

Аскорбат лития улучшает адаптацию к стрессу на моделях *in vitro* и *in vivo*

Громова О.А.¹, Торшин И.Ю.², Сардарян И.С.³, Остренко К.С.⁴,
Пронин А.В.¹, Стельмашук Е.В.⁵, Хаспеков Л.Г.⁵

¹ – ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Иваново

² – БАОУ ВПО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», г. Москва

³ – ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

⁴ – ФГБНУ «ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных», Калужская обл., г. Боровск

⁵ – ФГБНУ «Научный Центр Неврологии», г. Москва

Резюме. В настоящей работе представлены результаты исследований *in vitro* и *in vivo* воздействия аскорбата лития на адаптацию к стрессу. Представлены результаты исследований нейрцитологических и экспериментальных моделей стресса. Установлен нейропротекторный эффект аскорбата лития на модели глутаматного стресса в культуре зернистых нейроцитов мозжечка. Эксперименты на моделях транспортного и иммобилизационного стресса подтвердили адаптогенное воздействие аскорбата лития.

Ключевые слова: стресс, глутаматная модель, адаптогены, аскорбат лития

Lithium ascorbate improves adaptation to stress on models *in vitro* and *in vivo*

Gromova O.A.¹, Torshin I.Yu.², Sardaryan I.S.³, Ostrenko K.S.⁴,

Pronin A.V.¹, Stel'mashuk E.V.⁵, Khaspekov L.G.⁵

¹ – FSBI HPE «Ivanovo State Medical Academy» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Ivanovo

² – Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow

³ – FSBI HPE «St. Petersburg State Pediatric Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

⁴ – All-Russian research institute of physiology, biochemistry and food of animals

⁵ – Russian Academy of Sciences, Moscow

Abstract. The paper presents the results of studies of lithium ascorbate on the models of stress *in vitro* and *in vivo*. The results show significant neuroprotective effect of lithium ascorbate on the model of glutamate stress in the culture of grainy neurocytes. Experiments on models of transport and immobilization stress confirmed the adaptogenic effects of lithium ascorbate.

Keywords: stress, glutamate models, adaptogens, lithium ascorbate

Автор, ответственный за переписку:

Громова Ольга Алексеевна – д.м.н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА МЗ России, 153000, Иваново, Шереметевский пр., 8; тел. +7 (4932) 41-65-25; e-mail: unesco.gromova@gmail.com

Введение

В норме, адаптация к неблагоприятной окружающей среде вызывает мобилизацию адаптационных возможностей и организм, таким образом, «сопротивляется» воздействию «вызовов» окружающей среды, т. е. неблагоприятных внешних факторов (стрессорам). Когда вследствие тех или иных причин адаптация организма к стрессорам нарушается наступает т. н. «стадия истощения» («дистресс»), хронизация которой стимулирует развитие различных патологий [1].

В частности, хронический стресс снижает жизнеспособность нейронов и способствует развитию нейродегенеративной патологии. Даже умеренный хронический стресс приводит к снижению синаптической передачи, повышает накопление бета-амилоида и гиперфосфорилирование тау-белка [2–4] — т. е. к характерным молекулярно-физиологическим признакам нейродегенерации. Например, в работе [5] было показано, лёгкий, но непредсказуемый хронический стресс, стимулирует гиперфосфорилирование тау-белка. Отметим, что эти эффекты осуществляются на фоне избыточной активации NMDA (глутаматных) рецепторов, что приводит к т. н. «эксайтотоксичности» и гибели нейронов [6].

Дефицит лития способствует развитию хронического стресса. Литий является эссенциальным микроэлементом, необходимым для нормального функционирования нервной системы. Значительный массив данных по клинической и экспериментальной фармакологии указывает на нейротрофические и нейропротекторные эффекты лития. Литий способствует повышению скорости роста нейронов и повышению устойчивости к окислительному стрессу [7], улучшению пространственной памяти, предотвращает негативное влияние хронического стресса на пространственную память [8]. Применение препаратов лития повышает синтез нейротрофических факторов мозга (BDNF, NGF) и, также, останавливает процессы предотвращает гибель нейронов через модуляцию

каскадов апоптоза PI3K/Akt/GSK3 (25-МФ). Клинические исследования показывают, что литиевая терапия вызывает увеличение объема серого вещества [9–11].

В настоящей работе представлены результаты исследований эффектов воздействия аскорбата лития на выживаемость нейронов в культуре в условиях глутаматного стресса и

экспериментальных исследований, указывающих на адаптогенные свойства этой формы органического лития.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования

Основной задачей экспериментального исследования являлась оценка эффективности субстанции аскорбата лития на моделях стресса при парентеральном введении препарата в различных дозировках. Воздействие стресса *in vitro* изучено на клеточных моделях в культурах зернистых нейроцитов в условиях глутаматного стресса и *in vivo* на 2-х месячных крысах линии Вистар в условиях транспортного и иммобилизационного стресса.

Было сформировано 5 групп, по 36 животных в каждой. Группы подобраны по принципу парных аналогов. За 7 сут до начала эксперимента животные выдерживались 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. 1-я группа — модель стресса, контроль (крысы получают воду); 2-я группа — модель стресса, аскорбат лития в дозе 120 мг/кг веса животного; 3-я группа — модель стресса, аскорбат лития в дозе 60 мг/кг; 4-я группа — модель стресса, дозировка аскорбата лития 30 мг/кг; 5-я группа — интактные крысы (без модели стресса).

Аскорбат лития вводился животным со 2-й по 4 группу в виде раствора посредством зондирования, в качестве растворителя используется вода для инъекций («Буфус Новосибирхимфарм»), объем введения — 1,5 мл. Раствор вводится в одно время через 2 часа после утреннего кормления. В 5-й группе применялся препарат в виде капсул.

В группах 2–4 препарат принимался в течение 3-х недель. Каждую неделю, для определения стресс-протекторного свойства соли аскорбата лития применялись стандартные стресс тесты для доклинического исследования новых лекарственных веществ: тест на подвешивание и тест на имитацию транспортного стресса.

Тест на подвешивание. Животное подвешивалось на 24 часа. После этого производился отбор цельной крови, кровь из подъязычных сосудов. Полученную цельную кровь помещали в две пробирки. Для исследования количества эозинофилов по методу Дункера использовали цельную кровь. Для определения биохимического состава крови использовалась сыворотка. В качестве биохимических показателей определились

адреналин, норадреналин. Данные показатели являются специфическими маркерами выявления воздействия стресс-факторов различной этиологии. После помещения репрезентативных животных ($n=6$) в эксикатор с диэтиловым эфиром проводилась спинальная декапитация на предмет обследования брюшной полости и подсчета количества язв на внутренней поверхности желудка.

Тест на имитацию транспортного стресса. Производился отбор 5 животных из каждой группы. В качестве модели для имитации транспортного стресса использовали Шейкер вращающий универсальный Unimax-1010. Скорость вращения 120 оборотов в минуту в течение 240 минут. На площадке закреплялась клетка, в которую помещались 5 голов животных. Крысы находились в клетке в свободном состоянии. Наблюдали изменение реакции животных при продолжительном введении препарата. Были проведены три последовательности эксперимента с периодичностью 7 дней. Продолжительность теста 240 минут. По окончании теста на основании методик, описанных выше проводилось изучение состояния организма животных. Также, определялись ферменты в сыворотке крови: аланинаминотрансфераза (АЛТ); аспартатаминотрансфераза (АСТ), креатинин.

Тест открытое поле (ОП). В тесте регистрировали горизонтальную и вертикальную двигательную активность, груминг, обнюхивание отверстий, дефекацию. Кроме того, в ОП мы наблюдали за отклонениями в моторной сфере, такими как шаткость походки, тремор и т. п.

Горизонтальная двигательная активность (ГДА) животных в ОП включает побежки по разным траекториям, вплоть до кружения вокруг одного места. Основным критерием для идентификации данной формы поведения является участие в перемещении животного всех четырех лап. Регистрируют ГДА на периферии, в 2/3 и в центре арены.

Вертикальная двигательная активность (ВДА) животных в ОП представлена двумя видами стоек: задние лапы животного остаются на полу арены, а передние упираются в стенку поля (англ. «climbing») или остаются на весу (англ. «rearing»).

Обследование отверстий (находящихся в полу арены) представляет собой обнюхивание краев отверстий или засовывание головы внутрь отверстий до уровня глаз.

Груминг животных в ОП можно условно разделить на две категории: короткий и длительный. Короткий груминг характеризуется 1–2 быстрыми круговыми движениями лап вокруг носа и небольшой области около него, а длительный — умыыванием области глаз, заведением лап за уши и переходом на умыывание всей головы, лап, боков, туловища, аногенитальной области, хвоста. Целесообразно отдельно обсчитывать число актов короткого и длительного груминга за тестовый период.

Уровень дефекации считается индексом «эмоциональности» животного. Для определения уровня дефекации (и, соответственно, эмоциональности) многие исследователи подсчитывают число болюсов, оставленных животным во время пребывания в экспериментальной установке.

Исследования на нейронах в культуре

В работе использовались 7–8-суточные культуры, полученные методом ферментно-механической диссоциации клеток мозжечка 7-дневных крыс по ранее описанной методике [12]. Крысы, подвергались летальной дозе эфирного наркоза, после чего 5 мин стерилизовались 70% спиртом. Далее у животного быстро вскрывали череп, извлекали мозжечок и переносили его в пластиковую чашку Петри, заполненную фосфатным буфером, лишённым ионов кальция и магния. Фрагменты ткани инкубировали 15 мин при 37 °С в фосфатном буфере, содержащем 0,05% трипсина, 0,02% ЭДТА и 0,8% глюкозы. После инкубации ткань промывали в двух сменах фосфатного буфера и один раз средой культивирования, далее подвергали механической диссоциации в питательной среде для культивирования. В состав питательной среды входит 90% минимальной 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 1 мин при 1 000 об/мин, супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в питательной среде. Культивирование производили в 96-луночных пластиковых планшетах, покрытых полиэтиленгликолем или полилизинном, в питательной среде, где уровень хлорида калия доведён до 25 мМ. В каждую ячейку планшета добавляют по 0,1 мл суспензии клеток.

Культивирование производили 7–8 сут в CO₂-инкубаторе, заполненном газовой смесью (95% воздуха+5% CO₂), при температуре 35,5 °С и относительной

влажности 98%. К этому сроку культивированные зернистые нейроны (КЗН) достигают своей морфологической и нейрохимической зрелости. Состояние культур контролировали ежедневно и на каждом этапе эксперимента путем визуального просмотра в инвертированном микроскопе при фазовом контрасте.

Аскорбат лития, готовился из нового сухого вещества непосредственно перед внесением в среду культивирования. Аскорбат лития взвешивали, растворяли в PBS, стерилизовали фильтрацией. Вещество добавляли в среду культивирования на 2 сут *in vitro* на весь срок культивирования (до 7 сут). Исходя из концентрации вещества в пробирке (10 мМ), его минимально возможное разведение для добавления к культурам 1:10 чтобы сохранить необходимые свойства питательной среды, т. е. 1 мМ. 96-луночные пластиковые планшеты дают возможность тестировать сразу 4 различные концентрации образцов. Были выбраны следующие концентрации: 0,1, 0,2, 0,5 и 1,0 мМ.

Количественную оценку выживаемости клеток производили с помощью прямого подсчёта живых нейронов нейронах с нормальной морфологией на фиксированных препаратах, окрашенных трипановым синим [13, 14]. 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).

На каждую точку брали по 3 культуры, в каждой из которых фотографировали и просчитывали по 5 последовательных полей зрения (как минимум 45 полей зрения из 9-и культур 3-х независимых экспериментов). Количество нейронов с неизменной морфологией в контрольных культурах принимали за 100% выживаемости. Для статистического анализа использовали тест ANOVA с поправками Бонферрони/Даннетта и непараметрический тест Колмогорова-Смирнова,

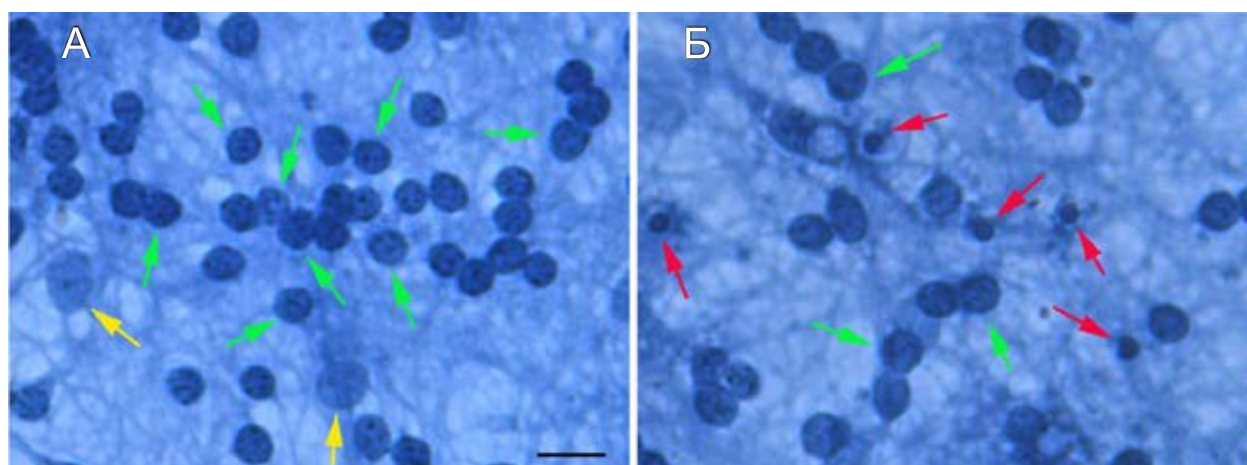


Рис. 1. Первичная диссоциированная фиксированная культура клеток мозжечка, окрашенная трипановым синим.

Примечание: А — контроль, Б — обработка 24 часа глутаматом. Зеленые стрелки указывают на зернистые нейроны с нормальной морфологией, жёлтые — на ядра глиальных клеток, красные показывают пикнотические ядра погибших нейронов. Масштаб 15 мкм

который отличается высокой чувствительностью и который применим к анализу выборок чисел вне зависимости от выполнимости условия нормальности распределения. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$. Результаты выражали как среднее $\pm$ стандартное отклонение.

Было выполнено моделирование повреждения культур нейронов глутаматом (Sigma, USA, N.G-1626). Глутамат оказывал дозозависимый токсический эффект (рис. 2). Выбор концентрации (из 3-х использованных) проводили в каждом опыте таким образом, чтобы выживаемость КЗН составляла 30–80% от контроля. Именно такая выживаемость позволяет выявлять действие различных веществ на процесс гибели клеток. При выживаемости менее 30 или более 80% нейропротекторные эффекты могут не проявиться.

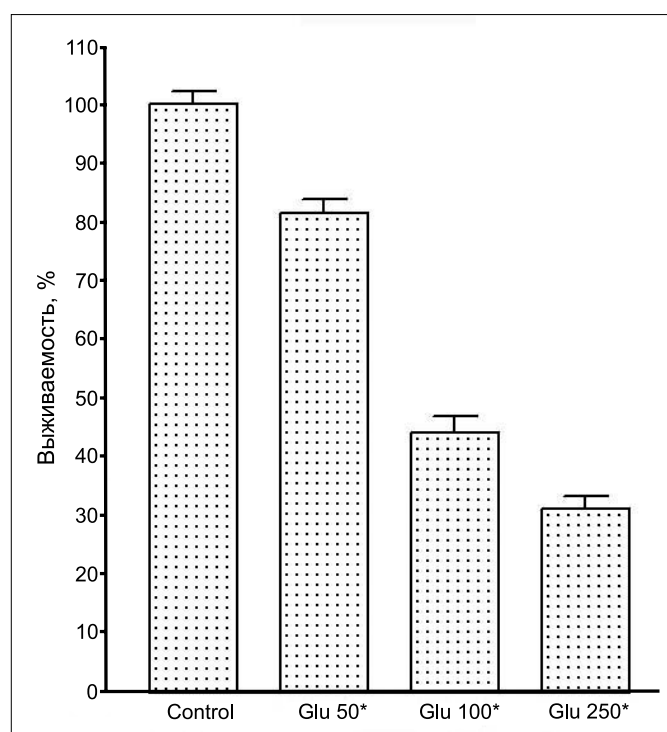


Рис. 2. Влияние глутамата на выживаемость культур (подсчет морфологически неизмененных нейронов на фиксированных окрашенных трипановым синим препаратах)

В дальнейших исследованиях использовали подсчет клеток при действии предполагаемых нейропротекторов, добавляя в питательную среду подобранные токсические концентрации глутамата (100–500 мкМ).

Результаты и обсуждение

Нейроцитологические исследования глутаматной модели стресса

Установлено, что в исследованном диапазоне концентраций (0,1...1,0 ммоль/л) аскорбат лития нетоксичен для нейронов в культуре. Более того, было достоверно подтверждено нейропротекторное

действие аскорбата лития на модели глутаматной нейротоксичности.

Анализ эмпирических функций распределения средних чисел выживших клеток посредством теста Колмогорова-Смирнова показал, что достоверных различий между распределениями чисел клеток при различных концентрациях аскорбата лития (добавляемого к нейронам без использования глутаматной модели стресса) не установлено (рис. 3). Таким образом, в исследованном диапазоне концентраций аскорбат лития не токсичен при непосредственном воздействии на нейроны.

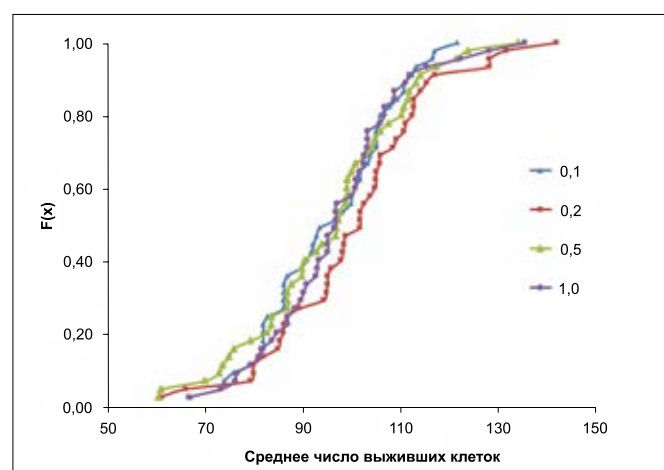


Рис. 3. Эмпирические функции распределения чисел выживших нейронов при различных концентрациях аскорбата лития (ммоль/л), без глутаматной модели стресса.

Примечание: Достоверных отличий не обнаружено

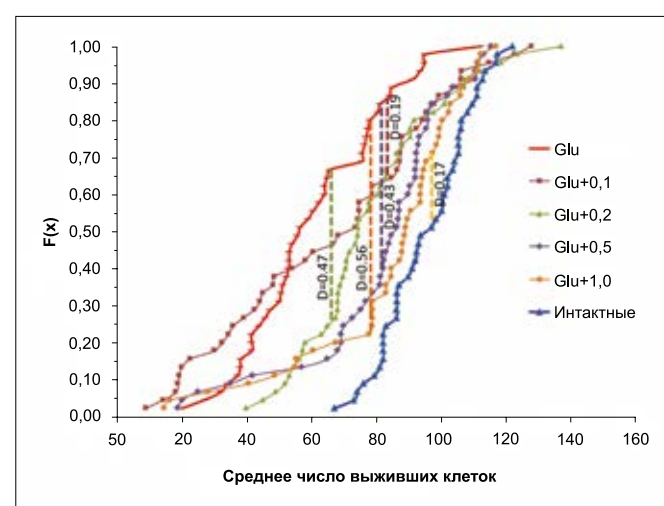


Рис. 4. Эмпирические функции распределения чисел выживших нейронов при различных концентрациях аскорбата лития (ммоль/л) в глутаматной модели стресса (100 мкМ глутамата).

Примечание: Установлены достоверные отличия (тест Колмогорова-Смирнова) для всех использованных концентраций по сравнению с глутаматной моделью без добавления аскорбата лития («Glu»). Указаны значения максимального отклонения «d», на основе которого рассчитывается статистическая достоверность отличий между функциями распределения

Анализ функций распределения средних чисел выживших нейронов (посредством теста Колмогорова-Смирнова) при создании глутаматной модели стресса показал, что результаты экспериментов при всех концентрациях аскорбата лития достоверно отличались от контроля (глутаматная модель нейронального стресса без добавления аскорбата лития, рис. 4). Так, даже использование самой низкой концентрации аскорбата лития, 0,1 ммоль/л, приводило к достоверному отличию ($d=0,19$, $p=0,049$), а при возрастании концентрации выраженность отличий возрастала (значения максимального отклонения « d » возрастали, значения « p » — падали). Более того, для самой высокой концентрации аскорбата лития (1,0 ммоль/л) отличия между глутаматной моделью и интактным контролем были на грани статистической значимости ($d=0,17$, $p=0,059$). Таким образом, аскорбат лития достоверно повышает выживаемость нейронов при глутаматном стрессе, причём во всём исследованном диапазоне концентраций соли лития (0,1...1,0 ммоль/л).

Анализ полученных данных с использованием теста ANOVA показал, что выживание нейронов достоверно повышалось, в среднем, на +12% при цитотоксическом действии глутамата после выращивания клеток с аскорбатом лития при концентрации в 0,2 мМ, причём был отмечен дозозависимый эффект ($p<0,01$, рис. 5).

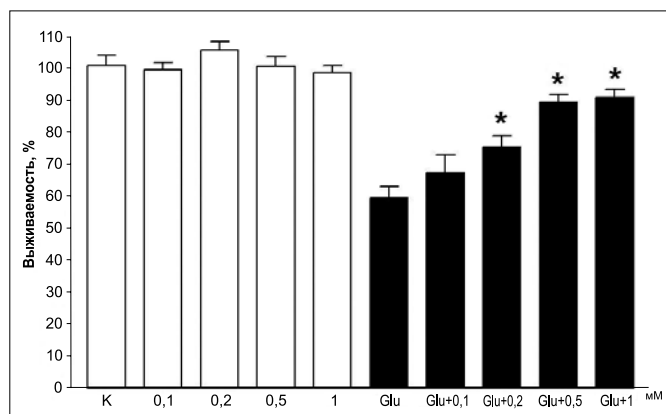


Рис. 5. Нейропротекторное действие аскорбата лития на выживаемость культур нейронов при цитотоксическом действии глутамата.

Примечание: * $p<0,01$, по сравнению с глутаматом без добавок, $n=30$, где n — количество просчитанных полей зрения. Белые «столбики» — эксперименты в отсутствие глутамата, чёрные — на фоне 100 мкМ глутамата

Также, было проведено исследование нейропротекторных свойств аскорбата лития при условии, что вещество добавлялось всего за 3 ч до воздействия глутамата. В соответствии с результатами теста ANOVA установлено защитное действие, хотя и более слабое — выживаемость нейронов достоверно повышалась на 8% при концентрации аскорбата лития в 0,5 мМ (рис. 6).

На рис. 7 приведены примеры фотографий нейронов в культуре, на основе которых проводились

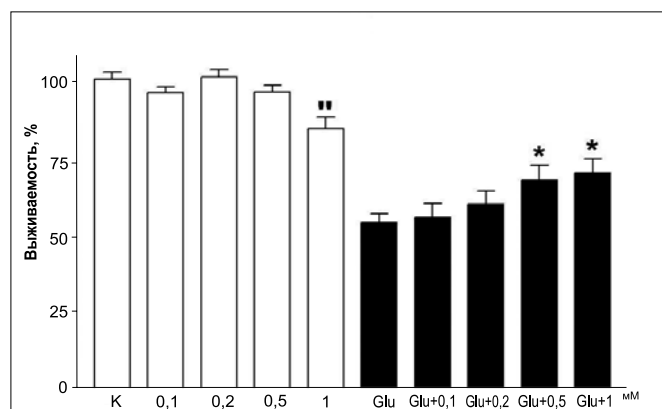


Рис. 6. Воздействие аскорбата лития, добавленного за 3 ч до глутамата на выживаемость культур.

Примечание: $n=15$, где n — количество просчитанных полей зрения. Белые столбики в отсутствие глутамата, чёрные — на фоне 100 мкМ глутамата

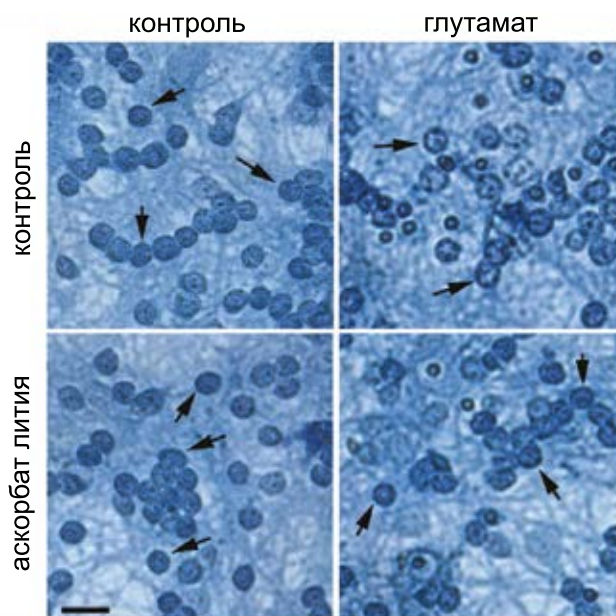


Рис. 7. Нейропротекторное действие аскорбата лития при глутаматной модели стресса (100 мкМ глутамата, 24 ч).

Примечание: Культивированные зернистые нейроны мозжечка крыс указаны стрелками. Нейроны, прошедшие апоптоз выглядят как круги темного оттенка с меньшим радиусом, чем выжившие нейроны. Окраска фиксированных культур трипановым синим. Масштабная планка — 15 мкм

подсчёты числа выживших нейронов. Очевидно, что добавление аскорбата лития в среду, на которой выращиваются нейроны, приводит к увеличению числа выживших нейронов с нормальной морфологией.

Исследование эффектов аскорбата лития именно на глутаматной модели важно именно потому, что стресс приводит к гиперактивации потока сигналов через глутаматные NMDA рецепторы и стимулирует развитие нейродегенеративных изменений. Взаимосвязь между стрессом и молекулярно-физиологическими показателями нейродегенеративных процессов была изучена, например, на модели непредсказуемого хронического стресса [5].

В эксперименте, хронический стресс (иммобилизация) в течение 4-х недель приводил к гиперфосфорилированию тау-белка. Другими признаками нейродегенерации являлось снижение уровней структурных нейрональных белков — белка, ассоциированного с микротрубочками (map2) и гамма-синуклеина (SNCG). Идентификация гиперфосфорилированного тау-белка в образцах гиппокампа с использованием антител подтвердила данные иммуногистохимии и указала на повышенный уровень гиперфосфорилированного тау-белка при стрессе по сравнению с контрольной группой (рис. 8) [5].

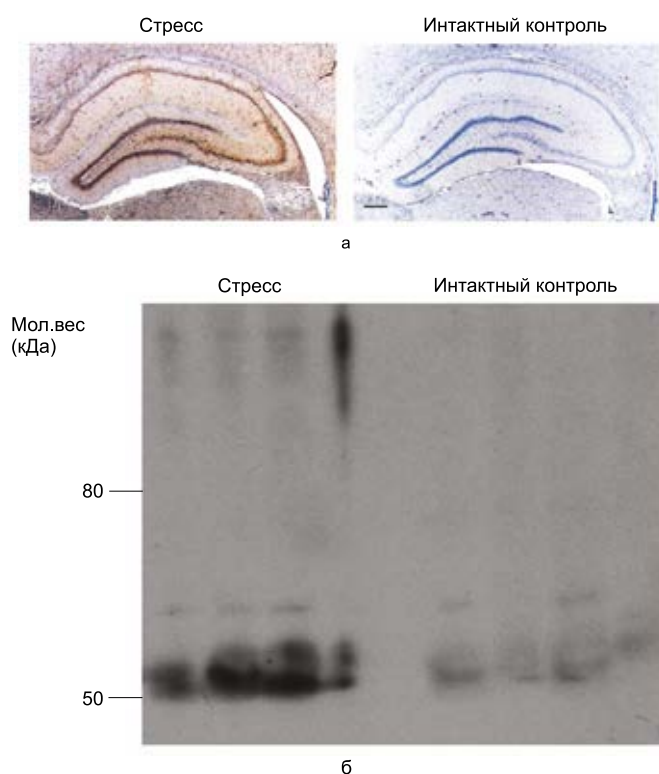


Рис. 8. Гиперфосфорилирование тау-белка в гиппокампе крыс в условиях хронического стресса.

Примечание: а — Иммуногистохимическое обнаружения гиперфосфорилированного тау-белка (анти-PHF) в гиппокампе крыс по сравнению с контролем. Окрашивание ядер гематоксилином (масштаб 200 мкм); б — Обнаружение гиперфосфорилированного тау-белка в гиппокампе крыс с использованием антител (иммуноблот) по сравнению с контрольной группой

Адаптогенные и стресс-протекторные свойства аскорбата лития в экспериментальных моделях стресса

В течение эксперимента производили взвешивание животных (табл. 1). В то время, как масса в контрольной группе наблюдалась отрицательная динамика, в интактной группе и в группах на аскорбате лития наблюдалось достоверное увеличение массы тела животных. Адекватная реакция организма на стрессы различной этиологии, накопление энергетического запаса организма приводит к повышенному увеличению мышечной ткани, без резкого увеличения подкожной клетчатки (жировой ткани), т. е. животное растёт и развивается, несмотря на воздействия стресса.

В ходе *теста на подвешивание* отмечено выраженное снижение числа язв желудка, количество которых указывает на выраженность стресса. При этом, более длительный приём препарата приводил к более выраженному снижению числа язв (табл. 2), что указывает на существенное снижение хронического стресса (дистресса) при приёме аскорбата лития.

Число эозинофилов в цельной крови и уровни катехоламинов адреналина и норадреналина являются специфическими маркерами выявления воздействия стресс-факторов различной этиологии. С возрастанием дистресса уровни эозинофилов падают (эозинопения — характерный биомаркер стресса), а уровни адреналина и норадреналина возрастают (т. к. стресс стимулирует секрецию катехоламинов симпатическими ядрами и корой надпочечников). Действительно, применение аскорбата лития существенно способствовало сохранению пула эозинофилов (табл. 3) и снижению гормонов стресса, адреналина и норадреналина (табл. 4).

Модель транспортного стресса. Транспортный стресс не является естественным для животных, поэтому реакция животных на него ярко выражена. В настоящей серии экспериментов, использование аскорбата лития показало высокую эффективность при воздействия транспортного стресса. В целом, при приёме аскорбата лития, животные старались снизить неблагоприятное воздействия и адаптироваться к меняющимся условиям: пытались найти место наименее подверженное колебаниям, группировались

Таблица 1

Динамика изменение массы тела у крыс опытных ($n=36$) и контрольной ($n=36$) групп

№ группы	Масса животных				
	1-й день	7-й день	14-й день	21-й день	Изменение массы, %
1	123,6±0,7	123,0±0,3	122,3±0,8	121,0±1,2	-2,2%
2	122,1±0,3	128,3±0,2	134,8±0,9	143,3±4,8	+17 %
3	121,5±0,6	124,9±0,5	135,4±0,5	141,7±5,6	+16 %
4	123,8±0,2	127,4±0,6	138,8±0,6	143,6±3,1	+15 %
5	124,9±0,3	131,3±0,9	137,0±0,8	146,6±5,0	+17%

Примечание: Группы: 1 — контрольная группа; 2 — 120 мг/кг аскорбата лития; 3 — 60 мг/кг аскорбат лития; 4 — 30 мг/кг аскорбат лития; 5 — интактная группа. Отличия между группами на аскорбате лития и группой контроля (1-я группа) были статистически достоверны ($p<0,05$) в соответствии с t -критерием.

Таблица 2

Количество выявленных язв в желудке при проведении теста на подвешивание

№ группы	Количество язв в желудке		
	7 день	14 день	21 день
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: Отличия между группами на аскорбате лития и группой контроля (1-я группа) были статистически достоверны ($p<0,05$) в соответствии с t -критерием.

Таблица 3

Определение эозинофилов в цельной крови по Дункеру при проведении теста на подвешивание

№ группы	Количество эозинофилов к цельной крови		
	7 день	14 день	21 день
1	311±58	285±15	291±2
2	768±67	885±38	911±82
3	791±12	866±94	910±41
4	764±65	897±72	954±97
5	953±29	975±5	981±54

Примечание: Отличия между группами на аскорбате лития и группой контроля (1-я группа) были статистически достоверны ($p<0,05$) в соответствии с t -критерием.

Таблица 4

Определение адреналина и норадреналина в сыворотке крови при проведении теста на подвешивание

№ групп	Уровни адреналина и норадреналина в сыворотке крови					
	7 день введения		14 день введения		21 день введения	
	Адреналин мкг/л	Норадреналин мкг/л	Адреналин мкг/л	Норадреналин мкг/л	Адреналин мкг/л	Норадреналин мкг/л
1	27±3,9	68,6±1,5	28,3±1,2	68,9±9,41	27,7±2,46	70,5±3,54
2	7,6±0,38	20,2±5,67	8,7±3,82	20,3±4,83	9,6±3,28	18,4±5,27
3	7,9±0,21	22,1±1,98	7,1±1,19	20,3±3,49	7,3±2,14	19,3±6,13
4	8,1±0,52	24,3±2,2	6,9±2,77	18,2±5,28	6,9±0,97	17,9±0,95
5	6,7±0,65	18,6±1,95	6,1±0,51	17,9±0,85	6,4±2,42	17,2±0,56

Примечание: Отличия между группами на аскорбате лития и группой контроля (1-я группа) были статистически достоверны ($p<0,05$) в соответствии с t -критерием.

вместе так, чтобы колебания группы компенсировали колебания аппарата.

Исследованные показатели адаптогенности подтверждают приведенные выше заключения, основанные на наблюдениях экспериментатора. Так, приём аскорбата лития был достоверно ассоциирован с сохранением пула эозинофилов (табл. 5), более высоким уровнями аланинаминотрансфераз (АЛТ) и креатинина, что указывает на меньшую степень воздействия стресса на печень (табл. 6).

Таблица 5

Определение эозинофилов в цельной крови по Дункеру (модель транспортного стресса)

№ группы	Количество эозинофилов к цельной крови		
	7 день введения	14 день введения	21 день введения
1	428±11	401±81	425±69
2	856±42	901±16	907±43
3	822±87	919±41	922±93
4	794±69	921±91	928±107
5	978±51	991±6	979±38

Примечание: Отличия между группами на аскорбате лития и группой контроля (1-я группа) были статистически достоверны ($p<0,05$) в соответствии с t -критерием.

Таблица 6

Влияние аскорбата лития на аланин аминотрансферазу и креатинин в крови (модель транспортного стресса)

№ групп	7 день		14 день		21 день	
	АЛТ	Креатинин	АЛТ	Креатинин	АЛТ	Креатинин
1	13,2±5,97	19,4±2,45	13,5±4,84	17,9±5,31	14,0±4,91	19,1±2,12
2	32,4±7,75	39,8±6,13	31,7±7,32	47,8±1,46	30,1±7,42	42,1±2,97
3	31,0±3,15	39,6±7,98	33,1±2,84	48,3±8,27	32,4±6,37	45,6±2,73
4	29,8±8,45	36,5±3,84	32,1±9,10	48,1±3,82	31,7±3,14	46,3±3,26
5	36,3±2,64	48,8±4,50	38,1±1,49	50,1±4,86	36,9±3,87	49,2±4,61

Примечание: Отличия между группами на аскорбате лития и группой контроля (1-я группа) были статистически достоверны ($p<0,05$) в соответствии с t -критерием.

Таким образом, на основании совокупности полученных экспериментальных данных можно сделать вывод, что при пероральном введении водных растворов аскорбата лития происходит быстрая (т. е. уже в течение первых 7 сут эксперимента) адаптация организма в модели стресса на подвешивание. При этом, доза аскорбата лития в 30 мг/кг веса не уступает существенно по эффективности более высоким дозам (60–120 мг/кг).

Влияние разных доз аскорбата лития на нервно-психическое возбуждение, обусловленное дистрессом

В качестве определения нервно-психического возбуждения у крыс использовалась тест-система «открытое поле». Под нервно-психическим возбуждением подразумевается характер и интенсивность передвижения животного в манеже. Она зависит от действия различных факторов стресса (например, непривычная для животного обстановка) в сочетании с естественной исследовательской активностью и используется для диагностики функционального состояния нервной системы при воздействии естественных и экспериментальных факторов внешней среды.

Таблица 7

Влияние аскорбата лития на поведение крыс в тесте «открытое поле»

№ группы	Вертикальная двигательная активность	Горизонтальная двигательная активность	Кол-во заглядываний в отверстие	Число актов груминга	Кол-во выходов в центральную зону	Кол-во болюсов
1	7,21±2,75	3,48±0,75	2,96±0,42	23,47±2,38	0,9±0,42	6,46±0,16
2	29,46±3,74	6,75±0,68	9,98±0,96	8,44±4,76	2,84±0,14	2,54±0,68
3	27,32±2,87	6,18±0,42	9,32±3,13	9,43±4,12	3,12±2,17	2,12±0,48
4	17,24±4,86	5,56±1,24	4,76±2,41	17,25±3,61	1,21±1,82	5,14±0,23

Примечание: Отличия между группами на аскорбате лития и группой контроля (1-я группа) были статистически достоверны ($p < 0,05$) в соответствии с t -критерием.

Аскорбат лития принимался на протяжении 5 дней, затем животные помещались в открытое поле. Результаты экспериментов показали, что аскорбат лития дозозависимо улучшал показатели состояния животных в тесте «открытое поле» (табл. 7): улучшались показатели двигательной и исследовательской активности, и, в целом, снижалась выраженность дистресса.

Заключение

Возникновение стресса неразрывно связано с гиперактивацией глутаматных рецепторов, что при хроническом стрессе стимулирует развитие нейродегенеративных изменений в ЦНС. В настоящем исследовании показано, что аскорбат лития проявляет нейропротекторное и адаптогенное воздействие в различных моделях стресса. Установлено, что в изученных концентрациях аскорбат лития нетоксичен для нейро-

нов в культуре. Более того, добавление аскорбата лития в среду, на которой выращиваются нейроны на модели глутаматной нейротоксичности, приводит к увеличению числа выживших нейронов с нормальной морфологией. Нейропротекторное действие аскорбата лития отмечено во всём диапазоне исследованных концентраций (0,1...1,0 ммоль/л). В эксперименте, применение аскорбата лития существенно способствовало сохранению пула эозинофилов, снижению гормонов адреналина и норадреналина в крови и более высоким показателям адаптации животных в тестах на подвешивание, модели транспортного стресса и в тесте «открытое поле».

Источник финансирования

Работа выполнена в рамках диссертационного исследования.

Литература

1. Селье Г. Стресс без дистресса, Москва, Прогресс, 1979, 123 С.
2. 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 Jun 15;232(1):53–9. doi: 10.1016/j.bbr.2012.03.011.
3. Cuadrado-Tejedor M., Ricobaraza A., Del Rio 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 Jul 7;220(2):338–43. doi: 10.1016/j.bbr.2011.01.005.
4. 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 Dec 15;275:191–200. doi: 10.1016/j.bbr.2014.08.040.
5. AbdAlla S., El-Hakim A., Abdelbaset A., Elfaramawy Y., Qutterer U. Inhibition of ACE Retards Tau Hyperphosphorylation and Signs of Neuronal Degeneration in Aged Rats Subjected to Chronic Mild Stress. Biomed Res Int. 2015;2015:917156. doi: 10.1155/2015/917156.
6. Hynd M.R., Scott H.L., Dodd P.R. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. Neurochem Int. 2004 Oct;45(5):583–95.
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;34(3):453–62 Epub 2008 Au.
8. 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):158–65
9. 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.
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):1743–50.
11. 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.
12. 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.
13. Стельмашук Е.В., Новикова С.В., Исаев Н.К. Влияние глутамата на гибель культивированных зернистых нейронов, индуцированную глюкозной депривацией и химической гипоксией. Биохимия. — 2010. — т. 75. в. 8. с. 1150–1156.
14. 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 им. С.С. Корсакова, 2015. — № 3. с. 65–72.