линии Вистар в условиях транспортного и иммобилизационного стресса и *in vitro* – в культуре зернистых нейронов мозжечка, подвергнутых цитотоксическому действию глутамата.

Исследование in vivo. Задачей была оценка защитных эффектов парентерального введения АЛ в различных дозировках на моделях стресса. Было сформировано 5 групп по 36 животных в каждой: I группа – модель стресса, контроль (крысы получают воду); II – модель стресса, доза АЛ – 120 мг/кг веса; III – модель стресса, АЛ – 60 мг/кг; IV – модель стресса, АЛ – 30 мг/кг; V – интактные крысы (без модели стресса). За 7 сут. до начала эксперимента животных выдерживали в карантине. Крысы всех групп содержались в стандартных условиях вивария, в клетках по 18 животных. Корм – премикс ПЛЖ (в соответствии с ГОСТ Р 50258-92), подстилка – мелкая сухая стружка. АЛ в группах II-IV вводили однократно ежедневно через 2 ч после утреннего кормления, в виде раствора через зонд; в качестве растворителя использовали воду для инъекций («Буфус Новосибхимфарм»), объем введения – 1,5 мл. В группах 2-4 АЛ вводили в течение 3-х недель. На 7, 14 и 21 дни введения для определения защитного эффекта проводили тесты на подвешивание и имитацию транспортного стресса.

Тест подвешивания. Животное подвешивали на 24 ч, после завершения эксперимента производили забор крови из подъязычных сосудов. Для определения числа эозинофилов в капиллярной крови по методу Дункера забор проводили после отсечения кончика хвоста. Метод основан на сохранении эозинофилов в растворе ацетона, при котором все остальные клетки крови разрушаются. Подсчет клеток проводили в камере Горяева не позднее чем через 30 мин после забора крови. Количество эозинофилов подсчитывали в 100 больших квадратах и умножали на 50, что соответствует их количеству в 1 мкл. В сыворотке крови определяли содержание адреналина и норадреналина. По 6 отобранных животных из каждой группы помещали в эксикатор с диэтиловым эфиром и проводили спинальную декапитацию для обследования брюшной полости и подсчета количества язв на слизистой желудка.

Тест имитации транспортного стресса. На площадке универсального вращающегося шейкера Unimax-1010 закрепляли клетку, в которую помещали 5 животных, находящихся в свободном состоянии. Последовательно проводили 3 эксперимента с интервалами в 7 сут. по 240 мин. каждый, при скорости вращения 120 об/мин. По окончании теста производили забор крови, в сыворотке крови определяли активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), содержание креатинина (автоматический биохимический анализатор «Konelab-20i», Финляндия - США).

Тест «открытое поле» (ТОП). Регистрировали горизонтальную и вертикальную двигательную активность на протяжении 5 мин (количество пересеченных квадратов и количество вертикальных стоек), груминг, обнюхивание отверстий, дефекацию. Кроме того, наблюдали за такими моторными отклонениями, как шаткость походки, тремор и т.п.

Исследование in vitro. Использованы 7-8-суточные культуры, полученные методом ферментно-механической диссоциации клеток мозжечка 7-дневных крыс по (Sassi et al., 2002). Крыс умерщвляли летальной дозой эфирного наркоза, после чего 5 мин стерилизовали 70% этанолом, извлекали мозжечок и переносили его в пластиковую чашку Петри с фосфатным буфером, лишенным ионов кальция и магния. Фрагменты ткани инкубировали 15 мин при 37°C в фосфатном буфере, содержащем 0,05% трипсина, 0,02% ЭДТА и 0,8% глюкозы. После инкубации ткань промывали в двух сменах фосфатного буфера и затем один раз – в питательной среде культивирования, в которой ткань подвергали механической диссоциации. Состав среды: 90% среды Игла, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамина, 5 мМ KCl и 10 мМ буфера Hepes, pH 7,2-7,4.

Суспензию клеток центрифугировали в течение 1 минуты, супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в питательной среде. Культивирование производили в 96-луночных пластиковых планшетах, покрытых полиэтиленгликолем или полилизинном, в питательной среде, в которой уровень хлорида калия был доведен до 25 мМ. В каждую ячейку планшета добавляли по 0,1 мл суспензии клеток.

Культивирование производили в течение 7-8 сут. в инкубаторе, заполненном газовой смесью (95% воздуха и 5% CO₂), при температуре 35,5°C и относительной влажности 98%. К этому сроку культивированные зернистые нейроны (КЗН) достигают своей морфологической и нейрохимической зрелости. Состояние культур контролировали ежедневно путем визуального просмотра в инвертированном микроскопе при фазовом контрасте.

Раствор АЛ готовили из нового сухого вещества непосредственно перед внесением в среду культивирования. Раствор стерилизовали фильтрацией и добавляли в питательную среду однократно (на вторые сутки) на весь срок культивирования (до 7 сут.). В части экспериментов АЛ добавляли в среду на 7-е сут. культивирования за 3 ч до воздействия глутамата. Были выбраны следующие его концентрации: 0,1, 0,2, 0,5 и 1,0 мМ. Поскольку КЗН имеют рецепторы глутамата, а к 7-му дню культивирования происходит их созревание, их гиперстимуляция с помощью экзогенного глутамата вызывает гибель КЗН, что является удобной моделью нейродегенерации. Глутамат (Sigma, USA, N.G-1626) при добавлении к культурам на 7-е сут. культивирования оказывал дозозависимый токсический эффект (рис. 1). Выбор концентрации глутамата проводили в каждом опыте таким образом, чтобы выживаемость КЗН на 7 сут. составляла 30-80% от контроля. Такой диапазон выживаемости позволяет выявить действие различных веществ на выраженность дегенерации клеток. При выживаемости менее 30% или более 80% нейропротективные эффекты могут не обнаружиться. Использовали подсчет клеток при действии потенциальных нейропротекторов, добавляя в питательную среду подобранные токсические концентрации глутамата (50-250 мкМ).

Статистический анализ. Для анализа выживаемости клеток зернистых нейронов мозжечка *in vitro* использовали построение интегральной эмпирической функции распределения (зависимость накопленных частот от относительного количества выживших клеток по 45 индивидуальным наблюдениям). В качестве результата наблюдения принималось количество клеток КЗН, выживших на 7-е сут. культивирования, выраженное в процентах от количества клеток в контрольной группе (без добавления аскорбата лития).

На каждую точку (индивидуальное наблюдение) брали по 3 культуры в каждом из трёх экспериментов, в каждой из которых фотографировали и просчитывали последовательно по 5 полей зрения (всего 45 наблюдений). Распределение количества клеток, выживших на 7-е сут., было нормальным (рис. 2). За 100% выживаемости принимали количество нейронов с неизменной морфологией в контрольных культурах

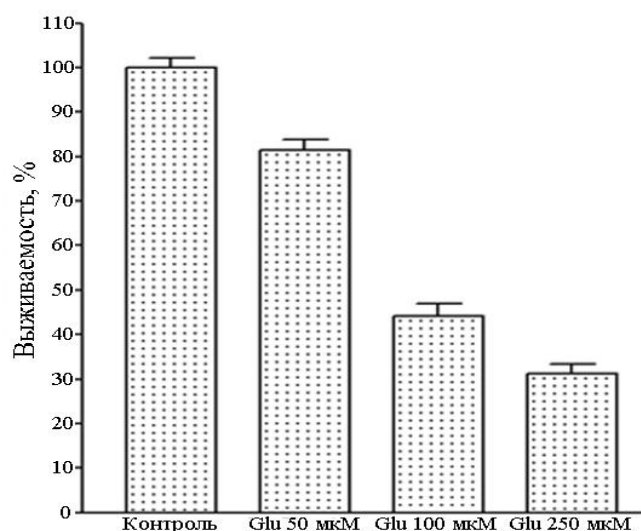


Рис. 1. Влияние глутамата (Glu) на выживаемость культуры зернистых нейронов мозжечка на 7-е сутки культивирования.

Для статистического анализа результатов исследования *in vivo* использовали однофакторный дисперсионный анализ (One Way ANOVA) с оценкой статистической значимости групповых эффектов при сравнении с контролем по критерию Данна с поправкой Бонферрони/Даннетта.

Результаты и обсуждение

Эксперименты in vivo. В тесте подвешивания количество язв желудка, которое прямо коррелировало со степенью выраженности стресса, под влиянием АЛ заметно снижалось. Более длительный прием препарата приводил к более выраженному снижению числа язв (табл 1).

Таблица 1. Количество язв желудка при проведении теста подвешивания ($M \pm SD$, $n=12$).

Группы	Дни проведения теста		
	7	14	21
1	23,5±0,9	21,2±0,2	21,2±0,2
2	4,0±0,5*	2,5±1,1	2,1±0,7
3	4,1±0,8	2,6±0,4*	2,4±0,5
4	4,5±0,9	2,4±0,2*	1,9±0,4*
5	1,0±0,1*	1,5±0,5	1,0±0,5*

Примечание: здесь и далее в табл. 2-6: *($P<0,05$) по критерию Данна при сравнении с контролем (1-я группа, модель стресса, крысы получают воду); 2-я группа – модель стресса, доза АЛ – 120 мг/кг веса; 3-я группа – модель стресса, АЛ – 60 мг/кг; 4 группа – модель стресса, АЛ – 30 мг/кг; 5-я группа – интактные крысы (без модели стресса).

Количество эозинофилов в цельной крови и концентрация катехоламинов адреналина и норадреналина являются специфическими маркерами воздействия различных стресс-факторов. С возрастанием дистресса количество эозинофилов снижается (эозинопения – характерный биомаркер стресса), а уровень адреналина и норадреналина возрастает (стресс стимулирует секрецию катехоламинов симпатическими ядрами и корой надпочечников). Применение АЛ приводило к сохранению пула эозинофилов (табл. 2) и снижению концентрации адреналина и норадреналина (табл. 3).

Модель транспортного стресса. Применение АЛ оказалось эффективным в условиях транспортного стресса, неестественного для животных и поэтому вызывающего у них выраженную поведенческую реакцию. При назначении препарата животные более активно стремились снизить неблагоприятные воздействия стресса и адаптироваться к меняющимся условиям – пытались найти место, наименее подверженное колебаниям, тесно группировались, чтобы колебания группы компенсировали колебания платформы аппарата.

Таблица 2. Количество эозинофилов в цельной крови в тесте подвешивания, $\times 10^5$ /мкл ($M \pm SD$, $n=12$).

Группы	Дни проведения теста		
	7	14	21
1	311 $\pm$ 58	285 $\pm$ 15	291 $\pm$ 2
2	768 $\pm$ 67	885 $\pm$ 38	911 $\pm$ 82
3	791 $\pm$ 12*	866 $\pm$ 94	910 $\pm$ 41*
4	764 $\pm$ 65	897 $\pm$ 72	954 $\pm$ 97
5	953 $\pm$ 29	975 $\pm$ 5*	981 $\pm$ 54*

Таблица 3. Концентрация адреналина и норадреналина в сыворотке крови в тесте подвешивания, мкг/л ($M \pm SD$, $n=12$).

Группы	Дни проведения теста					
	7		14		21	
	Адреналин	Норадреналин	Адреналин	Норадреналин	Адреналин	Норадреналин
1	27 $\pm$ 3,9	68,6 $\pm$ 1,5	28,3 $\pm$ 1,2	68,9 $\pm$ 9,41	27,7 $\pm$ 2,46	70,5 $\pm$ 3,54
2	7,6 $\pm$ 0,38*	20,2 $\pm$ 5,67	8,7 $\pm$ 3,82	20,3 $\pm$ 4,83	9,6 $\pm$ 3,28*	18,4 $\pm$ 5,27*
3	7,9 $\pm$ 0,21*	22,1 $\pm$ 1,98	7,1 $\pm$ 1,19	20,3 $\pm$ 3,49	7,3 $\pm$ 2,14*	19,3 $\pm$ 6,13
4	8,1 $\pm$ 0,52*	24,3 $\pm$ 2,2*	6,9 $\pm$ 2,77*	18,2 $\pm$ 5,28	6,9 $\pm$ 0,97*	17,9 $\pm$ 0,95*
5	6,7 $\pm$ 0,65*	18,6 $\pm$ 1,95	6,1 $\pm$ 0,51*	17,9 $\pm$ 0,85*	6,4 $\pm$ 2,42	17,2 $\pm$ 0,56*

Данные анализа крови и биохимические показатели подтвердили поведенческие критерии адаптогенной активности АЛ. Препарат способствовал сохранению пула эозинофилов в крови (табл. 4) и нормализации концентрацией АЛТ и креатинина, что указывает на снижение степени отрицательного воздействия стресса на печень (табл. 5).

Таблица 4. Количество эозинофилов в цельной крови в модели транспортного стресса, $\times 10^5$ /мкл ($M \pm SD$, $n=12$).

Группы	Дни проведения теста		
	7	14	21
1	428 $\pm$ 11	401 $\pm$ 81	425 $\pm$ 69
2	856 $\pm$ 42	901 $\pm$ 16*	907 $\pm$ 43*
3	822 $\pm$ 87	919 $\pm$ 41*	922 $\pm$ 93
4	794 $\pm$ 69	921 $\pm$ 91	928 $\pm$ 107
5	978 $\pm$ 51	991 $\pm$ 6*	979 $\pm$ 38*

Таким образом, экспериментальные данные свидетельствуют, что при пероральном введении АЛ происходит быстрая, в течение первых 7 сут, адаптация организма к использованным моделям стресса. Минимальная доза препарата (30 мг/кг) существенно не уступает по эффективности более высоким дозам (60-120 мг/кг).

Для определения степени возбуждения крыс при дистрессе использовался ТОП. Непосредственно перед исследованием животные в течение 5 дней получали АЛ. Оказалось, что препарат дозозависимо улучшает показатели двигательной и исследовательской активности и снижает выраженность дистресса (табл. 6).

Таблица 5. Концентрация в крови АЛТ и креатинина в модели транспортного стресса, Ед/мл ($M \pm SD$, $n=12$).

Группы	Дни проведения теста					
	7		14		21	
	АЛТ, ммоль/л	Креатинин, мкмоль/л	АЛТ, ммоль/л	Креатинин, мкмоль/л	АЛТ, ммоль/л	Креатинин, мкмоль/л
1	13,2 $\pm$ 5,97	19,4 $\pm$ 2,45*	13,5 $\pm$ 4,84	17,9 $\pm$ 5,31	14,0 $\pm$ 4,91	19,1 $\pm$ 2,12
2	32,4 $\pm$ 7,75	39,8 $\pm$ 6,13	31,7 $\pm$ 7,32	47,8 $\pm$ 1,46	30,1 $\pm$ 7,42	42,1 $\pm$ 2,97*
3	31,0 $\pm$ 3,15*	39,6 $\pm$ 7,98	33,1 $\pm$ 2,84*	48,3 $\pm$ 8,27	32,4 $\pm$ 6,37	45,6 $\pm$ 2,73*
4	29,8 $\pm$ 8,45	36,5 $\pm$ 3,84	32,1 $\pm$ 9,10	48,1 $\pm$ 3,82*	31,7 $\pm$ 3,14	46,3 $\pm$ 3,26*
5	36,3 $\pm$ 2,64*	48,8 $\pm$ 4,50	38,1 $\pm$ 1,49*	50,1 $\pm$ 4,86	36,9 $\pm$ 3,87*	49,2 $\pm$ 4,61

Таблица 6. Влияние аскорбата лития на поведение крыс в тесте «открытое поле» ($M \pm SD$, $n=12$).

Группы	Вертикальная двигательная активность	Горизонтальная двигательная активность	Кол-во заглядываний в отверстие	Число актов гриминга	Кол-во выходов в центральную зону	Кол-во болюсов
1	7,21 $\pm$ 2,75	3,48 $\pm$ 0,75	2,96 $\pm$ 0,42	23,47 $\pm$ 2,38	0,9 $\pm$ 0,42	6,46 $\pm$ 0,16
2	29,46 $\pm$ 3,74	6,75 $\pm$ 0,68*	9,98 $\pm$ 0,96*	8,44 $\pm$ 4,76	2,84 $\pm$ 0,14*	2,54 $\pm$ 0,68*
3	27,32 $\pm$ 2,87*	6,18 $\pm$ 0,42*	9,32 $\pm$ 3,13	9,43 $\pm$ 4,12	3,12 $\pm$ 2,17	2,12 $\pm$ 0,48*
4	17,24 $\pm$ 4,86*	5,56 $\pm$ 1,24*	4,76 $\pm$ 2,41	17,25 $\pm$ 3,61	1,21 $\pm$ 1,82*	5,14 $\pm$ 0,23*

Примечание: двигательная активность в течение 5 минут; вертикальная – количество вставаний на задние лапы (вертикальные стойки)

Исследование in vitro. Как показал анализ эмпирических функций распределения относительного количества выживших клеток с использованием теста Колмогорова-Смирнова, АЛ (без добавления глутамата) в диапазоне концентраций от 0,1 до 1,0 мМ нетоксичен для КЗН (рис. 2). При цитотоксическом действии глутамата (100 мкМ) АЛ в указанном диапазоне концентраций оказывал выраженный нейропротективный эффект. Анализ функций распределения относительного количества выживших нейронов при испытанных концентрациях АЛ выявил статистически значимое отличие от результатов, полученных при действии только глутамата (рис. 3).

Применение АЛ даже в минимальной концентрации (0,1 мМ) оказывало существенное влияние на выживаемость клеток ($P < 0,05$). При повышении концентрации выраженность различий в эмпирических функциях распределения увеличивалась, а при самой высокой концентрации (1,0 мМ) различия между глутаматной токсичностью и интактным контролем были на грани статистической значимости ($P = 0,059$). Таким образом, АЛ во всём изученном диапазоне концентраций (0,1-1,0 мМ) повышал выживаемость нейронов при глутаматном стрессе.

Анализ данных с использованием теста ANOVA показал, что выживаемость нейронов при цитотоксическом действии глутамата в присутствии АЛ в диапазоне концентраций от 0,1 до 1 мМ, начиная с концентрации 0,2 мМ достоверно дозозависимо повышалась в среднем на 12% (рис 4). При подсчете числа выживших КЗН на окрашенных препаратах (рис. 5), хорошо заметно, что присутствие АЛ в питательной среде препятствует их деструкции под воздействием глутамата.

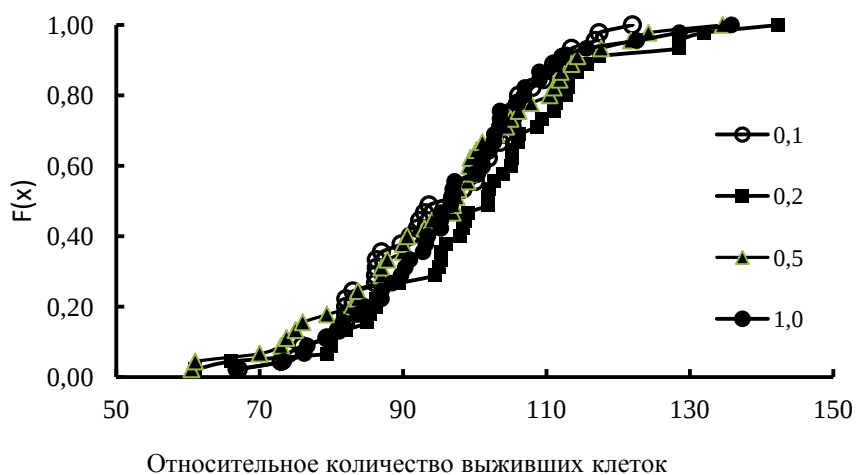


Рис. 2. Интегральная эмпирическая функция распределения (накопленные частоты по 45 индивидуальным наблюдениям), построенная по данным подсчёта относительного количества клеток (в процентах к контролю), выживших на 7-е сутки культивирования при различных концентрациях аскорбата лития (мМ), введённого в питательную среду. По тесту Колмогорова-Смирнова существенных межгрупповых различий нет.

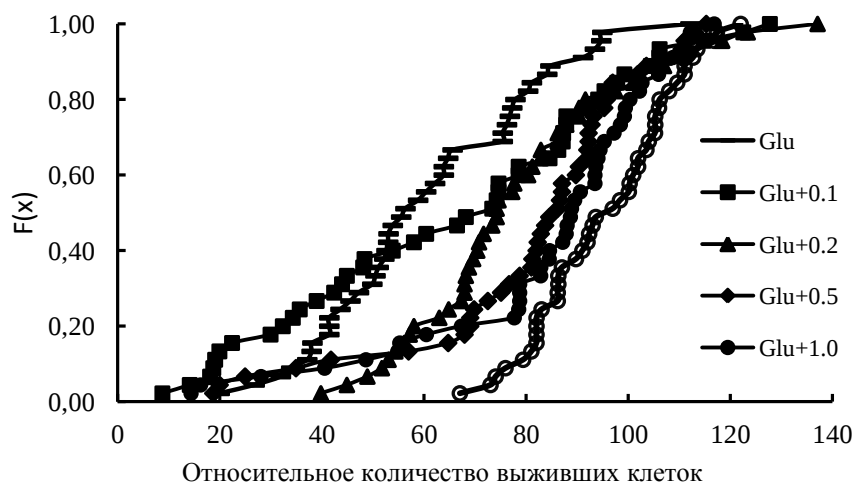


Рис. 3. Нейропротекторный эффект аскорбата лития при цитотоксическом действии глутамата (100 мМ) на клетки зернистых нейронов мозжечка. По оси ординат – интегральная эмпирическая функция распределения (накопленные частоты по 45 индивидуальным наблюдениям). По оси абсцисс – относительное количество клеток (в процентах к контролю), выживших при действии глутамата в отсутствие (Glu) и в присутствии (Glu+) аскорбата лития в диапазоне концентраций от 0,1 до 1,0 мМ. Уровни значимости различий при сравнении с контролем (Glu): Glu+0.1 – $P<0.05$; Glu+0.2 – $P<0.05$; Glu+0.5 – $P<0.01$; Glu+1,0 – $P=0.059$.

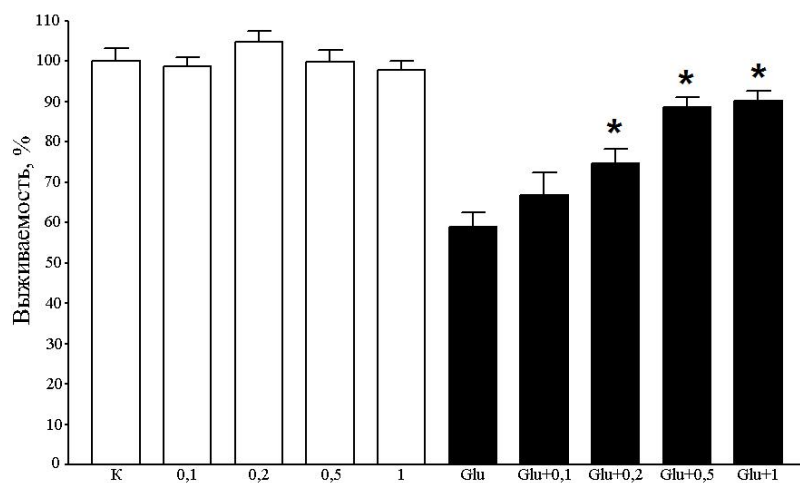


Рис. 4. Нейропротекторный эффект аскорбата лития при цитотоксическом воздействии глутамата. Белые столбики – аскорбат лития (0,1-1,0 мМ) в отсутствие глутамата, черные – в тех же концентрациях в присутствии 100 мкМ глутамата (Glu). К – контроль. Для каждого столбика просчитано по 30 полей зрения. * $P < 0,01$ по критерию Данна при сравнении с эффектом глутамата без добавления аскорбата лития.

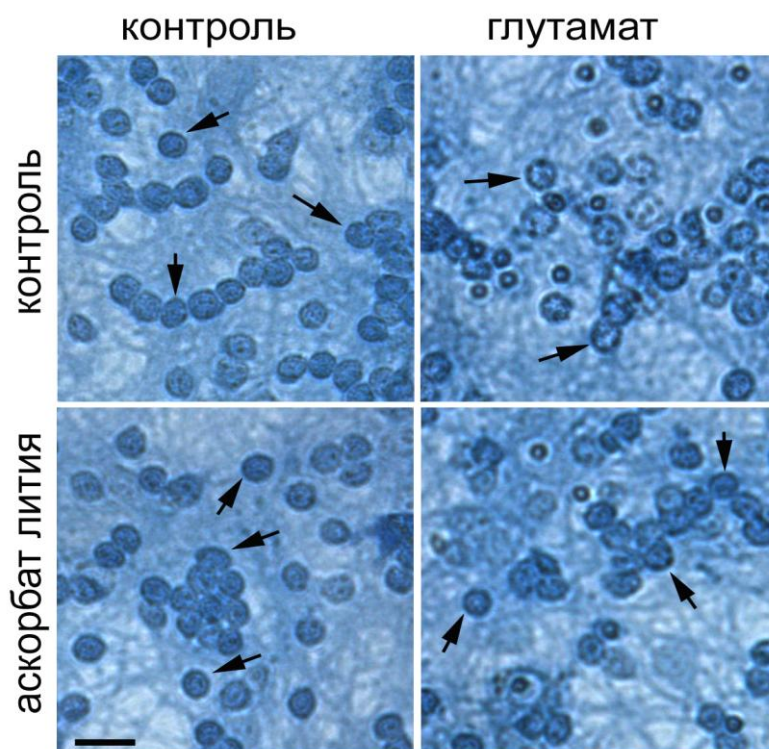


Рис. 5. Нейропротекторное действие аскорбата лития при нейротоксическом действии глутамата (100 мкМ, 24 ч) в культуре клеток. Клетки зернистых нейронов мозжечка указаны стрелками. Окраска фиксированных культур трипановым синим.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о выраженных адаптогенных свойствах аскорбата лития при стрессовых воздействиях в условиях *in vivo* и *in vitro*, и о тесной связи между стрессом и нейродеструктивными процессами на клеточном уровне. В экспериментах *in vivo* препарат способствовал сохранению пула эозинофилов и снижению уровня адреналина и норадреналина в крови, улучшал показатели адаптации животных в тестах подвешивания, открытого поля и в модели транспортного стресса. При цитотоксическом действии глутамата *in vitro* аскорбат лития во всём исследованном диапазоне концентраций (0,1-1,0 мМ) оказывал защитный эффект. Таким образом, результаты наших исследований расширяют представления о нейропротективном потенциале препаратов лития, показанном ранее в экспериментах на культурах клеток головного мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева Н.А., Стельмашук Е.В., Исаев Н.К., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Викторов И.В. Нейропротекторные эффекты ноотропного дипептида ГВС-111 при кислородно-глюкозной депривации, глутаматной токсичности и оксидативном стрессе *in vitro* // Бюлл. эксперим. биол. мед. – 2000. – Т. 130. – № 10. – С. 418-421.
2. Громова О.А., Торшин И.Ю., Гоголева И.В., Пронин А.В., Стельмашук Е.В., Исаев Н.К., Генрихс Е.Е., Демидов В.И., Волков А.Ю., Хаспеков Г.Л., Александрова О.П. Фармакокинетический и фармакодинамический синергизм между нейропептидами и литием в реализации нейротрофического и нейропротективного действия церебролизина // Журнал неврологии и психиатрии. – 2015. – № 3. – С. 65-72.
3. Селье Г. Стресс без дистресса. – М.: Прогресс, 1979. – 123 с.
4. Стельмашук Е.В., Новикова С.В., Исаев Н.К. Влияние глутамина на гибель культивированных зернистых нейронов, индуцированную глюкозной депривацией и химической гипоксией // Биохимия. – 2010. – Т. 75. – № 8. – С. 1150-1156.
5. AbdAlla S., El-Hakim A., Abdelbaset A., Elfaramawy Y., Quitterer U. Inhibition of ACE retards tau hyperphosphorylation and signs of neuronal degeneration in aged rats subjected to chronic mild stress // Biomed. Res. Int. – 2015. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/917156/>
6. Acheson A., Conover J.C., Fandl J.P., DeChiara T.M., Russell M., Thadani A., Squinto S.P., Yancopoulos G.D., Lindsay R.M. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death // Nature. – 1995;– No. 374(6521). – P. 450-453.
7. Allagui M.S., Nciri R., Rouhaud M.F., Murat J.C., El Feki A., Croute F., Vincent C. Long-term exposure to low lithium concentrations stimulates proliferation, modifies stress protein expression pattern and enhances resistance to oxidative stress in SH-SY5Y cells // Neurochem. Res. – 2009. – Vol. 34. – No. 3. – P. 453-462.
8. Franco D.R., Pérez-Mediavilla A., Garcia-Osta A. Chronic mild stress in mice promotes cognitive impairment and CDK5-dependent tau hyperphosphorylation // Behav. Brain Res. – 2011. – Vol. 220. – No. 2. – P. 338-343.
9. Hemanth Kumar B.S., Mishra S.K., Rana P., Singh S., Khushu S. Neurodegenerative evidences during early onset of depression in CMS rats as detected by proton magnetic resonance spectroscopy at 7 T // Behav. Brain Res. – 2012. – Vol. 232. – No. 1. – P. 53-59.
10. Hynd M.R., Scott H.L., Dodd P.R. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease // Neurochem. Int. – 2004. – Vol. 45. – No. 5. – P. 583-595.
11. Leeds R.R., Yu F., Wang Z., Chiu C.-T., Zhang Y., Leng Y., Linares G.R., Chuang D.-M. A new avenue for lithium: intervention in traumatic brain injury // ACS Chem. Neurosci. – 2014. – No. 5. – P. 422-433.
12. Lyoo I.K., Dager S.R., Kim J.E., Yoon S.J., Friedman S.D., Dunner D.L., Renshaw P.F. Lithium-induced gray matter volume increase as a neural correlate of treatment response in bipolar disorder: a longitudinal brain imaging study // Neuropsychopharm. – 2010. – Vol. 35. – No. 8. – P. 1743-1750.
13. Moore G.J., Bebchuk J.M., Wilds I.B., Chen G., Manji H.K. Lithium-induced increase in human brain grey matter // Lancet. – 2000. – Vol. 356. – No. 9237. – P. 1241-1242.
14. Nonaka S., Hough C., Chuang D.-M. Chronic lithium treatment robustly protects neurons in the central nervous system against excitotoxicity by inhibiting N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium influx // PNAS. – 1998. – No. 95. – P. 2642-2647.

15. Qiao H., An S.C., Ren W., Ma X.M. Progressive alterations of hippocampal CA3-CA1 synapses in an animal model of depression // *Behav. Brain Res.* – 2014. – No. 275. – P. 191-200.
16. Sassi R.B., Nicoletti M., Brambilla P., Mallinger A.G., Frank E., Kupfer D.J., Keshavan M.S., Soares J.C. Increased gray matter volume in lithium-treated bipolar disorder patients // *Neurosci. Lett.* – 2002. – Vol. 329. – No. 2. – P. 243-245.
17. Sharifzadeh M., Aghsami M., Gholizadeh S., Tabrizian K., Soodi M., Khalaj S., Ranjbar A., Hosseini-Sharifabad A., Roghani A., Karimfar M.H. Protective effects of chronic lithium treatment against spatial memory retention deficits induced by the protein kinase AII inhibitor H-89 in rats // *Pharmacology.* – 2007. – Vol. 80. – No. 2-3. – P. 158-165.

REFERENCES

1. AbdAlla S., El-Hakim A., Abdelbaset A., Elfaramawy Y., Quitterer U. Inhibition of ACE retards tau hyperphosphorylation and signs of neuronal degeneration in aged rats subjected to chronic mild stress. *Biomed. Res. Int.* 2015. (<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/917156/>)
2. Acheson A., Conover J.C., Fandl J.P., DeChiara T.M., Russell M., Thadani A., Squinto S.P., Yancopoulos G.D., Lindsay R.M. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature.* 1995, 374(6521): 450-453.
3. Allagui M.S., Nciri R., Rouhaud M.F., Murat J.C., El Feki A., Croute F., Vincent C. Long-term exposure to low lithium concentrations stimulates proliferation, modifies stress protein expression pattern and enhances resistance to oxidative stress in SH-SY5Y cells. *Neurochem. Res.* 2009, 34(3): 453-462.
4. Andreeva N.A., Stel'mashuk E.V., Isaev N.K., Ostrovskaya R.U., Gudasheva T.A., Viktorov I.V. [Neuroprotective effects of the nootropic dipeptide GVS-111 in oxygen-glucose deprivation, glutamate toxicity and oxidative stress in vitro]. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny – Bull. Exp. Biol. Med.* 2000, 130(10): 418-421.
5. Cuadrado-Tejedor M., Ricobaraza A., Del Río J., Frechilla D., Franco R., Pérez-Mediavilla A., Garcia-Osta A. Chronic mild stress in mice promotes cognitive impairment and CDK5-dependent tau hyperphosphorylation. *Behav. Brain Res.* 2011, 220(2): 338-343.
6. Gromova O.A., Torshin I.Yu., Gogoleva I.V., Pronin A.V., Stel'mashuk E.V., Isaev N.K., Genrikhs E.E., Demidov V.I., Volkov A.Yu., Khaspekov G.L., Aleksandrova O.P. [Pharmacokinetic and pharmacodynamic synergism between neuropeptides and lithium in the realization of neurotrophic and neuroprotective effects of cerebrolysin]. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova - Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry.* 2015, 3: 65-72.
7. Hemanth Kumar B.S., Mishra S.K., Rana P., Singh S., Khushu S. Neurodegenerative evidences during early onset of depression in CMS rats as detected by proton magnetic resonance spectroscopy at 7 T. *Behav. Brain Res.* 2012, 232(1): 53-59.
8. Hynd M.R., Scott H.L., Dodd P.R. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 2004, 45(5): 583-595.
9. Leeds R.R., Yu F., Wang Z., Chiu C.-T., Zhang Y., Leng Y., Linares G.R., Chuang D.-M. A new avenue for lithium: intervention in traumatic brain injury. *ACS Chem. Neurosci.* 2014, 5: 422-433.
10. Lyoo I.K., Dager S.R., Kim J.E., Yoon S.J., Friedman S.D., Dunner D.L., Renshaw P.F. Lithium-induced gray matter volume increase as a neural correlate of treatment response in bipolar disorder: a longitudinal brain imaging study. *Neuropsychopharmacol.* 2010, 35(8): 1743-1750.
11. Moore G.J., Bebchuk J.M., Wilds I.B., Chen G., Manji H.K. Lithium-induced increase in human brain grey matter. *Lancet.* 2000, 356(9237): 1241-1242.
12. Nonaka S., Hough C., Chuang D.-M. Chronic lithium treatment robustly protects neurons in the central nervous system against excitotoxicity by inhibiting N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium influx. *PNAS.* 1998, 95: 2642-2647.
13. Qiao H., An S.C., Ren W., Ma X.M. Progressive alterations of hippocampal CA3-CA1 synapses in an animal model of depression. *Behav. Brain Res.* 2014, 275: 191-200.
14. Sassi R.B., Nicoletti M., Brambilla P., Mallinger A.G., Frank E., Kupfer D.J., Keshavan M.S., Soares J.C. Increased gray matter volume in lithium-treated bipolar disorder patients. *Neurosci. Lett.* 2002, 329(2): 243-245.
15. Sharifzadeh M., Aghsami M., Gholizadeh S., Tabrizian K., Soodi M., Khalaj S., Ranjbar A., Hosseini-Sharifabad A., Roghani A., Karimfar M.H. Protective effects of chronic lithium treatment against spatial memory retention deficits induced by the protein kinase AII inhibitor H-89 in rats. *Pharmacology.* 2007, 80(2-3): 158-165.

16. Sel'e G. *Stress bez distressa* (Stress without distress). Moscow: Progress Publ., 1979, 123 p.
17. Stel'mashuk E.V., Novikova S.V., Isaev N.K. [The effect of glutamine on the death of cultivated granular neurons, induced by glucose deprivation and chemical hypoxia]. *Biokhimiya - Biochemistry*. 2010, 75(8): 1150-1156.

**Neuroprotective and adaptogenic effects of lithium ascorbate:
studies on *in vivo* models and *in vitro***

¹Ostrenko K.S., ²Gromova O.A., ²Pronin A.V., ³Torshin I.Yu., ⁴Khaspekov L.G.,
⁴Stel'mashuk E.V., ⁴Aleksandrova O.P., ¹Galochkina V.P., ¹Galochkin V.A.

¹*Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition;* ²*Ivanovo State Medical Academy, Ivanovo;* ³*Moscow Institute of Physics and Technology (State University);* ⁴*Research Center of Neurology, Moscow, Russian Federation*

ABSTRACT. The protective properties of lithium ascorbate (AL) were studied *in vivo* in three experiments conducted on 5 groups of two-month-old Wistar rats under conditions of transport and immobilization stress: group I - stress model, control (rats receive water); II - model of stress, 120 mg AL /kg BW; III - model of stress, 60 mg AL/kg; IV - model of stress, 30 mg AL/kg; V - intact rats (without stress model). In groups II-IV, AL was administered once daily 2 hours after morning feeding in the form of an aqueous solution through the esophageal tube, the volume of administration was 1.5 ml. In the immobilization stress test, the animals were hung for 24 hours, then blood probe was taken, decapitation was performed, the abdominal cavity was opened and the number of ulcers on the inner surface of the stomach was counted. In the transport stress test, the rats were placed in cells fixed on a laboratory jocker for 240 minutes. At the end of the test, the activity of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and the creatinine content were determined in blood serum. *In vitro* studies used 7-8-day cultures of granular neurons of the cerebellum, subjected to the cytotoxic effect of glutamate (100 mM). In experiments *in vivo*, the level of adrenaline and norepinephrine in the blood serum under the influence of AL decreased vs control ($P < 0.05$) against the background of a constant pool of eosinophils, and the parameters of adaptation in immobilization and transport stress tests improved. The pronounced neuroprotective effect of AL under the conditions of cytotoxic action of glutamate *in vitro* in the whole range of concentrations (0.1-1.0 mM) is shown. The obtained data indicate the expressed adaptogenic properties of lithium ascorbate under stress *in vivo* and *in vitro* and the close connection between stress and neurodestructive processes at the cellular level. The results of the research expand knowledge of the neuroprotective potential of lithium preparations, which was shown earlier in experiments on brain cell cultures.

Keywords: rats, stress, excitotoxicity, cell cultures, lithium ascorbate, neuroprotective effects

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2017, 3: 37-47

Поступило в редакцию: 27.06.2017 Получено после доработки: 01.08.2017

Остренко Константин Сергеевич, к.б.н., т. 8(910)916-66-58;
Громова Ольга Алексеевна, д.м.н., проф., т. (4932) 41-65-25;
Пронин Артем Викторович, асп., т. (4932) 41-65-25. doctormchs1978@mail.ru;
Торшин Иван Юрьевич, к.ф.-м.н., доц., т. (499) 135-2489, (4932) 41-6525;
Хаспеков Леонид Георгиевич, д.б.н., проф., зав. отд., т. (495) 917-80-07;
Стельмашук Елена Викторовна, д.б.н., в.н.с., т. (495) 917-80-07;
Александрова Ольга Петровна к.б.н., н.с., т. (495) 917-80-07;
Галочкина Валентина Петровна, д.б.н., т. 8(915)862-66-00;
Галочкин Владимир Анатольевич, д.б.н., зав. лаб., т. 8(910)523-98-22.