

УДК 576.3-576.8

## РЕДОКС-СОСТОЯНИЕ И НАКОПЛЕНИЕ АУТОФАГОСОМ В ПЕЧЕНИ МЫШИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ХЛОРИДА ЛИТИЯ

© 2025 г. С. А. Дмитриева<sup>1, \*</sup>, А. А. Пономарева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Казанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение  
Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук»,  
Казань, 420111, Россия

\* E-mail: s\_dmitrieva@list.ru

Поступила в редакцию 28.12.2024

После доработки 10.03.2025

Принята к публикации 11.03.2025

Активация аутофагии считается одной из перспективных стратегией лечения и профилактики разнообразных неинфекционных заболеваний печени. В работе проведена оценка изменения редокс-состояния и активации аутофагии в тканях печени в условиях *in vivo* при действии хлористого лития (LiCl) в течение трех суток. Использовали просвечивающую электронную микроскопию для оценки образования аутофагических вакуолей в гепатоцитах печени мыши и ряд биохимических методов для определения в крови или печени активности ферментов, содержания глюкозы, пероксида водорода, уровня окислительной модификации белков и перекисного окисления липидов. Показано, что пероральное применение различных концентраций LiCl приводит к накоплению аутофагосом в клетках печени и небольшому усилению активности ряда антиоксидантных ферментов. Наблюдали значимые перестройки в ультраструктуре эндоплазматического ретикулума, которые могут играть сигнальную роль и участвовать в запуске аутофагии. Токсического действия на печень и развития окислительного стресса при применении LiCl в течение трех суток не обнаружено. Пероральное применение LiCl может использоваться в качестве эффективного модулятора процесса аутофагии в тканях печени.

**Ключевые слова:** печень, аутофагия, хлорид лития, эндоплазматический ретикулум

**Принятые сокращения:** АЛТ — аланинаминотрансфераза; АСТ — аспартатаминотрансфераза; ОМБ — окислительная модификация белков; ПОЛ — перекисное окисление липидов; СОД — супероксиддисмутаза; ТГ — триглицериды; ЭР — эндоплазматический ретикулум; гЭР — гладкий ЭР; шЭР — шероховатый ЭР; GSK-3 — киназа гликогенсинтазы-3, IMP — инозитолмонофосфатаза, NBT — нитросиний тетразолий; UPR — реакции несвернутого белка.

**DOI:** 10.31857/S0041377125010031, **EDN:** DEYARN

В настоящее время активация аутофагии считается одной из перспективных стратегией лечения и профилактики разнообразных неинфекционных заболеваний печени (Ma et al., 2020). Известно, что ионы лития, используемые с 1870-х годов в качестве стабилизатора психоэмоционального состояния при лечении биполярных расстройств, могут индуцировать аутофагию во множестве клеточных систем и в различных органах (Wang et al., 2024). Кроме того, ионы Li<sup>+</sup> также рассматривают как мощный антиоксидант, обладающий защитным и адаптогенным действием, участвующий в регуляции работы сердечно-сосудистой, эндокринной, репродуктивной, выделительной, иммунной и нервной систем, а также положительно регулирующей различные клеточные процессы,

включая клеточный цикл, программируемую клеточную смерть и канцерогенез.

Особое внимание привлекает тот факт, что ионы Li<sup>+</sup> обладают также гипогликемическим действием, что важно при лечении различных метаболических состояний в различных органах, в том числе печени (Jung et al., 2024). Данные литературы указывают на взаимодействие аутофагии, липидного и углеводного метаболизма и наличие динамической обратной связи между аутофагией и энергетическим балансом клетки.

Способность лития взаимодействовать с широким спектром молекул делает его достаточно перспективным фармакологическим инструментом при различных патологических процессах, в том числе для модуляции аутофагии. Регуляция

аутофагии в основном обусловлена ингибированием двух ключевых метаболических ферментов — киназы гликогенсинтазы-3 (GSK-3) и инозитолмонофосфатазы (IMP) (Wang et al., 2024). Благодаря своим плейотропным эффектам защитные и антиоксидантные механизмы лития, участвующие в гомеостазе и выживании клеток, также могут быть связаны с регуляцией энергетического метаболизма и активности митохондрий.

Показано, что литий модулирует концентрацию митохондриального кальция и, таким образом, препятствует деполяризации мембран, предотвращает набухание органелл и высвобождение цитохрома *c* из митохондрий (Deline et al., 2023), а также повышает функциональную активность митохондрий в нейронах коры и гиппокампа при терапевтических и субтерапевтических дозах (Singulani et al., 2021). В терапевтических концентрациях литий увеличивает активность комплексов I и II электрон-транспортной цепи митохондрий в корковой ткани мозга человека, что позволяет предположить его стимулирующее действие на окислительное фосфорилирование (Mauger et al., 2009).

Однако ионы  $\text{Li}^+$  могут оказывать не только антиоксидантное и защитное действие, но и ингибировать дыхательный комплекс I при накоплении в митохондриях, что в свою очередь приведет к развитию окислительного стресса и нарушению энергетического метаболизма (Bortolozzi et al., 2024). Для  $\text{Li}^+$  характерен достаточно узкий терапевтический диапазон (от 0.8 до 1.2 мЭкв/л для человека), его метаболизм осуществляется в печени, где он может накапливаться (L'Abbate et al., 2023).

Для тканей печени роль  $\text{Li}^+$  в активации аутофагии противоречива и исследовалась преимущественно в условиях *in vitro* на модельных системах (Liu et al., 2013; Vgatova et al., 2017; Dossymbekova et al., 2020). Печень содержит большое количество митохондрий, обладает одной из самых мощных систем антиоксидантной защиты и высоким конститутивным уровнем аутофагии. Таким образом, влияние  $\text{Li}^+$  на редокс-процессы и модуляцию аутофагии в печени в условиях *in vivo* требует детальной расшивки механизмов его действия, как при краткосрочном, так и при длительном воздействии.

Цель настоящего исследования заключалась в оценке изменения редокс-состояния и активации аутофагии в тканях печени в условиях *in vivo* при действии индуктора аутофагии LiCl.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

### Эксперименты с лабораторными животными.

Исследование проводили на трехмесячных самцах мышей линии CD1. Согласно схеме эксперимента, животных разделили на 4 группы: с 1-й группой (контрольной) не проводили никаких манипуляций, 2-я, 3-я и 4-я группы получали вместе с питьевой водой LiCl в концентрации 5, 10 или 15 мг на 1 кг веса соответственно в течение трех суток. Каждая экспериментальная группа состояла из 6 животных.

**Фиксация и пробоподготовка тканей.** Использовали кровь и ткани печени от одного и того же животного. После предварительного голодания в течение 8 ч животных из каждой группы декапитировали и собирали кровь с помощью сердечной пункции, а печень немедленно извлекали на холод. Образцы сыворотки крови получали в день эксперимента. Для измерения редокс-статуса ткани печени гомогенизировали с помощью гомогенизатора TissueLyser LT (QIAGEN, Германия) в течение 15 мин в холодном буферном растворе 20 мМ HEPES (pH 7.2) в соотношении 1:5 по массе, затем центрифугировали при 10 000 g в течение 10 мин при 4 °C, супернатант использовали для анализа.

**Просвечивающая электронная микроскопия.** Печень нарезали на небольшие кусочки (2—3 мм<sup>3</sup>) из верхней части левой доли. Образцы фиксировали 2.5 %-ным раствором глутарового альдегида (EMS, США) (1.5 ч), затем постфиксировали в растворе 1 %-ного тетраоксида осмия (Aldrich, Великобритания) на 0.1 М Na-фосфатном буфере, pH 7.4, с добавлением сахарозы (25 мг/мл) в течение 2 ч при комнатной температуре. Ткань последовательно обезживали в этаноле восходящей концентрации, ацетоне, оксиде пропилен. В качестве заливочной среды использовали набор смол Эпон 812 (Serva, Швейцария). Ультратонкие срезы (50—80 нм) получали с помощью ультрамикротомы Ultracut-III (LKB, Швеция), которые последовательно окрашивали 2 %-ным водным раствором уранилацетата и 0.4 %-ным раствором цитрата свинца.

Образцы исследовали с помощью электронного микроскопа Hitachi HT7800 (Hitachi, Япония) при рабочем напряжении 80 кВ. Прибор относится к материально-технической базе Распределенного коллективного спектро-аналитического центра изучения строения, состава и свойств веществ и материалов ФИЦ КазНЦ РАН. Анализировали

клетки, расположенные в перипортальной зоне ацинуса. Для статистического анализа образования аутофагических вакуолей рассчитывали отношение суммы их площадей относительно площади одного гепатоцита. Результаты выражали в процентах, за 100 % принимали площадь гепатоцита. Для каждой экспериментальной группы было проанализировано не менее 50 гепатоцитов на срезах.

**Биохимические исследования крови.** Уровень глюкозы определяли в день эксперимента с помощью глюкометра модели Accu-Chek Active (Accu-Chek, Германия) с использованием оригинальных тест-полосок. Концентрацию триглицеридов (ТГ), активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ) определяли с помощью наборов реактивов («Ольвекс-Диагностикум», Россия) согласно инструкциям производителя.

**Содержание пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) в ткани** определяли с помощью ксиленолового оранжевого по образованию красно-фиолетового ферроксиленолового комплекса с максимумом поглощения при длине волны 560 нм (Jiang et al., 1990). Данный метод позволяет определять содержание  $H_2O_2$  в пробе в широком диапазоне концентраций от 1 до 1000 мкмоль/л и хорошо подходит для оценки общего изменения содержания  $H_2O_2$  в гомогенатах тканей при развитии окислительного стресса. Уровень  $H_2O_2$  выражали в мкмоль/г ткани с помощью калибровочной кривой. Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли спектрофотометрически по содержанию малонового диальдегида (МДА), реагирующего при нагревании в кислой среде с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) при 532 нм ( $\epsilon_{ТБК-МДА} = 1.55 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) (Halliwell, Gutteridge, 1999) и выражали в мкг/г ткани. Уровень окислительной модификации белков (ОМБ) определяли по реакции взаимодействия карбонильных производных окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием окрашенных 2,4-динитрофенилгидразонов, которые анализировали при длине волны 366 нм ( $\epsilon = 22 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) (Colombo et al., 2016). Для оценки общего содержания в пробе белков, которые могут подвергаться карбонилированию (Fe-индуцированная ОМБ), пробы предварительно инкубировали с реактивом Фентона, содержащем 0.4 мМ  $FeSO_4$  и 0.1 мМ  $H_2O_2$  в течение 1 ч. Содержание ОМБ выражали в нмоль/мг белка.

**Активность супероксиддисмутазы (СОД) в ткани** определяли спектрофотометрически с помощью реакции восстановления нитросинего тетразолия (NBT) при 560 нм, используя систему ксантин/ксантиноксидазы для генерации супероксидного анион-радикала (Durak et al., 1993). За 1 ед. активности СОД принимали 50 %-ное ингибирование NBT за 1 мин.

**Активность каталазы** определяли по ферментативному разложению  $H_2O_2$  в единицу времени при длине волны 240 нм и рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции  $H_2O_2$  ( $\epsilon = 0.44 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) (Aebi, 1984). Об активности глутатионпероксидазы судили по уменьшению поглощения NADPH в минуту при 25 °С при 340 нм (Paglia, Valentine, 1967). В качестве восстанавливающего субстрата использовали трет-бутилгидропероксид в конечной концентрации 0.3 мМ. Активность глутатионредуктазы, которая катализирует НАДФН-зависимое восстановление окисленного глутатиона до восстановленного, оценивали с помощью реактива Элмана при длине волны 405 нм (Cribb et al., 1989). Активность антиоксидантных ферментов выражали в усл. ед. на 1 мг белка.

Содержание белка в пробе определяли спектрофотометрическим методом при 280 нм с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США) и использовали для количественного выражения содержания окисленных белков и активности антиоксидантных ферментов. Все остальные биохимические исследования были проведены на спектрофотометре Lambda-25 (Perkin Elmer, США).

**Статистический анализ.** На рисунках 1–3 представлены наиболее характерные изображения клеток и органелл. Данные биохимического исследования (рис. 4, табл. 1, 2) представлены как средние арифметические и их стандартные отклонения. Для статистической обработки результатов использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Данные анализировали в программе Statistica 10 (StatSoft). Статистически значимыми считали результаты при  $P < 0.05$  (отмечены символами).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Изменение ультраструктуры клеток и накопление аутофагосом после применения LiCl в течение 3 сут.** Клетки печени мышей контрольной группы имели характерную ультраструктуру, описанную для клеток печени млекопитающих. Ткань состояла

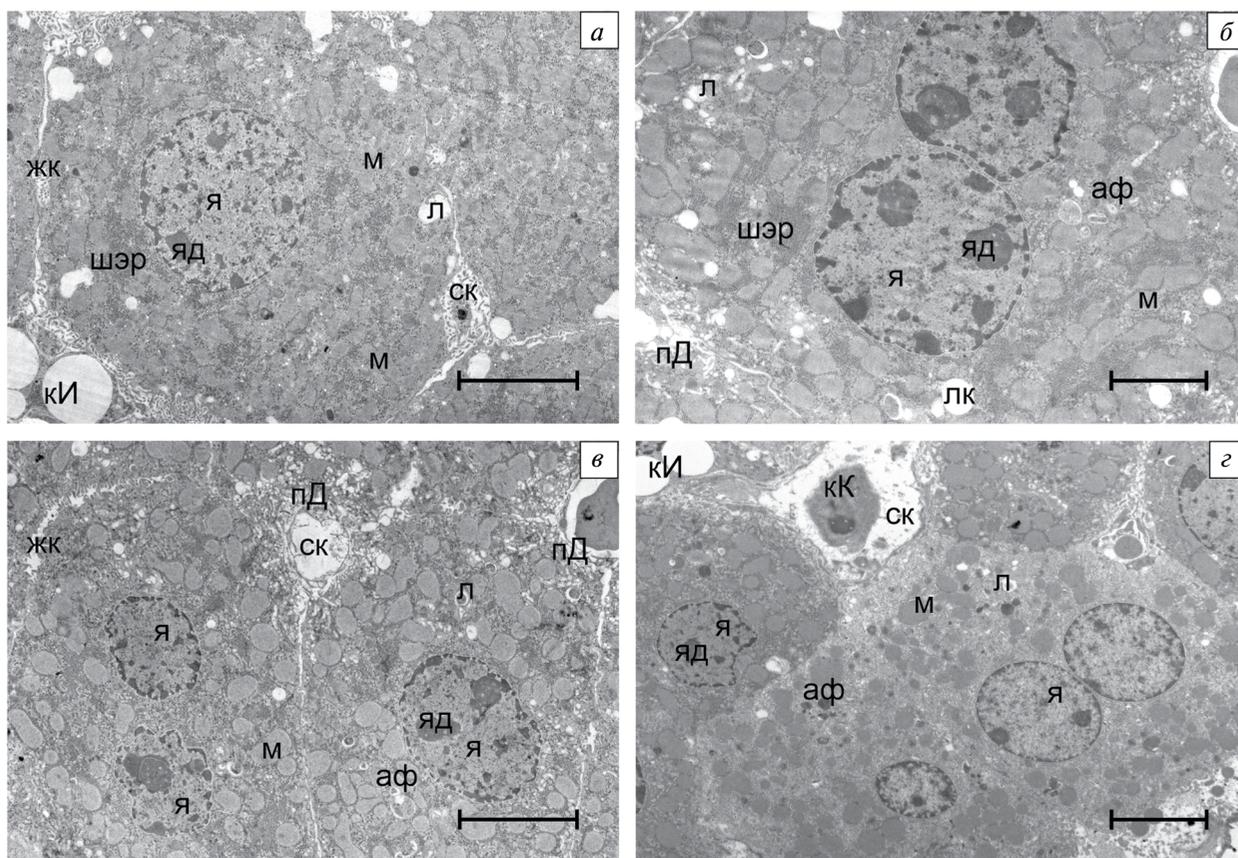
из паренхиматозных клеток (гепатоцитов) и непаренхиматозных клеток, к которым относятся интерлюминальные клетки Купфера, синусоидальные эндотелиальные клетки и перисинусоидальные звездчатые клетки (клетки Ито). В работе анализировали изменения в гепатоцитах.

На рисунке 1а показан общий вид гепатоцита, имеющего характерную полигональную форму. Средние линейные размеры клеток по длинной оси составляли 20–25 мкм, в центре расположено одно или два крупных ядра с ядрышком. Цитоплазма содержит многочисленные митохондрии, окруженные разветвленной сетью канальцев шероховатого эндоплазматического ретикулума (шЭР), мелкие гранулы гликогена, пероксисомы и лизосомы, диктиосомы и секреторные везикулы аппарата Гольджи, единичные липидные капли (рис. 1б). Применение LiCl, независимо от используемых концентраций (5, 10 или 15 мг/кг), не вызывало существенных изменений ультраструктуры, кото-

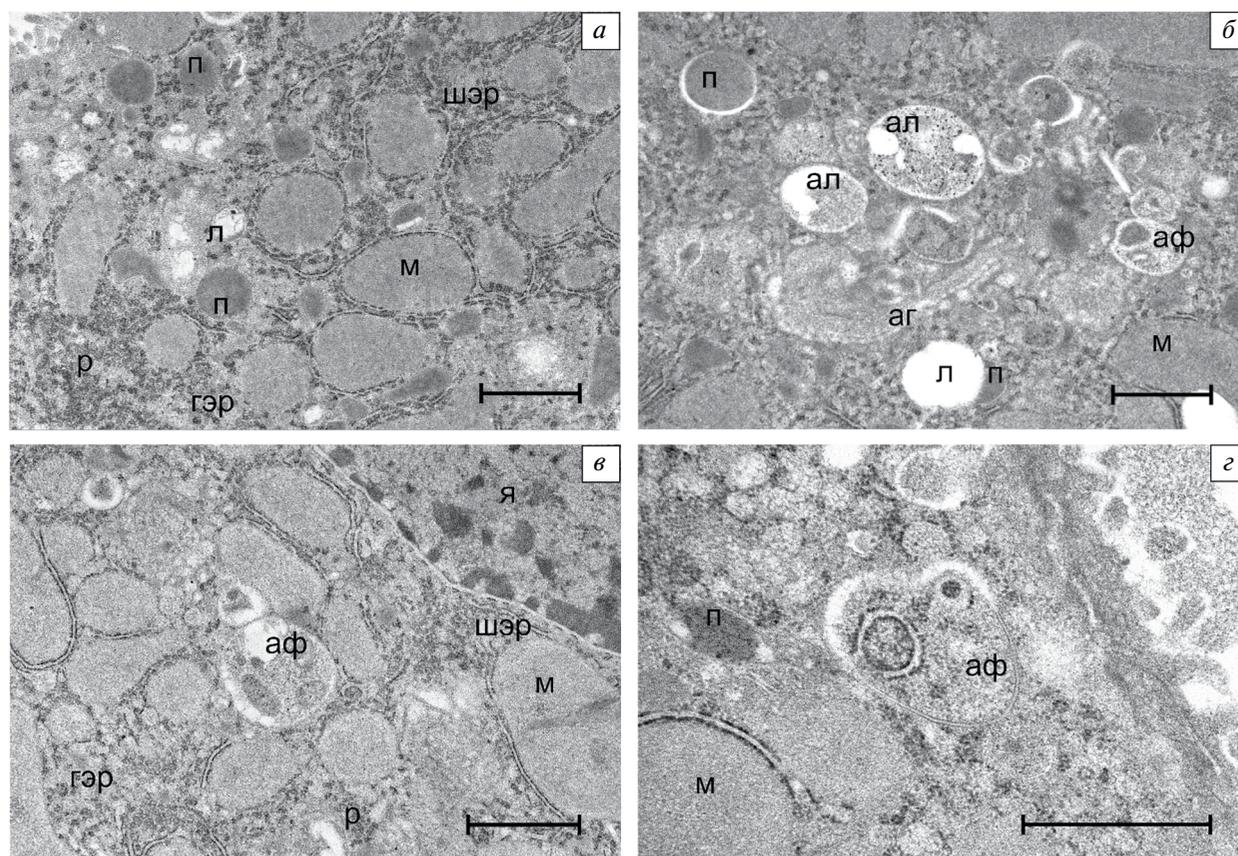
рые свидетельствовали бы о повреждении клеток (рис. 1б–г).

При действии LiCl во всех трех исследованных концентрациях увеличивается образование аутофагических вакуолей в гепатоцитах (рис. 2). В цитоплазме можно выделить области, в которых сосредоточены пероксисомы, лизосомы, а также вакуоли с различным по плотности и составу содержимым. Данные морфологические признаки позволяют отнести вакуоли к аутолизосомам и аутофагическим телам на разной стадии формирования и деградации.

Площадь, занимаемая аутофагическими вакуолями, увеличивалась при действии LiCl во всех исследованных концентрациях более чем в 2 раза и составляла:  $2.72 \pm 0.68$  (5 мг/кг LiCl),  $2.94 \pm 0.36$  (10 мг/кг) и  $2.59 \pm 0.46$  (15 мг/кг). В контроле процентное соотношение площади аутофагических структур к площади гепатоцита составляло в среднем  $1.17 \pm 0.22$ . Аутофагосомы имели



**Рис. 1.** Общий вид клеток печени мыши при действии LiCl в разных концентрациях: а – контроль, б – 5 мг/кг, в – 10 мг/кг, г – 15 мг/кг. Масштабный отрезок: 5 мкм. Обозначения: аф – аутофагосома, жк – желчный капилляр, кИ – клетка Ито, кК – клетка Купфера, л – лизосома, лк – липидная капля, м – митохондрия, пД – пространство Диссе, ск – синусоидальный капилляр, шэр – шероховатый эндоплазматический ретикулум, я – ядро, яд – ядрышко.



**Рис. 2.** Образование аутофагосом в гепатоцитах мыши при действии LiCl в разных концентрациях: *а* – контроль, *б* – 5 мг/кг, *в* – 10 мг/кг, *г* – 15 мг/кг. Масштабный отрезок: 1 мкм (*а–в*) и 0,5 (*г*) мкм. Обозначения: ал – аутолизосома, аг – аппарат Гольджи, гэр – гладкий эндоплазматический ретикулум, п – пероксисома, р – рибосомы. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

неоднородные по составу включения, содержали участки цитоплазмы с органеллами, в том числе ЭР (рис. 2б–г).

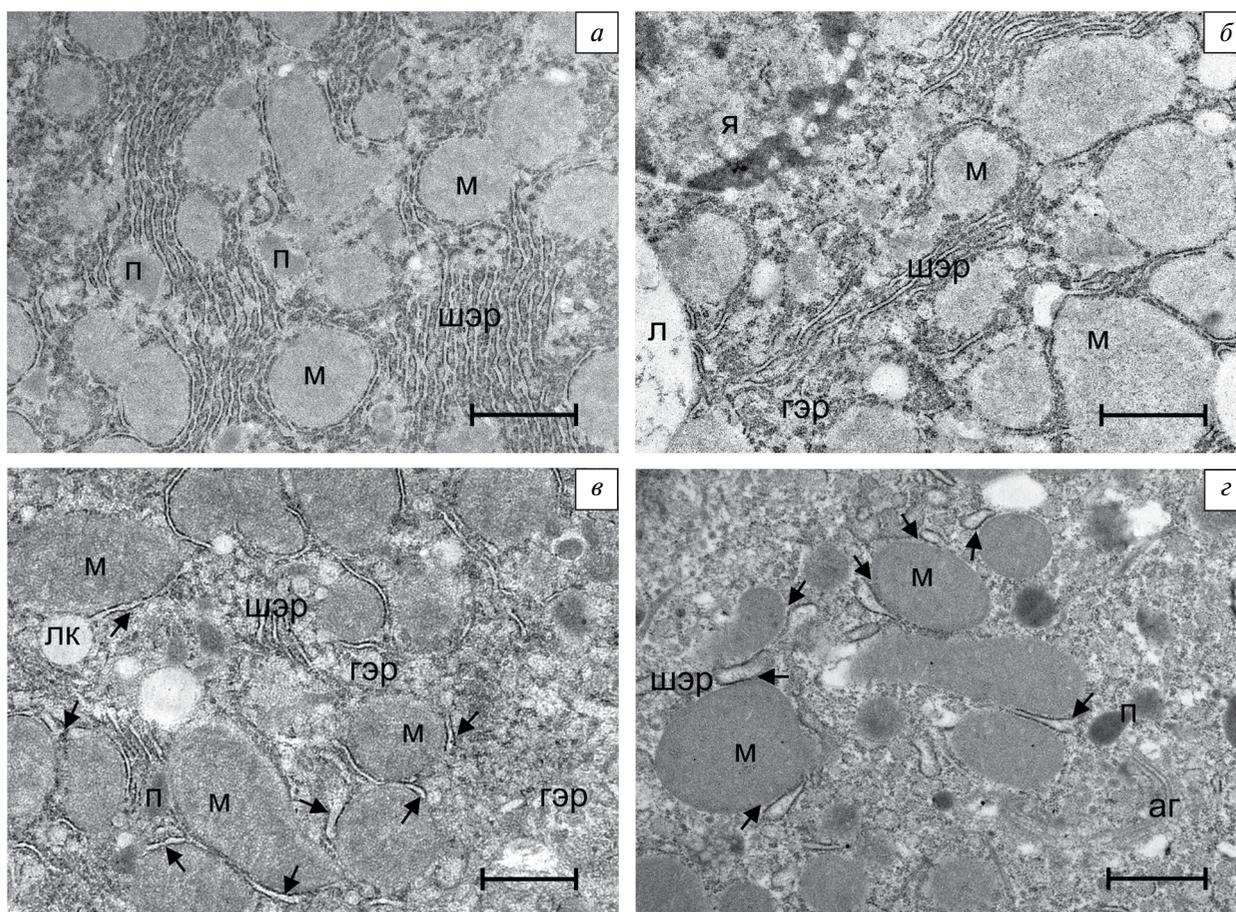
Изменения ЭР имели четко выраженную концентрационную зависимость. С увеличением концентрации происходила фрагментация сети шЭР, значительное расширение канальцев и цистерн, снижение зон, где канальцы были расположены плотными параллельными рядами, и преобладание зон гладкого ЭР (гЭР) над шЭР (рис. 3). Просветы канальцев ЭР преимущественно расширялись в местах зон контактов с митохондриями и составляли 100–150 нм в диаметре (рис. 3в, г).

Ультраструктура митохондрий существенным образом не отличалась от контрольной, что может свидетельствовать о нормально протекающих редокс- и энергетических процессах в этих органеллах. Многочисленные митохондрии равномерно распределены по всей площади среза клетки, имеют округлую или слегка вытянутую форму, ортодоксальный вид (рис. 3а–в). Лишь при воздействии

15 мг/кг LiCl матрикс митохондрий становился более электронно-плотным (рис. 3г).

**Биохимический анализ крови.** Мы не выявили значимых изменений анализируемых параметров при пероральном применении LiCl. Уровень глюкозы и ТГ, а также активность АЛТ и АСТ при действии LiCl не отличались от параметров сыворотки крови контрольного варианта (табл. 1). Это косвенно может свидетельствовать о нормально протекающем липидном и углеводном метаболизме, а также об отсутствии повреждения печени при действии LiCl во всех исследованных концентрациях.

**Изменение редокс-статуса в тканях печени.** Результаты нашей работы показали, что пероральное применение LiCl индуцировало небольшое накопление в тканях печени пероксида водорода (табл. 2), увеличивало активность ферментов антиоксидантной защиты (СОД, каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы) (рис. 4), однако не приводило к значительному повышению



**Рис. 3.** Изменения ультраструктуры митохондрий и эндоплазматического ретикулума в гепатоцитах мыши при действии LiCl в разных концентрациях: *а* – контроль, *б* – 5 мг/кг, *в* – 10 мг/кг, *г* – 15 мг/кг. Масштабный отрезок: 1 мкм. Обозначения те же, что на рис. 1, 2. Стрелкой указаны зоны контакта расширенных канальцев ЭР с митохондрией.

**Таблица 1.** Биохимические показатели крови животных после применения LiCl в течение трех суток

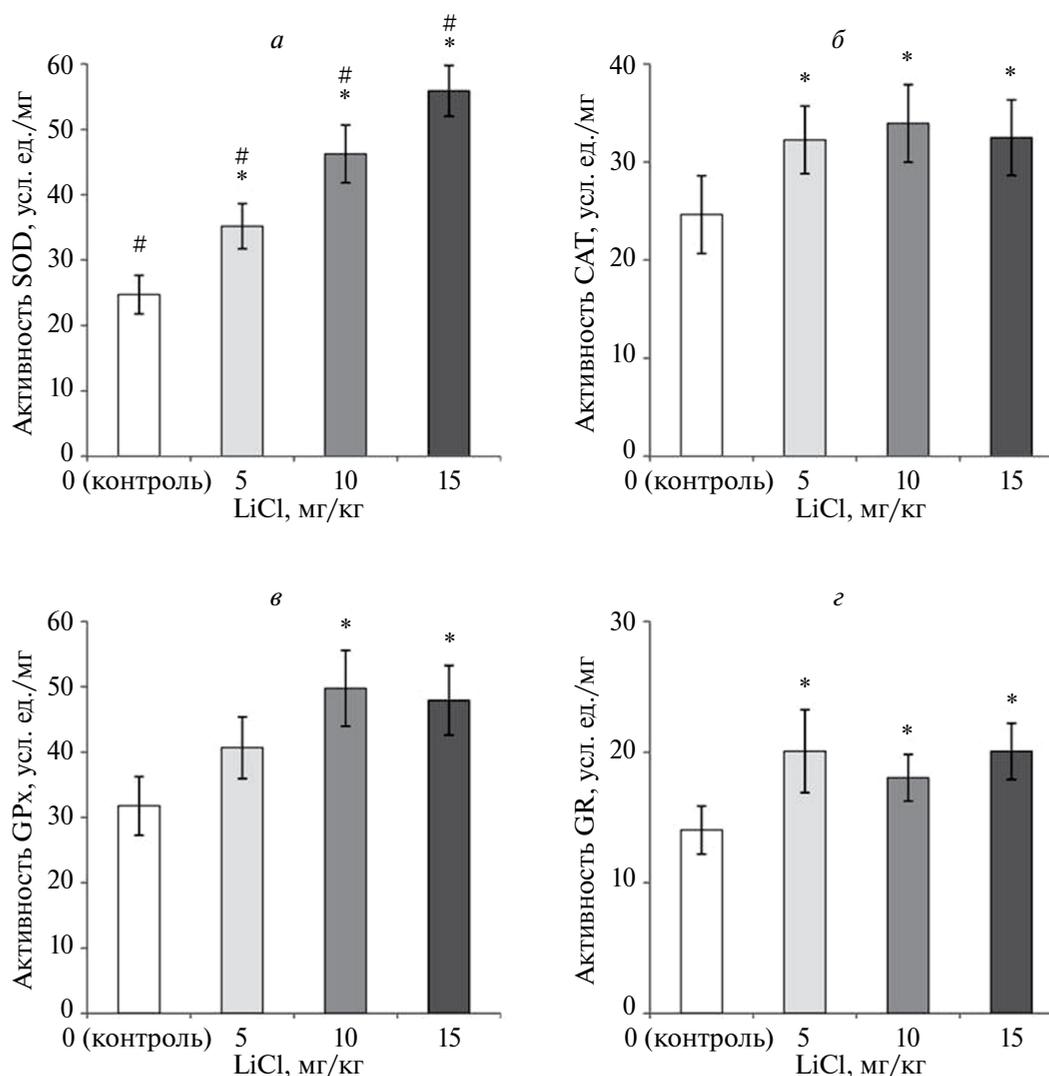
Концентрация LiCl в группе, мг/кг	Показатель			
	АСТ	АЛТ	ТГ	Глюкоза
	ммоль/(ч·л)		ммоль/л	
0 (контроль)	0.62 ± 0.05	0.56 ± 0.08	1.41 ± 0.29	6.3 ± 0.3
5	0.57 ± 0.07	0.53 ± 0.07	1.24 ± 0.20	6.5 ± 0.4
10	0.57 ± 0.04	0.58 ± 0.04	1.37 ± 0.16	6.2 ± 0.3
15	0.60 ± 0.04	0.54 ± 0.05	1.34 ± 0.25	6.2 ± 0.3

*Примечание.* Здесь и в табл. 2 концентрация лития указана на 1 кг веса животного.

**Таблица 2.** Содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, уровень ПОЛ и ОМБ в тканях печени после применения LiCl в течение трех суток

Концентрация LiCl в группе, мг/кг	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , мкмоль/г	МДА, мкг/г	ОМБ (спонтанная), нг/мг белка	ОМБ (индуцированная), нг/мг
0 (контроль)	3.09 ± 0.40	1.83 ± 0.17	0.78 ± 0.12	1.97 ± 0.29
5	3.21 ± 0.51	1.92 ± 0.19	0.69 ± 0.17	1.65 ± 0.36
10	3.44 ± 0.57	1.91 ± 0.23	0.86 ± 0.17	1.59 ± 0.44
15	4.07 ± 0.33*	1.96 ± 0.14	0.81 ± 0.13	1.17 ± 0.39*

\* Показатели указаны на 1 г ткани (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, МДА) или 1 мг белка (ОМБ).



**Рис. 4.** Активность супероксиддисмутазы (SOD, *a*), каталазы (CAT, *б*), глутатионпероксидазы (GPx, *в*) и глутатионредуктазы (GR, *г*) в тканях печени после применения LiCl в течение трех суток. Показаны средние значения и их стандартные отклонения (на 1 мг белка). Различия относительно контроля (\*) и между вариантами (#) достоверны при  $P < 0.05$ ; ( $n = 6$ , непараметрический критерий Манна–Уитни).

уровня ПОЛ и ОМБ (табл. 2). Наиболее значительное увеличение содержания пероксида водорода наблюдали только при действии 15 мг/кг LiCl (табл. 2). Применение этой концентрации характеризовалось также небольшим снижением Fe-индуцированной ОМБ, свидетельствующим о том, что в тканях снижается общее количество белка, которое может подвергаться карбонилированию (табл. 2). Активность исследованных ферментов антиоксидантной защиты была почти во всех вариантах выше, чем в контроле (рис. 4б–г), за исключением активности глутатионпероксидазы при применении 5 мг/кг LiCl (рис. 4в). Однако только активация СОД зависела от концентрации и значимо различалась между вариантами (рис. 4а).

Полученные результаты, несомненно, свидетельствуют об изменении редокс-состояния тканей печени, которое после трехсуточного применения LiCl не сопровождается развитием окислительного стресса, так как уровни ПОЛ и ОМБ не увеличивались (табл. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что накопление аутофагосом, а также маркерных аутофагических белков и генов может свидетельствовать не только об активации аутофагии, но и об ингибировании процесса на одной из поздних стадий биогенеза аутофагосом (Mizushima et al., 2010; Singh, Bhaskar, 2019).

Кроме того, аутофагия включает в себя сложные динамические процессы, а большинство аутофагических белков обладает плейотропным действием, что не позволяет по их накоплению (снижению) однозначно судить об изменении аутофагии. Трансмиссионная электронная микроскопия считается золотым стандартом для демонстрации формирования аутофагосом (Humbert et al., 2020), позволяя выявить не только накопление аутофагосом, но и детально охарактеризовать морфологию аутофагических структур на разных стадиях формирования, тип удаляемого в аутофагосомах груза, а также структурные изменения клеточных компонентов, вовлеченных в регуляцию аутофагии.

Наши данные свидетельствуют о том, что в тканях печени при действии лития происходит активация процессов аутофагии, увеличение числа аутофагосом на разных стадиях формирования. Применение всех исследованных концентраций LiCl приводило к увеличению количества аутофагосом в клетках. В гепатоцитах показан полный цикл биогенеза аутофагосом и аутофаголизосом от начала образования фагофора до слияния аутофагосом с лизосомами, а также наблюдается активация лизосомного аппарата (рис. 2б–г), что однозначно свидетельствует об активации процесса аутофагии, а не об его ингибировании на одной из финальных стадий.

Анализ аутофагосом с помощью электронной микроскопии в клетках печени при действии солей лития существует лишь в единичных работах — в экспериментах, проведенных в условиях *in vitro* при кратковременном влиянии в течение 1, 24 и 48 ч (Bgatova et al., 2017; Dossymbekova et al., 2020). Сравнительный анализ морфологических изменений при действии различных форм солей лития был проведен на клетках гепатокарциномы (Bgatova et al., 2017). Показано, что карбонат лития через 24 ч вызывает в клетках культуры активацию аутофагических процессов, что авторы соотносят как с концентрационной зависимостью, так и с химической формулой соединения, в котором присутствует ион лития. К сожалению, активация аутофагии в клетках печени при длительном и краткосрочном действии лития в условиях *in vivo* в большинстве работ подтверждается преимущественно изменением содержания маркерных белков или экспрессии соответствующих генов, что не позволяет проанализировать цитологические изменения. Известно также, что литий может ингибировать аутофагию при различных патофизиологических состояниях.

Так, применение лития у стареющих животных сопровождалось снижением аутофагии в тканях мозга, хотя у молодых животных оно приводило к активации процесса (Costa et al., 2021).

Общепризнанным считается, что литий может приводить либо к mTOR-независимой активации аутофагии, которая обусловлена ингибированием IMP, снижением уровня свободного инозитола и инозитолтрифосфата, либо к mTOR-зависимому ингибированию аутофагии путем прямого или косвенного ингибирования внутриклеточной серин-треониновой киназы GSK3- $\beta$  (Sarkar et al., 2008). Таким образом, дисбаланс этих путей при болезнях печени и определяет выбор стратегии регуляции аутофагии при действии лития.

Однако существует несколько исследований, которые показали, что и ингибирование GSK-3 $\beta$  может усиливать поток аутофагии (Russi et al., 2021). Ингибирующее действие хлорида лития на GSK-3 $\beta$  и повышение уровня фосфорилирования фосфо-GSK3 $\beta$ /Ser9 сопровождалось активацией защитной аутофагии при ишемическом реперфузионном повреждении печени (Liu et al., 2013). В настоящей работе мы показали, что ионы лития приводят к активации аутофагии в тканях здоровой печени в условиях *in vivo*, однако происходят ли в данных условиях ингибирование GSK-3 $\beta$  и/или IMP, преобладает ли один из этих механизмов или они работают синергично, еще предстоит выяснить.

Считается, что протекторное действие и терапевтический потенциал лития во многом опосредованы его антиоксидантными свойствами, но использование его в течение длительного времени может приводить к развитию окислительного стресса и повреждению клеток в различных органах. Ионы лития относят к редокс-неактивным соединениям, однако они могут приводить к развитию окислительного стресса за счет нарушения динамического равновесия про- и антиоксидантов.

В экспериментах после трехсуточного воздействия LiCl мы не выявили значимых внутриклеточных повреждений (рис. 1), изменений митохондрий (рис. 3), повышения уровня АЛТ, АСТ (табл. 1), накопления маркеров окислительного стресса (табл. 2), которые свидетельствовали бы о токсическом повреждающем действии на печень, а наблюдали лишь усиление активности ферментов антиоксидантной защиты (рис. 4). Это согласуется с данными литературы о протекторном антиоксидантном действии нетоксичных концентраций лития. Антиоксидантный эффект может

быть результатом способности лития модулировать функциональную активность митохондрий, как главных органелл, генерирующих АФК, а также следствием активирующего действия на систему антиоксидантной защиты.

Стимулирующее действие лития при кратковременном и длительном действии на активность различных ферментативных и неферментативных антиоксидантов показано в ряде работ (Samad et al., 2020; Engin et al., 2023). Литий обладает усиливающим действием на митохондриальное дыхание, трансмембранный митохондриальный потенциал и продукцию АТФ при применении в терапевтических и субтерапевтических дозах (Singulani et al., 2021). На нейрональных клетках человека SH-SY5Y показано, что применение лития нивелирует легкую форму ротенон-индуцированной нейрональной митохондриальной дисфункции, восстанавливая скорость потребления кислорода митохондриями (Damri et al., 2021).

Кроме того, литий является тканеспецифичным модулятором оборота кальция в митохондриях: на выделенных митохондриях мозга и печени показано, что литий в клинически значимой концентрации защищает от вызванного кальцием перехода сверхпроницаемости и снижает кальциевую емкость митохондрий печени и, напротив, увеличивает кальциевую емкость митохондрий мозга (Deline et al., 2023). Кроме того,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$ -обменник (NCLX), единственный известный транспортер с признанной специфичностью для ионов лития, высоко экспрессируется в тканях печени, однако в отличие от тканей мозга и сердца, может быть локализован не только в митохондриях, но и в других мембранах, в частности в плазмалемме и ЭР (Rysted et al., 2021). Все это исключает наличие однозначного алгоритма регуляции редокс- и энергетического метаболизма при действии лития при учете его способности свободно проникать через мембраны и накапливаться в печени (Kiełczykowska et al., 2020).

Мы полагаем, что благодаря усилению работы ферментов антиоксидантной защиты (рис. 4) и активации аутофагии (рис. 2б–г), направленной на удаление из метаболизма клетки окисленных и поврежденных макромолекул и структур, действие лития не приводит к развитию окислительного стресса в гепатоцитах печени. Активным формам кислорода, как сигнальным молекулам, в настоящее время отводится ключевая роль в индукции и регуляции аутофагии, которая во многом

обусловлена посттрансляционными модификациями, а также редокс-регуляцией экспрессии генов ключевых аутофагических белков, а также других сигнальных белков, вовлеченных в инициацию и регуляцию процесса (Talebi et al., 2022).

Несмотря на отсутствие развития окислительного стресса, применение наибольшей из исследованных нами концентраций LiCl приводило к увеличению содержания  $\text{H}_2\text{O}_2$  в тканях печени (табл. 2). Учитывая данный факт, а также дозозависимый рост активности СОД при действии возрастающих концентраций LiCl (рис. 4а) и структурно-функциональные изменения митохондрий и ЭР (рис. 3б–г), можно полагать, что изменения редокс-баланса обусловлены повышенной генерацией супероксидного анион-радикала и играют сигнальную роль при запуске аутофагии. Однако наше предположение требует дополнительной экспериментальной проверки. Учитывая ограничения используемого в работе метода, необходимо понимать, что повышение содержания  $\text{H}_2\text{O}_2$  в тканях печени при действии 15 мг/кг LiCl (табл. 2) может быть обусловлено локальным изменением ее концентрации в одном из клеточных компартментов, для которых характерен высокий редокс-статус (митохондрии, пероксисомы, ЭР), и необходимы дополнительные исследования, которые позволят выявить изменения содержания  $\text{H}_2\text{O}_2$  в клетках в условиях *in vivo*.

Интересно, что наиболее значительные изменения ультраструктуры гепатоцитов затрагивали организацию ЭР (рис. 3), что, несомненно, свидетельствует о модификации его функциональной активности. Подобные изменения ЭР описаны для первичной культуры гепатоцитов крысы при активации аутофагии на фоне действия липополисахаридов (Dangi et al., 2016) и в тканях печени крыс при использовании ксенобиотиков (Masaki, 1987). Воздействие фенобарбитала на печень крыс приводило к пролиферации гЭР, который непосредственно задействован в детоксикации ксенобиотиков с усиленным образованием ферментов цитохрома Р-450 (СYP) (Stäubli et al., 1969). Следует также учитывать, что мембраны ЭР не только участвуют в инициации образования фагофора на начальном этапе аутофагии, но и сами могут удаляться в процессе селективной аутофагии — ЭР-фагии (рис. 2г). Считается, что ЭР-фагия необходима для деградации части ЭР, его дальнейшего восстановления и поддержания в нормальном функциональном состоянии. При микроаутофагии лизосома непо-

средственно поглощает фрагменты ЭР, тогда как при макроаутофагии участки ЭР сначала упаковываются в аутофагосомы через селективные рецепторы аутофагии, а затем сливаются с лизосомами для деградации (Wilkinson, 2019; Qian et al., 2021).

Показано что у мышей, получавших литий как в токсичных, так и в нетоксичных концентрациях, в печени был увеличен уровень экспрессии GRP94 (белка ЭР), активирующегося в стрессовых условиях, что приводит к накоплению неправильно гликозилированного белка, развитию стресса ЭР и реакции несвернутого белка (UPR) (Nciri et al., 2010; Nciri et al., 2012). Кроме того, ЭР напрямую или косвенно связан с митохондриями, вовлечен в контроль качества митохондрий, регуляцию  $Ca^{2+}$ -метаболизма, окислительного стресса, аутофагии и гибели клеток, а также играет ключевую роль в метаболизме белков и липидов (Ajoalabady et al., 2023).

В настоящее время показано, что высокие (относительно других клеточных компартментов) концентрации пероксида водорода в ЭР обусловлены активностью ферментов, локализованных в мембране или в просвете ЭР, и задействованы в фундаментальных клеточных процессах, осуществляемых данной органеллой. Считается, что локализованные в ЭР флавопротеины ERO1 совместно с членами семейства оксидоредуктаз PDI (катализирующих образование, разрыв и перестройку дисульфидных связей во время сворачивания белка), вносят основной вклад в поддержание высоких концентраций  $H_2O_2$  в ЭР, необходимых при физиологических условиях (Roscoe, Sevier, 2020). Наши данные по небольшому снижению количества белка, которое может подвергаться в клетках окислительным модификациям (Fe-индуцированная ОМБ) при действии 15 мг/кг лития (табл. 2), а также пролиферация гЭР и расширение канальцев (рис. 3в, з) косвенно могут свидетельствовать об изменении оборота белка, обусловленного как активацией аутофагии, так и изменением функциональной активности ЭР.

В связи с тем, что в наших экспериментах мыши получали литий в отсутствие патологических изменений в печени, без дополнительной экспериментальной проверки нельзя однозначно сказать, чему будут способствовать выявленные литий-индуцированные морфофункциональные изменения ЭР. С одной стороны, наблюдаемые изменения редокс-статуса клеток могут ускорить протекание патоморфологических процессов и привести к развитию окислительного повреждения, стрессу

ЭР и гибели гепатоцитов, в том числе по пути аутофагии. С другой стороны, они могут привести к активации адаптационных механизмов, запуску UPR и (или) аутофагии, направленных на детоксикацию токсичных для клетки метаболитов.

Таким образом, пероральное применение LiCl в течение 3 сут увеличивало активность антиоксидантных ферментов и активировало процессы аутофагии в тканях печени. Развития окислительного стресса не происходило даже при действии LiCl в дозе 15 мг/кг, действие которого сопровождалось накоплением пероксида водорода в тканях печени и значительными морфофункциональными перестройками митохондрий и ЭР в гепатоцитах. Необходимы дальнейшие детальные экспериментальные исследования эффективности данного индуктора аутофагии при различных патофизиологических состояниях и заболеваниях печени, как при краткосрочном, так и при длительном применении.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда и Академии наук Республики Татарстан по проекту № 24-25-20086.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу с животными осуществляли согласно принципам, изложенным в Декларации прав животных (World Medical Association Declaration of Helsinki), а также принятых Европейской конвенцией по защите прав позвоночных животных (18.03.1986, Страсбург). Эксперименты с использованием лабораторных животных утверждены этической комиссией ФИЦ Казанского научного центра РАН (протокол № 23/7 от 12.05.2023).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бгатова Н. П., Гаврилова Ю. С., Лыков А. П., Соловьева А. О., Макарова В. В., Бородин Ю. И., Коненков В. И. 2017. Апоптоз и аутофагия в клетках гепатокарциномы, индуцированные различными формами солей лития. Цитология. Т. 59. № 3. С. 178. (Bgatova N. P., Gavrilova Y. S., Lykov A. P., Solovieva A. O., Makarova V. V.,

- Borodin Y. I., Konenkov V. I.* 2017. Apoptosis and autophagy in hepatocarcinoma cells induced by different forms of lithium salts. *Tsitologiya*. V. 59. № 3. P. 178.)
- Aebi H.* 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* V. 105. P. 121. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- Ajoolabady A., Kaplowitz N., Lebeaupin C., Kroemer G., Kaufman R. J., Malhi H., Ren J.* 2023. Endoplasmic reticulum stress in liver diseases. *Hepatology*. V. 77. P. 619. <https://doi.org/10.1002/hep.32562>
- Bortolozzi A., Fico G., Berk M., Solmi M., Fornaro M., Quevedo J., Zarate C. A. Jr., Kessing L. V., Vieta E., Carvalho A. F.* 2024. New advances in the pharmacology and toxicology of lithium: a neurobiologically oriented overview. *Pharmacol. Rev.* V. 76. P. 323. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000007>
- Colombo G., Clerici M., Garavaglia M. E., Giustarini D., Rossi R., Milzani A., Dalle-Donne I.* 2016. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Life Sci.* V. 1019. P. 178. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.11.052>
- Costa A. J., Erustes A. G., Sinigaglia R., Girardi C. E. N., Pereira G. J. S., Ureshino R. P., Smaili S. S.* 2021. Lack of autophagy induction by lithium decreases neuroprotective effects in the striatum of aged rats. *Pharmaceutics*. V. 13. P. 135. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020135>
- Cribb A. E., Leeder J. S., Spielberg S. P.* 1989. Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* V. 183. P. 195. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90188-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90188-7)
- Damri O., Natour S., Agam G.* 2021. Do autophagy enhancers/ROS scavengers alleviate consequences of mild mitochondrial dysfunction induced in neuronal-derived cells? *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 5753. <https://doi.org/10.3390/ijms22115753>
- Dangi A., Huang C., Tandon A., Stolz D., Wu T., Gandhi C. R.* 2016. Endotoxin-stimulated rat hepatic stellate cells induce autophagy in hepatocytes as a survival mechanism. *J. Cell Physiol.* V. 231. P. 94. <https://doi.org/10.1002/jcp.25055>
- Deline M. L., Straub J., Patel M., Subba P., Grashei M., van Heijster F. H. A., Pirkwieser P., Somoza V., Livingstone J. D., Beazely M., Kendall B., Gingras M. J. P., Leonenko Z., Höschel C., Harrington G., Kuellmer K., Bian W., Schilling F., Fisher M. P. A., Helgeson M. E., Fromme T.* 2023. Lithium isotopes differentially modify mitochondrial amorphous calcium phosphate cluster size distribution and calcium capacity. *Front. Physiol.* V. 14. Art. ID: 1200119. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1200119>
- Dossymbekova R., Bgatova N., Tungushbayeva Z., Sharipov K., Taneyeva G., Kydyrbaeva A., Solovieva A.* 2020. Effect of lithium carbonate on autophagy and proliferative activity of isolated hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 528. P. 343. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.057>
- Durak I., Yurtarslan Z., Canbolat O., Akyol O.* 1993. A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin. Chim. Acta.* V. 214. P. 103. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(93\)90307-p](https://doi.org/10.1016/0009-8981(93)90307-p)
- Engin A. B., Engin A., Engin E. D., Memis L.* 2023. Does lithium attenuate the liver damage due to oxidative stress and liver glycogen depletion in experimental common bile duct obstruction? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* V. 466. Art. ID: 116489. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116489>
- Halliwell G., Gutteridge J. M. C.* 1999. Targets of attacks: fatty acids and lipoproteins. Free radicals in biology and medicine. N.-Y.: Oxford University Press.
- Humbert M., Morán M., de la Cruz-Ojeda P., Muntané J., Wiedmer T., Apostolova N., McKenna S. L., Velasco G., Balduini W., Eckhart L., Janji B., Sampaio-Marques B., Ludovico P., Žerovnik E., Langer R., Perren A., Engedal N., Tschan M. P.* 2020. Assessing autophagy in archived tissue or how to capture autophagic flux from a tissue snapshot. *Biology (Basel)*. V. 9. Art. ID: 59. <https://doi.org/10.3390/biology9030059>
- Jiang Z. Y., Woollard A. C., Wolff S. P.* 1990. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett.* V. 268. P. 69. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80974-n](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80974-n)
- Jung S. R., Lee J. H., Ryu H., Gao Y., Lee J.* 2024. Lithium and exercise ameliorate insulin-deficient hyperglycemia by independently attenuating pancreatic  $\alpha$ -cell mass and hepatic gluconeogenesis. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* V. 28. P. 31. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2024.28.1.31>
- Kiełczykowska M., Polz-Dacewicz M., Kopiał E., Mitrus O., Kurzepa J., Marzec Z., Musik I.* 2020. Selenium prevents lithium accumulation and does not disturb basic microelement homeostasis in liver and kidney of rats exposed to lithium. *Ann. Agric. Environ. Med.* V. 27. P. 129. <https://doi.org/10.26444/aaem/105926>
- L'Abbate S., Nicolini G., Marchetti S., Forte G., Lepore E., Unfer V., Kusmic C.* 2023. Lithium treatment induces cardiac dysfunction in mice. *Int. J. Mol. Sci.* V. 24. Art. ID: 15872. <https://doi.org/10.3390/ijms242115872>
- Liu A., Fang H., Dahmen U., Dirsch O.* 2013. Chronic lithium treatment protects against liver ischemia/reperfusion injury in rats. *Liver Transpl.* V. 19. P. 762. <https://doi.org/10.1002/lt.23666>
- Ma X., McKeen T., Zhang J., Ding W. X.* 2020. Role and mechanisms of mitophagy in liver diseases. *Cells*. V. 9. Art. ID: 837. <https://doi.org/10.3390/cells9040837>
- Masaki R., Yamamoto A., Tashiro Y.* 1987. Cytochrome P-450 and NADPH-cytochrome P-450 reductase are degraded in the autolysosomes in rat liver. *J. Cell Biol.* V. 104. Art. ID: 1207. <https://doi.org/10.1083/jcb.104.5.1207>
- Maurer I. C., Schippel P., Volz H. P.* 2009. Lithium-induced enhancement of mitochondrial oxidative phosphorylation in human brain tissue. *Bipolar Disord.* V. 11. P. 515. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2009.00729.x>
- Mizushima N., Yoshimori T., Levine B.* 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*. V. 140. P. 313. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.028>

- Nciri R., Allagui M. S., Bouroga E., Saoudi M., Murat J. C., Croute F., Elfeki A.* 2012. Lipid peroxidation, antioxidant activities and stress protein (HSP72/73, GRP94) expression in kidney and liver of rats under lithium treatment. *J. Physiol. Biochem.* V. 68. P. 11. <https://doi.org/10.1007/s13105-011-0113-3>
- Nciri R., Allagui M. S., Vincent C., Murat J. C., Croute F., El Feki A.* 2010. Chronic lithium administration triggers an over-expression of GRP94 stress protein isoforms in mouse liver. *Food Chem. Toxicol.* V. 48. P. 1638. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.038>
- Paglia D. E., Valentine W. N.* 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* V. 70. P. 158.
- Qian H., Chao X., Williams J., Fulte S., Li T., Yang L., Ding W. X.* 2021. Autophagy in liver diseases: a review. *Mol. Aspects Med.* V. 82. Art. ID: 100973. <https://doi.org/10.1016/j.mam.100973>
- Roscoe J. M., Sevier C. S.* 2020. Pathways for Sensing and Responding to Hydrogen Peroxide at the Endoplasmic Reticulum. *Cells.* V. 9. Art. ID: 2314. <https://doi.org/10.3390/cells9102314>
- Russi S., Sgambato A., Bochicchio A. M., Zoppoli P., Aieta M., Capobianco A. M. L., Ruggieri V., Zifarone E., Falco G., Laurino S.* 2021. CHIR99021, through GSK-3 $\beta$  targeting, reduces epithelioid sarcoma cell proliferation by activating mitotic catastrophe and autophagy. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. Art. ID: 11147. <https://doi.org/10.3390/ijms22011147>
- Rysted J. E., Lin Z., Walters G. C., Rauckhorst A. J., Noterman M., Liu G., Taylor E. B., Strack S., Usachev Y. M.* 2021. Distinct properties of Ca<sup>2+</sup> efflux from brain, heart and liver mitochondria: the effects of Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> and the mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange inhibitor CGP37157. *Cell Calcium.* V. 96. Art. ID: 102382. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102382>
- Samad N., Bilal K., Yasmin F., Khaliq S., Zaman A., Ayaz M. M.* 2020. Effect of lithium chloride on d-galactose induced organs injury: possible antioxidative role. *Pakistan J. Pharm. Sci.* V. 33. P. 1795.
- Sarkar S., Krishna G., Imarisio S., Saiki S., O'Kane C. J., Rubinsztein D. C.* 2008. A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin. *Hum. Mol. Genet.* V. 17. P. 170. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm294>
- Singh B., Bhaskar S.* 2019. Methods for detection of autophagy in mammalian cells. *Methods Mol. Biol.* V. 2045. P. 245. [https://doi.org/10.1007/7651\\_2018\\_190](https://doi.org/10.1007/7651_2018_190)
- Singulani M. P., De Paula V. J. R., Forlenza O. V.* 2021. Mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: therapeutic implications of lithium. *Neurosci. Lett.* V. 760. Art. ID: 136078. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136078>
- Stäubli W., Hess R., Weibel E. R.* 1969. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. II. Effects of phenobarbital on rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* V. 42. Art. ID: 92. <https://doi.org/10.1083/jcb.42.1.92>
- Talebi M., Mohammadi Vadoud S. A., Haratian A., Talebi M., Farkhondeh T., Pourbagher-Shahri A. M., Samarghandian S.* 2022. The interplay between oxidative stress and autophagy: focus on the development of neurological diseases. *Behav. Brain Funct.* V. 18. Art. ID: 3. <https://doi.org/10.1186/s12993-022-00187-3>
- Wang W., Lu D., Shi Y., Wang Y.* 2024. Exploring the neuroprotective effects of lithium in ischemic stroke: a literature review. *Int. J. Med. Sci.* V. 21. P. 284. <https://doi.org/10.7150/ijms.88195>
- Wilkinson S.* 2019. ER-phagy: shaping up and destressing the endoplasmic reticulum. *FEBS J.* V. 286. P. 2645. <https://doi.org/10.1111/febs.14932>

## REDOX STATUS AND ACCUMULATION OF AUTOPHAGOSOMES IN THE LIVER OF MOUSE UNDER THE ACTION OF LITHIUM CHLORIDE

S. A. Dmitrieva<sup>a, \*</sup>, A. A. Ponomareva<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, 420111, Russia

\* e-mail: s\_dmitrieva@list.ru

Activation of autophagy is considered one of the promising strategies for the treatment and prevention of various non-infectious liver diseases. In this work, we assessed the changes in redox status and autophagy activation in liver tissues in vivo under the action of lithium chloride. It was shown that lithium chloride leads to the accumulation of autophagosomes in liver cells under normal conditions. This process is accompanied by a slight increase in the activity of several antioxidant enzymes. Toxic effects on the liver and the development of oxidative stress with 3-day use of LiCl were not detected. Significant rearrangements in the ultrastructure of the endoplasmic reticulum were observed, which can play a signaling role and participate in the initiation of autophagy. Thus, oral application of lithium chloride can be used as an effective modulator of the autophagy process in liver tissues.

**Keywords:** liver, autophagy, lithium chloride, endoplasmic reticulum