

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ЛИТИЯ НА ЭРИТРОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА

Слобожанина Е.И., Зубрицкая Г.П., Скоробогатова А.С., Белевич Е.И., Венская Е.И.,
Лукьяненко Л.М.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси
ул. Академическая, 27, г. Минск, 220072, Республика Беларусь; e-mail: slobozhanina@ibp.org.by
Поступила в редакцию: 26.07.2021

Аннотация. Выявлено достоверное увеличение внутриклеточной концентрации лития после воздействия на эритроциты 6-10 мМ Li_2SO_4 в течение 3 ч. Накопление ионов лития в эритроцитах сопровождается ингибированием их эстеразной активности, незначительным снижением уровня активных форм кислорода и увеличением проницаемости клеточной мембраны. Показано, что воздействие солей лития в токсичных концентрациях на эритроциты человека *in vitro* незначительно снижает уровень активных форм кислорода, но приводит к модификации физико-химического состояния мембраносвязанных белков и липидов. Полученные результаты являются основой для создания клеточной тест-системы для оценки токсичности лития.

Ключевые слова: эритроциты, литий, микроэлементы, активные формы кислорода, микровязкость липидов, мембраносвязанные белки.

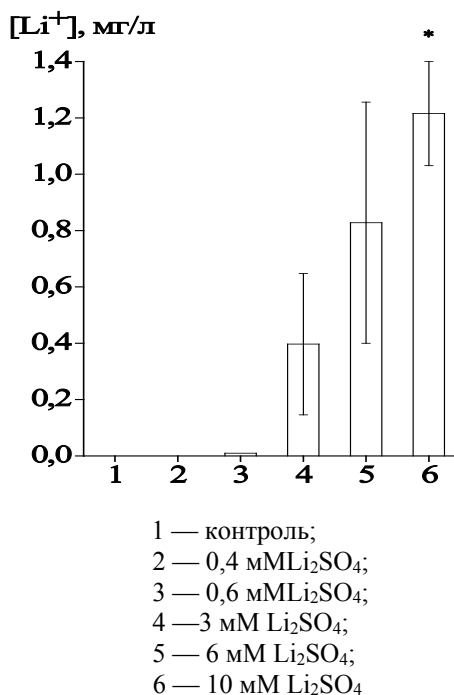
Литий является микроэлементом с малоизученной биологической ролью. Ежедневно вместе с пищей в организм человека поступает около 2 мг лития. Соли лития широко применяются в медицине в качестве психотропных и других лекарственных средств, а также в животноводстве в составе кормовых добавок. Литий используют и для изготовления литиевых аккумуляторов. Важно отметить, что литий воздействует на гомеостаз допамина, активность рецепторов серотонина [1]. Точные биохимические механизмы терапевтических эффектов лития до сих пор окончательно не установлены [2]. Препараты лития в терапевтических дозах обычно не производят никаких явных и немедленных психотропных эффектов, таких, как эйфория или наоборот депрессия, ни у здоровых людей, ни у больных с различными психическими заболеваниями. Все терапевтические эффекты лития развиваются медленно, постепенно [3]. Поиски специфического клеточного рецептора для лития продолжаются, но высокая концентрация лития, требующаяся для оказания существенного фармакологического эффекта, привела большинство исследователей к мысли о том, что существование подобного рецептора маловероятно. Вероятнее всего, литий оказывает своё терапевтическое действие за счёт конкуренции с другими ионами, прежде всего с ионами натрия и магния (с которыми ионы лития имеют наибольшее химическое сходство), и в гораздо меньшей мере – с ионами калия и кальция (с которыми сходство ионов лития значительно меньше), за их специфические ионные каналы, транспортные механизмы и места связывания с белками клеток [1]. Установлено участие лития в метаболизме простых сахаров (в т. ч. регуляции секреции инсулина), в обмене липидов, регуляции артериального давления, кроветворения [4]. Ферментные механизмы переноса лития через мембрану эритроцитов аналогичны таковым для клеток мозга, содержание ионов лития в эритроцитах может быть наилучшим способом предсказать его концентрацию в клетках мозга [5]. До сих пор неизвестны механизмы реализации фармакологического и токсического действия ионов лития на клетки крови, однако большой объем литературных данных позволяет предположить, что в зависимости от действующих концентраций литий способен оказывать как протекторное, так и токсическое воздействие.

Цель настоящей работы – выявить механизмы действия лития на эритроциты человека

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы образцы периферической крови практически здоровых доноров. Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови при 1500 g 5 мин. Затем эритроциты трижды отмывали в натрий-фосфатном буфере pH 7,4. Отмытые эритроциты (10 % гематокрит) инкубировали в PBS - буфере, содержащем Li_2SO_4 или LiCl (0,1-3 мМ фармакологические и 6-10 мМ токсические концентрации), в течение 3 ч при 37°C. Диапазон использованных концентраций солей лития отражал как используемые для терапии аффективных заболеваний, так и значения, при которых наблюдается проявление токсических эффектов в экспериментах *in vitro/in vivo* или при накоплении ионов данного элемента в крови пациентов, постоянно принимающих препараты лития.

Анализ элементного состава эритроцитов выполнен методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на приборе ICPE-9000 (Shimadzu, Япония). Уровень образования активных форм кислорода в эритроцитах определяли с помощью 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (H_2DCFDA) по интенсивности конечного продукта – DCF. Оценку внутриклеточной эстеразной активности эритроцитов проводили по интенсивности флуоресценции кальцеина АМ. Цитофлуориметрический анализ на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (BeckmanCoulter, США), в FL-1 канале. Активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) определяли спектрофотометрически по методу Элмана, а мембраносвязанной метгемоглобинредуктазы – по скорости окисления NADH. Для выявления изменений микровязкости липидов в мембранах эритроцитов были



* – различия достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$

Рисунок 1. Накопление лития в эритроцитах человека в зависимости от концентрации сульфата лития в среде инкубации

использованы липофильные флуоресцентные зонды 1-(4-триметиламмоний- 6-фенил-1,3,5-гексатриен (ТМА-ДФГ) и 6-додеканол-2-диметиламинонафтаген (лаурдан). Измерение параметров зондовой флуоресценции мембран эритроцитов проводили на спектрофлуориметре LSF-222 ("СОЛАР" Беларусь), спектрофотометрические – на спектрофотометре SPECORD M-40 (Германия).

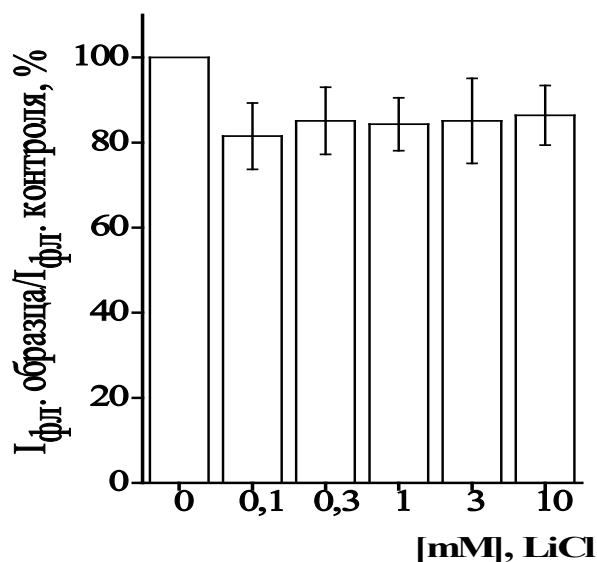
Все приведенные результаты являются средними значениями 5–12 независимых экспериментов. Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием параметрического критерия ANOVA (однофакторный дисперсионный анализ). Статистически значимыми были признаны значения p ниже 0,05. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе проведена оценка влияния фармакологических и токсических концентраций солей лития на мембранные компоненты эритроцитов *in vitro*. Как известно, фармакологическая эффективность препаратов лития определяется их способностью вызывать стабильное повышение концентрации ионов лития в плазме крови и эритроцитах. Повышение концентрации ионов лития в крови не только способствует стабилизации настроения пациентов с психоневрологическими расстройствами, но и проявляет нейропротекторное действие [6]. Для изучения возможности накопления клетками ионов лития, а также изменения элементного статуса эритроцитов нами была проведена их предварительная инкубация в средах с концентрацией сульфата лития от 0,4 до 10 мМ в течение 3 ч при 37°C. В контрольных клетках (без воздействия соли лития) ионы лития обнаружены в следовых количествах, что согласуется с ранее полученными нами данными (рис. 1).

Обнаружено, что инкубация эритроцитов в среде, содержащей минимальные терапевтические концентрации сульфата лития (0,4 мМ и 0,6 мМ) не приводит к накоплению металла в клетке. Увеличение содержания сульфата лития в среде инкубации до 3 мМ (максимальная терапевтическая концентрация) привело к незначительному накоплению лития в клетках. Достоверное возрастание лития в эритроцитах происходило только при воздействии на них 10 мМ сульфата лития (рисунок 1). Полученные нами данные согласуются с литературными источниками, в которых показана возможность накопления ионов лития эритроцитами. Однако, вероятно, вследствие постоянной работы котранспорта Li^+/Na^+ в эритроцитах, в условиях невысокой концентрации элемента в среде инкубации не происходит его значимого накопления в клетках.

Одновременно с этим нами был изучен элементный профиль эритроцитов до и после инкубации их с терапевтическими и токсическими концентрациями сульфата лития. В исследуемых образцах наблюдалось незначительное увеличение уровня магния и натрия (например, в эритроцитах до инкубации с 6 мМ сульфатом лития содержание Mg $68,80 \pm 15,71$ и Na $871,10 \pm 171,80$ мг/л; после 3-х час инкубации – содержание Mg $78,83 \pm 16,79$ и Na $1071,60 \pm 221,53$ мг/л) Однако полученные результаты на данный момент не позволяют говорить о выраженных эффектах. Внутриклеточная конкуренция ионов лития с ионами натрия и коррекция им избыточного внутриклеточного содержания натрия остаётся одним из важных объяснений (но, как принято



За 100% принято среднее значение интенсивности флуоресценции DCF в контрольных образцах

Рисунок 2. Отношение значений медиан интенсивностей флуоресценции зонда DCF в эритроцитах после воздействия на них LiCl в различных концентрациях

считать сегодня, далеко не единственным и даже не главным) для объяснения механизмов его лечебного действия [3]. Исследования показывают, что как маниакальные состояния различного генеза, так и депрессивные состояния различного генеза сопровождаются повышенным уровнем окислительного, нитрозативного стресса, в качестве одного из возможных механизмов воздействия лития на клетки рассматривают повышение уровня активных форм кислорода (АФК) [7-9]. Стоит отметить, что в литературе имеются противоречивые данные о влиянии лития на продукцию АФК. Так, в работах [10-11] показано, что воздействие лития на кардиомиоциты и на клетки гепатоцеллюлярной карциномы приводит к повышению уровня АФК и последующему окислительному стрессу. С другой стороны, обнаружен протективный эффект лития на нейроны клеточной линии РС5 в условиях окислительного стресса, вызванного диабетической гипергликемией [12], а в работе [13] показано, что литий способен минимизировать побочные эффекты другого антипсихотического препарата «Оланзапина», обусловленные запуском окислительных и воспалительных реакций в клетках линии RAW 264.7, тогда как воздействие только лития на данный тип макрофагов приводило лишь к краткосрочному повышению уровня АФК и супероксид аниона в клетках. К началу наших исследований влияние лития на уровень АФК в эритроцитах оставалось не исследованным. Можно предположить, что воздействие лития на эритроциты будет влиять на протекание свободнорадикальных процессов в клетках и приводить к изменению уровня их жизнеспособности. Поэтому целью данного этапа стало изучение влияния лития в терапевтических и токсических концентрациях на образование АФК и жизнеспособность эритроцитов человека. Для выяснения влияния лития на протекание свободнорадикальных процессов в эритроцитах и жизнеспособность клеток были использованы терапевтические и токсические концентрации LiCl и флуоресцентный зонд H₂DCFDA. На рисунке 2 представлены данные об изменении интенсивности флуоресценции зонда DCF (маркера АФК) в эритроцитах, подвергшихся воздействию Li⁺ в течение 3 ч при 37°C. Из рисунка видно, что инкубация эритроцитов в среде, содержащей LiCl в концентрациях 0,1–10 мМ, приводила к снижению интенсивности флуоресценции DCF на 15–20% по сравнению с контрольными клетками.

Снижение интенсивности флуоресценции DCF может быть обусловлено несколькими факторами. Во-первых, для того, чтобы зонд мог вступить в реакцию с АФК, от H₂DCFDA внутриклеточные эстеразы должны отщепить ацетатные группы, если же активность внутриклеточных эстераз будет снижена, то будет снижена и продукция H₂DCF, способного вступать в реакцию с АФК. Во-вторых, в случае повышения проницаемости клеточной мембраны будет происходить выход DCF (флуоресцирующей формы зонда) из клеток в буфер, что проявляется в снижении интенсивности флуоресценции DCF в эритроцитах.

Далее было изучено изменение уровня жизнеспособности эритроцитов, подвергшихся воздействию LiCl. Маркером жизнеспособности эритроцитов является активность цитозольных внутриклеточных эстераз, которую оценивают с использованием красителя кальцеина-АМ [14]. Данный краситель, проникая через мембрану клетки, гидролизуется внутриклеточными эстеразами до флуоресцирующего кальцеина (CAL) и удерживается внутри клеток с интактной мембраной [15]. На рисунке 3 представлены репрезентативные точечные диаграммы флуоресценции CAL в эритроцитах, обработанных различными концентрациями LiCl, на примере одного из доноров. Процентное содержание жизнеспособных эритроцитов, в выбранном по параметрам прямого и бокового рассеяния света регионе, в среднем составило 98,0±0,6%.

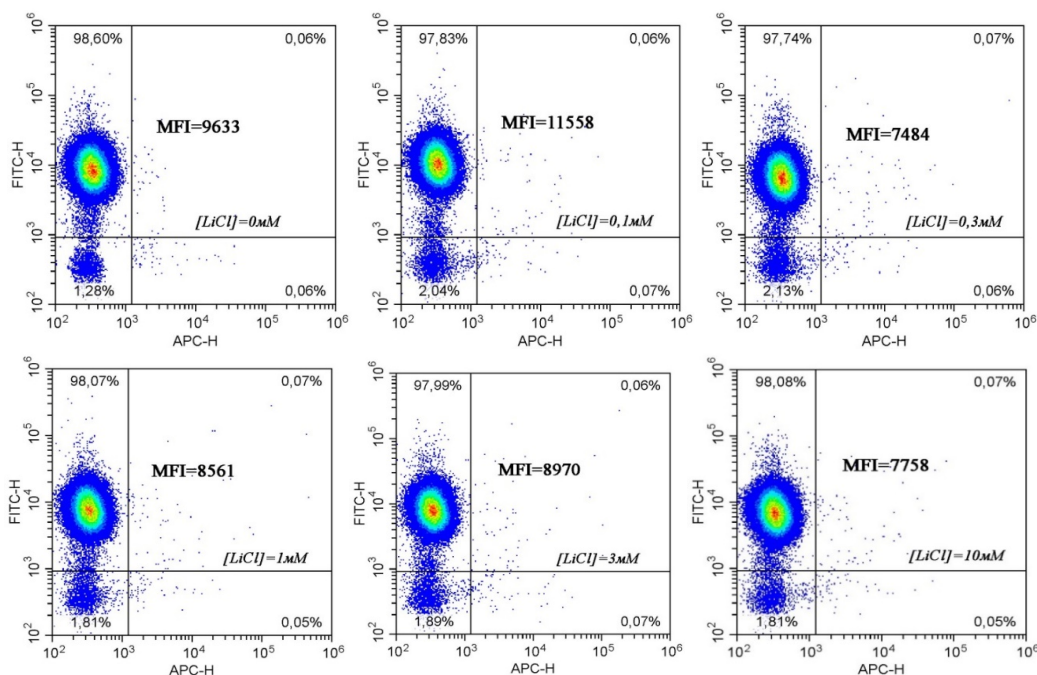


Рисунок 3. Репрезентативные точечные диаграммы, отражающие распределение эритроцитов, подвергшихся воздействию LiCl в концентрациях 0,3-10 мМ, по интенсивности флуоресценции кальцеина (отн.ед.)

Проведенные эксперименты позволили выявить статистически значимое снижение жизнеспособности эритроцитов на 20-25% по сравнению с контрольными клетками при воздействии на них LiCl в концентрациях 0,3-10 мМ в течение 3 ч при 37° С (рис. 3).

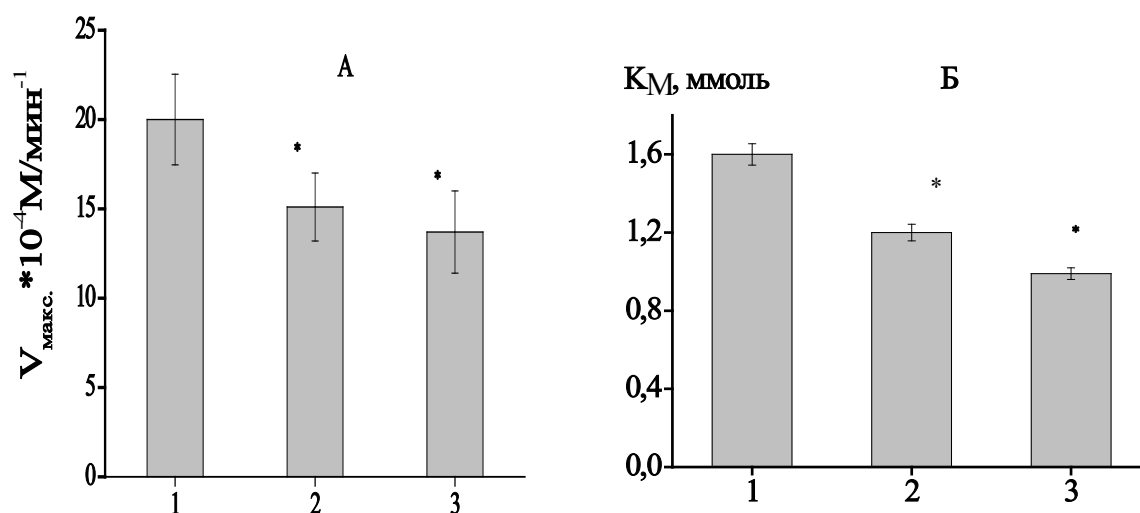
Полученные нами результаты согласуются с данными работы [16], где воздействие лития на эритроциты, истощенные по глюкозе, приводило к росту содержания Ca^{2+} и АТФ в цитозоле, и увеличению экспонирования фосфатидилсерина во внешнем липидном монослое мембраны эритроцитов, что свидетельствовало о запуске запрограммированной гибели эритроцитов – эритроптоза.

Изучение молекулярных механизмов действия соединений лития дает возможность понять как причины эффективности его применения при заболеваниях нервной системы, так и механизмы влияния на другие системы организма. В литературе показано, что ионы лития в фармакологических концентрациях оказывают существенное влияние на гомеостаз ацетилхолина, энкефалинов, катехоламинов (в том числе допамина), серотонина и других нейротрансмиттеров. В частности, ионы лития влияют на активность АХЭ и секрецию ацетилхолина в коре головного мозга. Холин способствует активации транспорта ионов лития внутрь клеток. В процессе лечения пациентов с биполярными расстройствами карбонатом лития отмечено накопление холина в эритроцитах. Соли лития способствуют также стабилизации мускариновых рецепторов ацетилхолина, влияют на активность протеинкиназы С [17]. В литературе практически отсутствует информация о влиянии ионов лития на эритроцитарную АХЭ, которая структурирована в поверхностном слое мембраны в виде липопротеидного комплекса. Каталитическая активность мембраносвязанной АХЭ находится под контролем структурного состояния липидной фазы мембраны, а нарушение же структуры мембраны под действием ионов лития может привести к изменению конформации мембраносвязанных ферментов (например, АХЭ и метгемоглобинредуктазы).

Нами проведена серия экспериментов по изучению активности мембраносвязанных ферментов (АХЭ и метгемоглобинредуктазы) в эритроцитах, подвергшихся воздействию *in vitro* сульфата лития в фармакологических и токсических концентрациях. Как видно из рисунка 4, средние значения максимальной скорости ($V_{\text{макс}}$) (рис. 4, А) и константы Михаэлиса (K_M) мембраносвязанной АХЭ (рис. 4, Б) достоверно снижены ($p < 0,05$) в эритроцитах, подвергшихся воздействию максимальной фармакологической и токсической концентраций сульфата лития по сравнению с контролем.

При воздействии токсических концентраций (10 мМ Li_2SO_4) обнаружен наиболее выраженный эффект снижения параметров активности АХЭ в изолированных мембранах, чем при воздействии фармакологических концентраций (3 мМ Li_2SO_4). Из литературы известно, что активность АХЭ в нервных клетках в процессе жизни может снижаться в результате химических воздействий и генетических изменений. При этом относительно небольшое снижение активности АХЭ приводит к облегчению синаптической передачи, что позволяет применять ингибиторы АХЭ при лечении ряда заболеваний, тогда как значительное снижение активности АХЭ делает синаптическую передачу затруднительной [18]. Что касается эритроцитарной АХЭ, то функциональное значение ее до конца не изучено.

Другим ферментом, который привлек наше внимание при изучении влияния солей лития на эритроциты, явилась NADH-зависимая метгемоглобинредуктаза, которая ответственна за восстановление метгемоглобина (MetHb) до оксигемоглобина.



* – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Рисунок 4. Средние значения параметров активности ацетилхолинэстеразы (А – $V_{\text{макс.}}$, Б – K_M) в мембранах, изолированных из эритроцитов, которые были подвергнуты воздействию различных концентраций сульфата лития. Мембраны изолированы из эритроцитов: 1 – нативных (контроль); 2, 3 – подвергшихся воздействию Li_2SO_4 в концентрациях 3 и 10 мМ соответственно

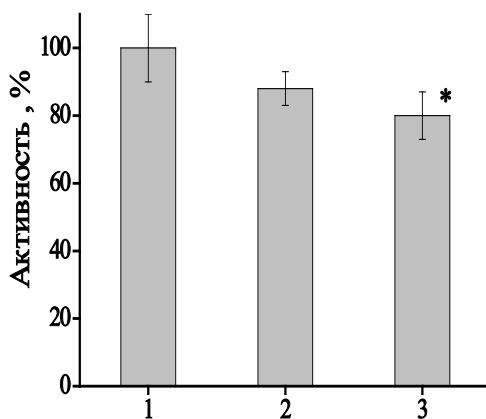
В молекуле гемоглобина железо присутствует в ферроформе (Fe(II)), однако под воздействием ряда физико-химических факторов оно может окисляться до ферриформы (Fe(III)). MetHb – продукт окисления железа в молекуле гемоглобина. Нормальная оксигенация гемоглобина предполагает высвобождение электрона из атома железа для связи с кислородом. Если железо гема не переходит обратно в ферроформу, то образуется MetHb, что в свою очередь приводит к нарушению транспорта кислорода. При высоком содержании MetHb присутствуют как полностью окисленные молекулы гемоглобина, так и частично окисленные – так называемые «валентные гибриды» с измененными функциональными параметрами. Они вызывают нарушение процессов оксигенации органов и тканей с развитием гипоксии и цианоза [19,20]. Возникновение метгемоглобинемии может быть связано с врожденными факторами, повышенным синтезом и/или уменьшением восстановления MetHb, а также с воздействием токсинов, которые резко влияют на окислительно-восстановительные реакции, увеличивая концентрацию MetHb.

Нами показано, что в эритроцитах, подвергшихся воздействию сульфата лития в фармакологических и токсических концентрациях, активность мембраносвязанной метгемоглобинредуктазы была снижена на 13 % (3 мМ Li_2SO_4) и 20 % (10 мМ Li_2SO_4) по сравнению с контролем (рис. 5).

Таким образом, установлено, что в эритроцитах человека, подвергшихся *in vitro* воздействию как фармакологических, так и токсических концентраций сульфата лития, происходит снижение активности мембраносвязанных АХЭ и метгемоглобинредуктазы, что свидетельствует об индуцированном ионами лития изменении структурно-функционального состояния мембран эритроцитов.

Известно, что ключевую роль в регуляции всех процессов, происходящих в мембранах, играет их текучесть (микровязкость). Этот комплексный показатель отражает как структуру, так и диффузные аспекты липидных составляющих мембран. Микровязкость мембран является интегральным показателем, зависящим от фосфолипидного состава, ненасыщенности липидов и содержания холестерина в мембранах. Изменение вязкостных характеристик отражает различные модификации межмолекулярных связей, которые, по сути, определяются сочетанием уровней подвижных и стабильных взаимодействий компонентов мембран. Важность поддержания относительной стабильности структуры мембран определяется необходимостью сохранения тех специфических мембранных функций, которые вызваны их тканевой принадлежностью, клеточной специализацией. Относительная стабильность связана с бислоиностью липидной организации мембран, характерным для каждого вида мембран химическим составом и сохранением асимметричности в распределении белков и липидов во внутренних и поверхностных слоях и в создании агрегатов липидов с белками, липидов с липидами, липидных рафтов и белковых комплексов в пределах слоя [21,22].

Для выявления изменений микровязкости липидов в мембранах эритроцитов при воздействии сульфата лития нами были использованы липофильные флуоресцентные зонды ТМА-ДФГ и лаурдан, параметры флуоресценции которых позволяют оценить изменение физического состояния фосфолипидов на разной глубине липидного бислоя мембран. Известно, что ТМА-ДФГ равномерно распределяется в мембране, встраиваясь в гидрофильной области полярных головок фосфолипидов [23], а лаурдан встраивается в мембрану в гидрофильно-



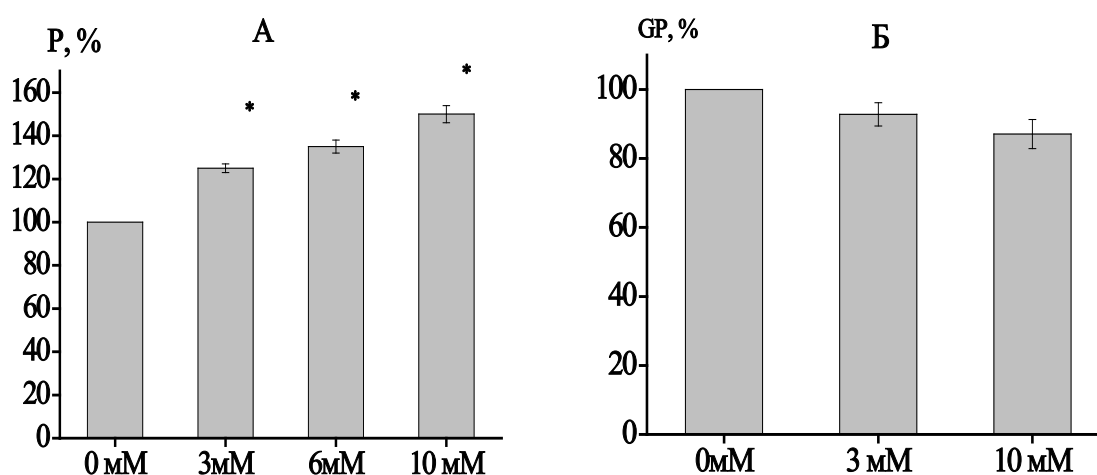
– *различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

За 100 % принято среднее значение активности фермента в нативных эритроцитах

Рисунок 5. Средние значения активности мембраносвязанной NADH-метгемоглобинредуктазы в мембранах, изолированных из эритроцитов, подвергшихся воздействию различных концентраций сульфата лития. Мембраны изолированы из эритроцитов: 1 – нативных (контроль); 2, 3 – подвергшихся воздействию Li₂SO₄ в концентрациях 3 и 10 мМ соответственно

гидрофобной области липидного бислоя, при этом остаток лауриновой кислоты локализуется в основном в области углеводородных цепочек жирных кислот фосфолипидов, а его флуоресцентный нафталиновый остаток – на уровне полярных головок фосфолипидов [24].

Нами выявлено достоверное повышение степени поляризации флуоресценции (P) TMA-ДФГ в изолированных мембранах из эритроцитов, подвергшихся воздействию сульфата лития: в фармакологических (3 мМ) – на 25 %, в токсических концентрациях (6 и 10 мМ) – на 35 и 40-45 % соответственно по сравнению с контролем (рис. 6, А). Известно, что TMA-ДФГ обладает интенсивной флуоресценцией и чувствителен к физическому состоянию липидов в мембранах, а значение поляризации флуоресценции TMA-ДФГ прямо пропорционально изменению микровязкости гидрофильной области липидного бислоя мембран. Увеличение поляризации флуоресценции TMA-ДФГ, встроенного в изолированные мембраны эритроцитов, свидетельствует о снижении текучести липидного бислоя в мембранах под влиянием ионов лития. Обнаружено незначительное снижение генерализованной поляризации (GP) флуоресценции лаурдана, включенного в изолированные мембраны из эритроцитов, обработанных как фармакологическими, так и токсическими концентрациями сульфата лития, по сравнению с контролем (рис. 6, Б).



* – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

За 100 % принято среднее значение поляризации флуоресценции зонда в контрольных образцах

Рисунок 6. Флуоресцентные параметры TMA-ДФГ (А, $\lambda_{\text{возб.}} = 365$ нм) и лаурдана (Б, $\lambda_{\text{возб.}} = 340$ нм), встроенных в мембраны, изолированные из эритроцитов до и после воздействия различных концентраций сульфата лития

Полученные результаты позволяют предположить, что имеется сильное электростатическое взаимодействие ионов лития с мембранными липидами клеток и с гидрофобными частями белковых молекул, чем отчасти можно объяснить фармакологическую и токсическую специфичность иона лития. Более высокая липофильность лития по сравнению с натрием, калием, рубидием и цезием играет важную роль в механизмах его фармакологического и токсического действия [3]. Вблизи гидрофобных участков мембран катион лития с легкостью теряет свои «водные оболочки» и электростатически взаимодействует с липидными мембранами клеток или с гидрофобными частями белковых молекул, изменяя их конфигурацию или даже встраиваясь в них [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что в эритроцитах человека, подвергшихся воздействию *in vitro* солей лития в фармакологических и токсических концентрациях, происходит снижение уровня жизнеспособности и АФК в эритроцитах, что говорит о снижении эстеразной активности в них, а также об увеличении проницаемости клеточной мембраны при воздействии ионов лития на клетки, что, в свою очередь, указывает на потенциальную токсичность ионов лития для эритроцитов человека. Снижение параметров активности мембраносвязанных ацетилхолинэстеразы и метгемоглобинредуктазы, а также изменение параметров флуоресценции различных по локализации в мембране липофильных зондов дает основание заключить, что на разной глубине липидного бислоя мембран имеет место литий-индуцированная модификация липидов. Полученные результаты могут быть использованы для создания клеточной тест-системы для оценки токсичности лития.

Список литературы / References:

1. Chang C.M., Wu C.S., Huang Y.W., Chau Y.L., Tsai H.J. Utilization of psychopharmacological Treatment Among Patients With Newly Diagnosed Bipolar Disorder From 2001 to 2010. *J Clin Psychopharmacol*, 2016, vol. 36, no. 1, pp. 32-44.
2. Birch N.J. Lithium and the cell: pharmacology and biochemistry. *New York: Academic Press*, 2012.
3. Ruiz P. Kaplan and Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry. *Cambridge: Cambridge University Press*, 2017, pp. 418.
4. Остренко К.В., Громова О.А., Сардарян И.С. Демидов В.И. Эффективность аскорбата лития на модели хронической алкогольной интоксикации, Фармакинетика и фармакодинамика, 2017, № 1, с. 11-21. [Ostrenko K.V., Gromova O.A., Sardaryan I.S. Demidov V.I. The effectiveness of lithium ascorbate on the model of chronic alcohol intoxication, *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 2017, no. 1, pp.11-21. (In Russ.)]
5. McNamara R.K., Jandacek R., Tso P., Blom T.J., Welge J.A., Strawn J.R., Adler C.M., Delbello M.P., Strakowski S.M. First-episode bipolar disorder is associated with erythrocyte membrane docosahexaenoic acid deficits: Dissociation from clinical response to lithium or quetiapine. *Psychiatry Res.*, 2015, vol. 230, no. 2, pp. 447-453.
6. Торшин И.Ю., Сардарян И.С., Громова О.А., Расташанский В.А., Федотова Л.Э. Хемореактомное моделирование аскорбата лития. Фармакинетика и фармакодинамика, 2016, no. 3, с. 47-58. [Torshin I.Yu., Sardaryan I.S., Gromova O.A., Rastashansky V.A., Fedotova L.E. Chemoreactom modeling of lithium ascorbate. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 2016, no. 3, pp. 47-58 (In Russ.)]
7. Лукьяненко Л.М., Скоробогатова А.С., Логацкая М.А., Кутько А.Г., Касько Л.П., Слобожанина Е.И. Микроэлементы в эритроцитах беременных женщин с риском развития метаболического синдрома. Сборник материалов X-й международной конференции "Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем", Минск, 2012, № 2, с. 179-182. [Lukyanenko L.M., Skorobogatova A.S., Logatskaya M.A., Kutko A.G., Kasko L.P., Slobozhanina E.I. Trace elements in erythrocytes of pregnant women at risk of developing metabolic syndrome. *Collection of materials of the X-th international conference "Molecular, membrane and cellular bases of the functioning of biosystems"* Minsk, 2012, no. 2, pp. 179-182. (In Russ.)]
8. Jakobsson E., Arguello-Miranda O., Chiu S.W., Fazal ZKruczek J., Nunez-Corrales S., Pandit S., Pritchett L. Towards a unified understanding of lithium action in basic biology and its significance for applied. *Biology. J. Membr. Biol.*, 2017, vol. 250, no. 6, pp. 587-604. DOI: 10.1007/s00232-017-9998-2
9. Malhi G.S., Tanious M., Das P., Coulston C.M., Berk M. Potential mechanisms of action of lithium in bipolar disorder. *Current understanding. CNS drugs*, 2013, vol. 27, no. 2, pp. 135-153. DOI: 10.1007/s40263-013-0039-0
10. Lee Y., Kim S.M., Jung E.H., Park J., Lee J.W., Han I.O. Lithium chloride promotes lipid accumulation through increased reactive oxygen species generation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids.*, 2019, vol. 1865, no. 2, pp. 1-27.
11. Fernandes M.S., Barbisan F., Azzolin V.F., Schmidt do Prado-Lima P.A., Teixeira C.F., Cruz Jung I.E. da. Lithium is able to minimize olanzapine oxidative-inflammatory induction on macrophage cells. *PLoS One*, 2019, vol. 14, no. 1, pp. 1-16.
12. Aminzadeh A., Dehpour A., Safa M., Mirzamohammadi S. Investigating the protective effect of lithium against high glucose-induced neurotoxicity in PC12 cells: involvements of ROS, JNK and P38 MAPKs, and apoptotic mitochondria pathway. *Cell Mol. Neurobiol.*, 2014, vol. 34, no. 8, pp.1143-1150.
13. Wu C.P., Klokouzas A., Hladky S.B., Ambudkar S.V., Barrand M.A. Interactions of mefloquine with ABC proteins, MRP1 (ABCC1) and MRP4 (ABCC4) that are present in human red cell membranes. *Biochem. Pharmacol.*, 2005, vol. 70, no. 4, pp. 500-510.

14. Bratosin D., Tcacenco L., Sidoroff M., Cotoraci C., Slomianny C., Estaquier J., Montreuil. Active caspases-8 and caspases-3 in circulating human erythrocytes purified on immobilized annexin-V: a cytometric demonstration. *Cytometry A.*, 2009, vol. 75A, pp. 236-244.
15. Nicolay J.P., Gatz S., Lang F., Lang U.E. Lithium-induced suicidal erythrocyte death. *J. Psychopharmacol.*, 2010, vol. 24, no. 10, pp. 1533-1539.
16. Плотников Е.Ю., Силачев Д.Н., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Янкаускас С.С., Зоров С.Д. Бабенко В.А. Скулачев М.В., Зоров Д.Б. Соли лития простые, но магические (обзор). *Биохимия*, 2014, т. 9, № 8, с. 932-943. [Plotnikov E.Yu., Silachev D.N., Zorova L.D., Pevzner I.B., Yankauskas S.S., Zorov S.D., Babenko V.A., Skulachev M.V., Zorov D.B. Lithium salts are simple but magical (review). *Biochemistry*, 2014, vol. 9, no. 8, pp. 932-943 (In Russ.)]
17. Hillert M.H., Imran I., Zimmermann M., Lau H., Weinfurter S., Klein J. Dynamics of hippocampal acetylcholine release during lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *J. Neurochem.*, 2014, vol. 131, no. 1, pp. 42-52. doi: 10.1111/jnc.12787
18. Vlachos D.G., Schulpis K.H., Antsaklis A., Mesogitis S., Biliatis I., Tsakiris S. Erythrocyte membrane AchE, Na, K-ATPase and Mg-ATPase activities in mothers and their premature neonates in relation to the mode of delivery. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2010, vol. 70, no. 8, pp. 568-574. doi: 10.3109/00365513.2010.527365
19. Топунов А.Ф., Космочевская О.В. Множественные функциональные формы гемоглобина в организме человека: современный взгляд и практическое использование. *Биомика*, 2018, т. 10, № 3, с. 251-267. [Topunov A.F. Kosmochevskaya O.V. *Multiple functional forms of hemoglobin in the human body: modern view and practical use. Biomics*, 2018, vol. 10, no. 3, pp. 251-267. (In Russ.)]
20. Gay H.C. Amaral A.P. Acquired methemoglobinemia associated with topical lidocaine administration: a case report. *Drug Safety – Case Reports*, 2018, vol. 5, № 1, pp. 15-20. doi: 10.1007/s40800-018-0081-4
21. Мокрушников П.В. Методика и результаты измерения микровязкости биомембран. *Тр. Новосиб. гос. архитектур.-строит. ун-та (Сибиструн)*, 2018, т. 2, № 1, с. 17-24. [Mokrushnikov P.V. Methods and results of measuring the microviscosity of biomembranes. *Tr. Novosib. state architect-build un-that (Sibistrin)*, 2018, vol. 2, no. 1, pp. 17-24. (In Russ.)]
22. Li H., Lykotrafitis G. Erythrocyte membrane model with explicit description of the lipid bilayer and the spectrin network. *Biophys. J.*, 2014, vol. 107, no. 3, pp. 642-653. doi: 10.1016/j.bpj.2014.06.031
23. Ballweg S., Ernst R. Control of membrane fluidity: the OLE pathway in focus. *Biol. Chem.*, 2017, vol. 398, no. 2, pp. 215-228. doi: 10.1515/hsz-2016-0277
24. Bagatolli L., Mely Y., Duportail G. Laurdan fluorescence properties in membranes: a journey from the fluorometer to the microscope. *Fluorescent Methods to Study Biological Membranes*, Heidelberg, 2012, pp. 3-35.
25. Bekker R.A., Bykov Yu.V. Lithium preparations in psychiatry, addiction medicine and neurology. Part II. Biochemical mechanisms of its action. *Acta Biomed. Scientifica*, 2019, vol. 4, no. 2, pp. 82-102. doi: 10.29413/ABS.2019-4.2.13

MECHANISMS OF LITHIUM ACTION ON HUMAN ERYTHROCYTES

Slobozhanina E.I., Zubritskaya G.P., Skarabahatava A.S., Belevich E.I., Venskaya E.I., Lukyanenko L.M.

Institute of Biophysics and Cell Engineering of NAS of Belarus

Akademicheskaya str., 27, 220072 Minsk, Republic of Belarus; e-mail: slobozhanina@ibp.org.by

Abstract. A significant increase in the intracellular concentration of lithium was revealed after exposure of erythrocytes to 6-10 mM Li_2SO_4 for 3 hours. The accumulation of lithium ions in erythrocytes is accompanied by inhibition of their esterase activity, a slight decrease in the level of reactive oxygen species and an increase in the permeability of the cell membrane. It has been shown that the effect of lithium salts in toxic concentrations on human erythrocytes in vitro slightly reduces the level of reactive oxygen species, but leads to a modification of the physicochemical state of membrane-bound proteins and lipids. The results obtained are the basis for creating a cell test system for assessing the toxicity of lithium.

Key words: erythrocytes, lithium, trace elements, reactive oxygen species, lipid microviscosity, membrane-bound proteins