

Торшин И.Ю.¹, Громова О.А.², Майорова Л.А.³, Волков А.Ю.⁴

¹ФГБОУ ВО «Московский физико-технический институт», Долгопрудный, Россия; ²ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново, Россия; ³ФГБОУ ВО «Ивановский государственный химико-технологический университет», Иваново, Россия; ⁴ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет» МСХА им К.А. Тимирязева, Москва

¹141700, Московская область, Долгопрудный, Институтский пер., 9; ²153300, Иваново, Шереметевский пр., 8; ³153460, Иваново, Шереметевский пр. 7; ⁴127550, Москва, ул. Тимирязевская, 49

О таргетных белках, участвующих в осуществлении нейропротекторных эффектов цитрата лития

Препараты на основе органических солей лития являются перспективными нейропротекторами, которые эффективны уже в микромольном диапазоне концентраций и при этом отличаются высокой безопасностью (V класс токсичности).

Цель исследования – выяснение более детальных механизмов осуществления биологических и фармакологических эффектов цитрата лития посредством анализа возможных взаимодействий иона лития с белками протеома человека, которые представлены также в протеоме крысы.

Материал и методы. С использованием цитрата лития проведена экспериментальная валидация двух таргетных белков лития – гликоген синтетазы 3β (GSK-3β) и инозитол монофосфатазы 1 (IMPA1).

Результаты. Показано, что курсовой прием цитрата лития *per os* снижает активность этих белков в гидролизатах головного мозга крыс. Проведен анализ эффектов лития в масштабе протеомов человека и крысы. Установлено существование 47 белков в протеомах человека и крысы, активность которых зависит от ионов лития. Выделено четыре группы литий-зависимых белков: 1) регулируемые посредством киназы GSK3β; 2) модулирующие уровень инозитолфосфатов; 3) модулирующие метаболизм нейротрансмиттеров; 4) действующие посредством других механизмов.

Ключевые слова: цитрат лития; нейропротекция; механизм действия; таргетные белки; биоинформатика.

Контакты: Торшин Иван Юрьевич; tiy1357@yandex.ru

Для ссылки: Торшин ИЮ, Громова ОА, Майорова ЛА, Волков АЮ. О таргетных белках, участвующих в осуществлении нейропротекторных эффектов цитрата лития. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика.* 2017;9(1):78–83.

Targeted proteins involved in the neuroprotective effects of lithium citrate

Torshin I. Yu.¹, Gromova O. A.², Mayorova L. A.³, Volkov A. Yu.⁴

¹Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudnyi, Moscow Region, Russia; ²Ivanovo State Medical Academy, Ministry of Health of Russia, Ivanovo, Russia; ³Ivanovo State University of Chemistry and Technology, Ivanovo, Russia; ⁴Russian State Agrarian University, K.A. Timiryazev Moscow Agricultural Academy, Moscow, Russia

¹9, Institutsky Lane, Dolgoprudnyi, Moscow Region 141700; ²8, Sheremetevsky Passage, Ivanovo 153300; ³7, Sheremetevsky Passage, Ivanovo 153460; ⁴49, Timiryazevskaya St., Moscow 127550

Preparations based on organic lithium salts are promising neuroprotective agents that are effective just in the micromolar concentration range and, at the same time, have high safety (Toxicity Class V).

Objective: to elucidate more detailed mechanisms responsible for the biological and pharmacological effects of lithium citrate, by analyzing the possible interactions of lithium ion with human proteome proteins that are also represented in the rat proteome.

Material and methods. The targets of lithium are two proteins, such as glycogen synthase-3β (GSK-3β) and inositol monophosphatase 1 (IMPA1), were experimentally validated using lithium citrate.

Results. The cycle use of oral lithium citrate was shown to decrease the activity of these proteins in the rat brain hydrolysates. The effects of lithium were analyzed in the human and rat proteomes. 47 proteins were ascertained to be present in the human and rat proteomes, the activity of which depended on lithium ions. There were 4 groups of lithium-dependent proteins: 1) the proteins regulated by GSK3β kinase; 2) those modulating the level of inositol phosphates; 3) those modulating the metabolism of neurotransmitters; 4) those working via other mechanisms.

Keywords: citrate lithium; neuroprotection; mechanism of action; targeted proteins; bioinformatics.

Contact: Ivan Yuryevich Torshin; tiy1357@yandex.ru

For reference: Torshin IYu, Gromova OA, Mayorova LA, Volkov AYU. Targeted proteins involved in the neuroprotective effects of lithium citrate. *Neurologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika = Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics.* 2017;9(1):78–83.

DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/2074-2711-2017-1-78-83>

Препараты на основе органических солей лития являются перспективными нейропротекторами, которые эффективны уже в микромолярном диапазоне концентраций и при этом отличаются высокой безопасностью (V класс токсичности).

Цель исследования — выяснение более детальных механизмов осуществления биологических и фармакологических эффектов цитрата лития посредством анализа возможных взаимодействий иона лития с белками протеома человека, которые представлены также в протеоме крысы. Результаты анализа протеомных баз данных — NCBI PROTEIN, EMBL, UNIPROT, Human Proteome Map (HPM), BIOCYC-HUMAN и др., — проведенного нами с использованием методов биоинформатики [1–3], показали, что в протеомах человека и крысы существует по меньшей мере 47 белков, активность которых так или иначе может контролироваться ионами лития. Получены экспериментальные подтверждения участия двух литий-зависимых белков — гликоген синтетазы β (GSK-3 β) и инозитол монофосфатазы (IMPA1) в осуществлении фармакологических эффектов цитрата лития.

Материал и методы. *Экспериментальная валидация таргетных литий-зависимых белков, участвующих в нейропротекции.* Взрослые самцы крыс массой 220 ± 40 г ($n=20$, «Белый мох», Московская область) на протяжении всего исследования содержались в стандартных лабораторных условиях (отдельные клетки, условия день-ночь 12/12ч, температура $20-22$ °C, при свободном доступе к пище и воде). Для участия в эксперименте отбирали активных животных, с гладкой блестящей шерстью, без внешних признаков заболеваний.

Модель глобальной церебральной ишемии воспроизводили посредством двусторонней окклюзии общих сонных артерий на 10 мин [4]. Животным под наркозом (хлоралгидрат, 300 мг/кг внутривенно — в/в) производили разрез мягких тканей передней поверхности шеи, после чего выделяли и перевязывали с обеих сторон общие сонные артерии, затем рану послойно ушивали. В данной модели наблюдается снижение мозгового кровотока не менее чем на 30% по сравнению с исходным, а выживаемость весьма высока (75–80%). У большинства выживших животных в остром периоде отмечался небольшой неврологический дефицит. В послеоперационном периоде в течение 1 мес животным вводили цитрат лития *per os* путем зондирования (100 мкг/кг/сут элементарного лития, т. е. 0,016 ммоль/кг/сут, $n=10$) или плацебо (цитрат натрия, $n=10$).

Приготовление гидролизата тканей мозга. Через 1 мес после создания модели крысы были подвержены эвтаназии хлоралгидратом (700 мг/кг в/б) с целью исследования тканей головного мозга. Образцы мозга после экстракции немедленно помещали в жидкий азот, затем нарезали, оттаивали и гомогенизировали посредством ультразвукового сонофикатора Q500 (Qsonica, США). Затем гомогенат мозга центрифугировали (10 000 об/мин, 10 мин, $+4$ °C, центрифуга CF15RN, Hitachi, Япония), отделяли супернатант, который центрифугировали второй раз в тех же условиях.

Оценка активности GSK-3 β в гидролизатах тканей мозга. Измерения проводили с использованием комплекта реактивов CS0990 (Sigma Aldrich, США) для анализа активности GSK-3 β . 500 мкл гидролизата мозга инкубировали на льду (3 ч) в пробирке с гелевыми гранулами (EZview Red Protein G Affinity Gel), на которые были предварительно нанесены моноклональные антитела к GSK-3 β крыс (Sigma Aldrich,

США), и трижды промывали 0,5 мл буферного раствора из комплекта реактивов. Реакционную смесь: пептидный субстрат GSK-3 β , 5 мкл; буфер для анализа, 12,5 мкл, промывочный буфер, 7,5 мкл; АТФ, [γ - 32 P], 2,5 мкл (с удельной активностью 10 мКи/мл) помещали в пробирки с адсорбированной GSK-3 β , инкубировали в течение 30 мин при 20 °C и центрифугировали при $8000 \times g$. Затем 25 мкл реакционной смеси наносили на фосфат-целлюлозную бумагу P81, сушили в течение 1 мин, промывали 4 раза с помощью 10 мл фосфорной кислоты (5 мин), этанолом (1 мин) и ацетоном (1 мин). Образцы сушили при комнатной температуре и количество образовавшегося 32 P-фосфата (которое и является мерой активности GSK-3 β) измеряли с помощью Triathler MultiLabel Tester (Hidex, Финляндия). Содержание общего белка определяли колориметрически, используя набор реагентов Coomassie™ Plus Bradford (Thermo Fisher Scientific, США).

Измерение IMPA1 (IMPase-1) в гидролизатах тканей мозга. 500 мкл гидролизата мозга инкубировали на льду (3 ч) с гелевыми гранулами (EZview Red Protein G), покрытыми моноклональными антителами ab184165 к IMPA1 (Abcam, США), затем промывали 0,5 мл буферного раствора. Измерение активности IMPase-1 проводили с использованием набора реагентов «малахитовый зеленый» MAK307 (Sigma Aldrich, США) для количественного определения фосфата и D-мио-инозит-1-фосфата (Cayman Chem, США) в качестве субстрата фермента IMPase-1. Гелевые гранулы с адсорбированной IMPase-1 размещали на 30 мин в среде, содержащей 50 мМ трис/HCl (pH 7,8), NaCl (10 мМ), KCl (30 мМ), MgSO₄ (4 мМ) и 1 мМ инозитол-1-монофосфата. Затем гранулы извлекали и количество свободного фосфата измеряли колориметрически (620 нм) с использованием малахитового зеленого в соответствии с описанием производителя [5]. Количество фосфата, высвобожденного после 30 мин реакции на 1 мг общего белка, использовали в качестве меры активности фермента IMPase-1.

Результаты. *Ингибирование активности GSK-3 β в гидролизатах мозга после курсового приема цитрата лития.* Установлено, что в гидролизатах головного мозга крыс, получавших плацебо, активность GSK-3 β на пептидном субстрате из набора реагентов CS0990 составила 52639 ± 1822 имп/мин/мг белка. В гидролизатах головного мозга крыс, получавших цитрат лития, активность GSK-3 β снизилась до 36925 ± 2372 имп/мин/мг белка (до 70% исходной активности).

Зависимость активности GSK-3 β от концентрации ионов лития в экспериментах *in vitro* (добавление LiCl в концентрациях 1, 2, 4 ммоль/л) была менее выраженной в гидролизатах мозга крыс, получавших цитрат лития, по сравнению с группой плацебо (рис. 1). Так, после добавления 4 мМ LiCl активность снизилась на 31% в гидролизатах мозга из группы плацебо и только на 15% в гидролизатах мозга из группы цитрата лития.

Таким образом, прием относительно низких доз цитрата лития (100 мкг/кг элементарного лития) в течение 4 нед способствовал снижению активности GSK-3 β в гидролизатах мозга. При этом зависимость активности GSK-3 β от внешних концентраций ионов лития была в существенной степени ослаблена. Снижение активности GSK-3 β в мозге после курсового воздействия цитрата лития может объясняться как прямым ее ингибированием ионами лития, так и опосредованной регуляцией посредством внутриклеточного фосфорилирования.

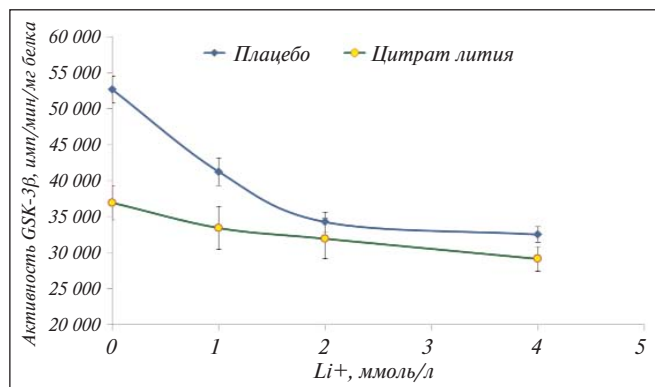


Рис. 1. Активность GSK-3β в гидролизатах мозга крыс, получавших цитрат лития (100 мкг/кг/сут элементарного лития) или плацебо (цитрат натрия)

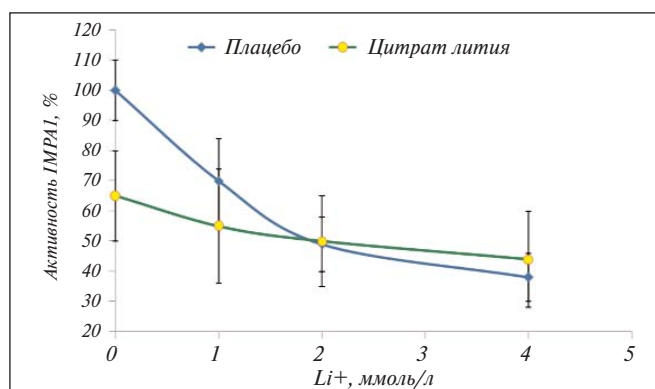


Рис. 2. Активность IMPA1 в гидролизатах мозга крыс, получавших цитрат лития (100 мкг/кг/сут элементарного лития) или плацебо (цитрат натрия)

Ингибирование активности IMPA1 в гидролизатах мозга после курсового приема цитрата лития. В гидролизатах головного мозга в группе плацебо среднюю активность IMPA1 принимали за 100±9%. В гидролизатах мозга в группе цитрата лития активность IMPA1 снизилась до 65±14% (по сравнению с группой плацебо). Как и в случае GSK-3β, зависимость активности IMPA1 *in vitro* от концентрации ионов лития была менее выражена для гидролизатов мозга из группы цитрата лития (рис. 2).

Обсуждение. Существование двух механизмов действия лития (ингибирование GSK-3β и IMPA1), каждый из которых был экспериментально доказан, позволяет предположить, что активность иона лития *in vivo* может быть существенно выше, чем это следует из результатов исследований *in vitro*. Поэтому полученные результаты важно обсудить в контексте протеомов (т. е. совокупности всех белков данного организма) человека и крысы.

Список 47 литий-зависимых белков (включая белки транспорта иона лития) был составлен на основе имеющихся аннотаций геномов, представленным в базах данных NCBI PROTEIN, EMBL, UNIPROT и HPM. Аннотации белков анализировали методом функционального связывания — одной из информационных технологий современной биоинформатики [1–3].

По данным анализа, из 50 057 известных белков протеома человека было выделено 20 180 аннотированных белков, для которых установлены хотя бы основные биологические роли. Из 20 180 белков 47 были так или иначе связаны с осуществлением биологических ролей лития. Условно эти белки названы «литий-зависимыми». Данные белки также представлены в протеоме крысы, причем аминокислотные последовательности литий-зависимых белков протеома крысы характеризовались высокой степенью идентичности соответствующим белкам протеома человека (85±12%).

Анализ показал, что литий-зависимые белки протеомов человека и крысы могут быть разделены на четыре группы: 1) белки, связанные с Wnt/катенин- и другими сигнальными каскадами, регулируемые посредством GSK-3β; 2) белки, связанные с внутриклеточной передачей сигнала посредством фосфоинозитидов; 3) белки, связанные с модуляцией метаболизма нейротрансмиттеров и активности рецепторов нейротрансмиттеров; 3) белки, действующие посредством других механизмов. Анализ протеомов крысы и человека подтвердил, что ингибирование GSK-3β [6–14] и IMPA1 [15–19] — одна из основных фармакологических мишеней действия лития в ЦНС.

Литий-зависимые белки, связанные сигнальными каскадами, регулируемые GSK-3β. Ингибирование ионами лития киназы GSK-3β (ген *GSK3β*) является одним из основных механизмов осуществления фармакологических эффектов препаратов лития. GSK-3β фосфорилирует более 40 белков, среди которых бета-катенин, аксины (модулируют взаимодействия бета-катенина [6]), сигнальные белки MAP1B, MAP2, CREB, фактор ответа на гипоксию, тау-белок, субстрат рецептора инсулина, основной белок миелина, фактор роста нервов, рецептор провоспалительного фактора транскрипции NF-κB (p65 и p105), сигнальный белок Notch [7].

Основной таргетный белок воздействия ионов лития — GSK-3β — представляет собой серин/треониновую киназу, которая распознает и фосфорилирует серины в аминокислотных последовательностях типа [S/T]XXXS(P) таргетных белков [8] (X — произвольный аминокислотный остаток). Среди литий-зависимых белков, обсуждаемых в настоящей работе, соответствующей последовательностью для бета-катенина является DSGIHSGATTTAPS, для белка C/EBPa — TPPTPVPSR, для белка C-Jun — EEPQTVPEMPGETPPLSPIDMESQER, для фактора CREB — KRREILSRPSYR, для фактора трансляции eIF-2B — DSEELDSRAGSPQLD-DIKVF, для тау-белка — TPPKSPSAK, SPVVGDTSPR и др.

Фермент GSK-3β ингибируется непосредственно ионами лития [8], при этом наблюдается снижение экспрессии провоспалительного фактора транскрипции NF-κB и фермента биосинтеза провоспалительных простагландинов (ПГ) циклооксигеназы 2 (ЦОГ2) в ЦНС [9] и др. Белки, активность которых изменяется при ингибировании литием фермента GSK-3β, представлены в таблице.

GSK-3β — **негативный регулятор каскада Wnt**, который необходим для роста аксонов. В процессе внутриклеточной передачи сигнала по каскаду Wnt фермент GSK-3β образует комплекс с бета-катенином (ген *CTNBN1*), что приводит к деградации бета-катенина посредством убиквитин-протеасомного механизма. Ингибирование GSK-3β литием, следовательно, способствует активации нейротрофического каскада Wnt.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И МЕТОДИКИ

Литий-зависимые белки протеомов человека и крысы, регулируемые посредством киназы GSK3B и модулирующие уровни инозитолфосфатов

Ген человека	Ген крысы	Белок	Функция белка/гена	Роли иона лития
Белки, регулируемые посредством GSK-3β				
<i>GSK-3B</i>	<i>Gsk-3B</i>	Киназа GSK3b	Контроль нейротрофического каскада Wnt и гомеостаза глюкозы	Ингибирование фермента
<i>MAPT</i>	<i>Mtapt</i>	Тау-белок	Стабилизация микротрубочек	Повышение активности тау-белка
<i>FABP4</i>	<i>Fabp4</i>	Транспортный белок жирных кислот	Липогенез, гомеостаз холестерина	Снижение экспрессии FABP4
<i>CDH1</i>	<i>Cdh1</i>	Е-кадгерин	Стабилизация бета-катенина в пути Wnt	Повышение экспрессии CDH1
<i>COX2</i>	<i>Ptgs2</i>	ПГ G/H-синтаза 2	Продукция провоспалительных ПГ	Снижение экспрессии провоспалительного NF-κB и уровня ЦОГ2 в ЦНС
<i>CEBPA</i>	<i>Cebpa</i>	ССААТ/энхансер-связывающий белок альфа	Выживание нейронов, экспрессия нейротрофических факторов, глюко-неогенез	Увеличение продолжительности жизни белка CEBPA посредством ингибирования протеасом
<i>NFATC4</i>	<i>Nfatc4</i>	Ядерный фактор активированных Т-клеток 4	Индукция ИЛ2, 4, апоптоз сенсорных нейронов	Увеличение транслокации NFATC4 в ядро, что приводит к повышению уровня проапоптотического FasL
<i>FAS</i>	<i>Tnfrsf6</i>	Апоптоз-опосредующий антиген FAS	Рецептор проапоптотического FAS-лиганда	Активация рецептора Fas
<i>NR1D1</i>	<i>Nr1d1</i>	Внутриядерный рецептор ID1	Литий-чувствительный компонент циркадных часов, липогенез, глюконеогенез	Ускорение деградации NR1D1 на протеосомах и активация гена <i>BMAL1</i> циркадных часов
<i>ID2</i>	<i>Id-2</i>	Ингибитор ID2 ДНК-связывающих белков	Поддержание циркадного ритма, регулирование дифференциации нейронов	Повышение экспрессии при активации каскада Wnt
<i>EIF2B5</i>	<i>Eif2be</i>	Фактор инициации трансляции eIF-2B эпсилон	Дифференциация астроцитов, миелинизация	Ингибирование GSK3B активирует белок eIF-2B
<i>ASCL1</i>	<i>Ash1</i>	Сигнальный белок ASCL1	Развитие различных типов нейронов в ЦНС, ингибирование апоптоза	Активация
<i>MYOG</i>	<i>Myog</i>	Миогенин	Дифференциация миоцитов, адаптация мышц	Повышение уровня миогенина, индуцирование дифференциации посредством стабилизации бета-катенина
Белки, участвующие во внутриклеточной передаче сигнала посредством фосфоинозитидов				
<i>IMPA1</i>	<i>Impr1</i>	IMPA1	Обеспечение клетки инозитолом для синтеза фосфатидинозитолов	Белок содержит литий-связывающий сайт, ионы лития ингибируют фермент
<i>IMPA2</i>	<i>Impr2</i>	IMPA2	Дефосфорилирование инозитолфосфатов до мио-инозитола	Модуляция активности промотора IMPA2, ингибирование фермента
<i>IMPAD1</i>	<i>Impr3</i>	IMPA3	Дефосфорилирование инозитолфосфатов до мио-инозитола	Ингибирование
<i>INPP1</i>	<i>Inpp1</i>	Инозитол-полифосфат-1-фосфатаза	Дефосфорилирование 1D-мио-инозитол-1,4-бисфосфата до мио-инозитол-4-фосфата	Ингибирование
<i>PTK2B</i>	<i>Ryk2</i>	Тирозинкиназа 2β	Регуляция NMDA- рецепторов, активация PI3K, каскадов AKT1, ERK1, ERK2	Подавление фосфорилирования остатка тирозина 402, инактивация NMDA- рецептора

Примечание. ПГ – простагландин; ИЛ – интерлейкин.

Фосфорилирование *GSK-3β* также влияет на активность сигнального белка *Notch*, участвующего в дифференциации нейронов. Ингибирование *GSK-3β* сокращало время

жизни сигнального белка *Notch1* [10], повышало активность транскрипционного фактора *HES-1*, регулирующего деление и дифференцировку клеток [11]. Таким образом,

ингибирование GSK-3 β ионами лития ускоряет дифференциацию нейрональных клеток-предшественников [12], что важно для восстановления поврежденных нервных путей.

Литий стимулирует дифференциацию астроцитов и синтез миелина. Фосфорилирование GSK-3 β ингибирует белок eIF-2B, который является фактором инициации трансляции в процессе дифференциации астроцитов и миелинизации нейронов [13]. Дефекты гена *EIF2B5* приводят к лейкодистрофии, а ингибирование литием GSK-3 β , наоборот, повышает активность белка eIF-2B. Ион лития, ингибируя GSK-3 β , также увеличивает продолжительность жизни белка СЕВРА (ССААТ/энхансер-связывающий белок альфа), который поддерживает выживание нейронов, обучение, память, экспрессию нейротрофических факторов [14] и значительно увеличивает способность тау-белка связывать и стабилизировать микротрубочки за счет устранения его гиперфосфорилирования [8]. Как известно, низкостабильный тау-белок является основным компонентом амилоидных бляшек при болезни Альцгеймера, а гиперфосфорилирование тау-белка считается одним из механизмов патогенеза нейродегенеративной патологии.

Селективное ингибирование фермента GSK-3 β ионами лития. Ионы лития ингибируют GSK-3 β посредством конкурентного вытеснения иона магния [20], причем данный эффект характерен только для ионов лития и не наблюдается для ионов других щелочных металлов (натрия, калия, цезия, рубидия). По многим физико-химическим свойствам ионы лития гораздо ближе к ионам магния (группа IIA периодической системы элементов Д.И. Менделеева), чем к ионам других щелочных металлов (группа IA). В частности, ионы лития и магния являются неполяризуемыми «твердыми» катионами с высокой плотностью заряда и сильным сродством к кислородсодержащим лигандам. Оба иона характеризуются близкими ионными радиусами: $r(\text{Li}^+) = 0,59 \text{ \AA}$ и $r(\text{Mg}^{2+}) = 0,57 \text{ \AA}$ для координационного числа 4, $r(\text{Li}^+) = 0,76 \text{ \AA}$ и $r(\text{Mg}^{2+}) = 0,72 \text{ \AA}$ для координационного числа 6 [21].

Проведен систематический анализ координационной химии ионов лития и магния в активном центре GSK-3 β с помощью вычисления энергии процесса вытеснения иона магния ионом лития по методу Пуассона [22]. Результаты анализа показали, что конкуренция между катионами магния и лития зависит от суммарного заряда комплекса белок – катион, числа катионов металлов и наличия определенной конфигурации отрицательно заряженных групп в активном центре фермента. Уникальные конфигурации активных центров ферментов GSK-3 β и IMPA1 гарантируют, что ион лития будет ингибировать именно эти, а не другие магниезависимые ферменты [22].

Активный центр фермента GSK-3 β включает ион магния-связывающий сайт, образованный аспаратом (D200) и аспарагином (N186), нумерация по файлу PDB 1j1c; аспарат D200 может дополнительно связывать второй ион магния (PDB 1рух). Как показали результаты моделирования энергетики активного центра GSK-3 β , если активный центр GSK-3 β связывает два иона магния, замена одного из ионов магния ионом лития становится энергетически выгодной (т. е. $\Delta G < 0$, $\Delta G = -20,6 \dots -4,8$ ккал/моль) [22]. Наоборот, если только один ион магния связан с активным центром фермента, то замена этого иона магния на ион лития энергетически невыгодна (т. е. $\Delta G > 0$, $\Delta G = -0,5 \dots +103,7$ ккал/моль).

Следует заметить, что ион лития может ингибировать GSK-3 β и косвенно – за счет увеличения фосфорилирования аминокислоты Ser-9 в GSK-3 β посредством протеинкиназы B (PKB). Фосфорилирование Ser-9 в GSK-3 β инактивирует данный фермент [23]. Например, в эксперименте мыши подвергались глобальной ишемии путем двусторонней окклюзии общей сонной артерии, затем животным вводили 2 ммоль/кг LiCl либо плацебо (0,9% NaCl) в/б. По сравнению с группой плацебо у животных, обработанных LiCl, установлен более высокий уровень Ser9-фосфорилированной формы GSK-3 β (что соответствует инактивации GSK-3 β) и одновременно более высокий уровень Ser473-фосфорилированной формы PKB [24]. Точный молекулярный механизм подобного увеличения фосфорилирования Ser-9 GSK-3 β ионами лития не определен.

Литий-зависимые белки, связанные с внутриклеточной передачей сигнала посредством фосфоинозитидов. Регуляция ионом лития ряда ферментов метаболизма инозитолфосфатов представляет собой второй из наиболее исследованных молекулярных механизмов осуществления фармакологических эффектов лития. Инозитолфосфаты – важные сигнальные молекулы, опосредующие передачу сигнала от различных нейрональных рецепторов (ацетилхолиновых, дофаминовых и др.) внутрь клетки.

Фермент инозитол монофосфатаза-1 (ген *IMPA1*) обеспечивает нейроны инозитолом для синтеза фосфатидилинозитолов и является одной из основных фармакологических мишеней действия лития в ЦНС. Белок содержит литий-связывающий сайт и непосредственно ингибируется ионами лития [15]. Ингибируя IMPA1, литий вызывает накопление мио-инозитола в форме Ins(1)P, что тормозит синтез всех фосфоинозитидов, их уровень снижается, и, соответственно, модулируется отклик нейронов на стимулирование различных рецепторов [17, 18]. В частности, инозитол-дефицитная пища усиливает холинергическое действие лития в эксперименте [18]. Молекулярные эффекты лития частично имитируются у животных с делецией гена инозитол-монофосфатазы (*IMPA1*) [19].

Селективное ингибирование фермента IMPA1 ионами лития. Прямое ингибирование фермента IMPA1 ионами лития является хорошо доказанным. Исследования IMPA1 с использованием мутагенеза, кинетики и флуоресценции [25, 26] свидетельствуют о том, что ион лития непосредственно взаимодействует с одним из атомов кислорода фосфатной группы субстрата фермента, что приводит к вытеснению одного из трех ионов магния активного центра. Активный центр фермента IMPA1 содержит три магниезвязывающих сайта: сайт I с высоким сродством к магнию (Glu-70, Asp-90, Ile-92) и сайты II (Asp-90, Asp-93, Asp-220) и III (Glu-70, Lys-36, Asp-41) с низким сродством к магнию

Связывание иона лития в активном центре IMPA1 было изучено с использованием метода твердотельного ядерного магнитного резонанса с изотопной меткой лития (^7Li). Эти экспериментальные данные хорошо согласуются со связыванием иона лития сайтами I или II, но не сайтом III. Биохимические данные демонстрируют намного более сильное сродство сайта I к иону магния, что подтверждает наименьшую вероятность связывания с этим сайтом иона лития. Соответственно, ион лития с наибольшей вероятностью связывается именно с сайтом II (Asp-90, Asp-93, Asp-220).

Данные результаты также согласуются и с упоминаемыми ранее результатами моделирования активных центров ферментов GSK-3 β и IMPA1 и расчетов энергий замены ионов магния на ионы лития [22]. В частности, эти два фермента, являющиеся основными целевыми белками для лития, характеризуются активными центрами с высокой плотностью положительного заряда, достаточно крупными лигандами (пептиды, инозитолфосфаты) и высокой доступностью молекул воды к ионам магния в активных центрах этих двух ферментов. В других магниевых-зависимых ферментах в активном центре присутствует, как правило, только один ион магния. При этом доступность молекул воды к иону магния у многих ферментов близка к нулю, т. е. ион магния находится достаточно глубоко в структуре фермента. В результате вытеснение литием ионов магния из активных центров этих ферментов становится энергетически невыгодным [22]. Таким образом, в контексте протеома человека процессы ингибирования GSK-3 β и IMPA1, по всей видимости, представляют собой достаточно специфичные механизмы осуществления фармакологических эффектов цитрата лития.

Заключение. Экспериментальные исследования позволили подтвердить, что курсовой прием цитрата лития способствует ингибированию GSK3 β и IMPA1 в гидролизатах головного мозга крыс, у которых была воспроизведена модель глобальной ишемии. С использованием современных методов биоинформатики выделены и описаны литий-зависимые белки протеомов человека и крысы. Результаты указывают на плейотропный эффект ионов лития на протеом. *Во-первых*, ингибируя GSK3 β , литий способствует активации нейротрофических механизмов. *Во-вторых*, ингибируя IMPA1, литий модулирует уровни сигнальных молекул инозитолфосфатов, участвующих в каскадах выживания нейронов. *В-третьих*, ионы лития могут модулировать метаболизм нейротрансмиттеров и степень активации рецепторов нейротрансмиттеров.

Авторы выражают благодарность за поддержку исследования ФГБОУ ВО «Ивановский государственный химико-технологический университет», гос. задание Минобрнауки РФ.

ЛИТЕРАТУРА

- Torshin IYu. Sensing the change from molecular genetics to personalized medicine. New York: Nova Biomedical Books; 2009.
- Громова ОА, Торшин ИЮ, Гришина ТР и др. Систематический анализ молекулярно-физиологических эффектов миоинозитола: данные молекулярной биологии, экспериментальной и клинической медицины. Эффективная фармакотерапия. 2013;(28):4-12. [Gromova OA, Torshin IYu, Grishina TR, et al. A systematic analysis of the molecular physiological effects of myo-Inositol: evidence from molecular biology, experimental and clinical medicine. *Effektivnaya farmakoterapiya*. 2013;(28):4-12. (In Russ.)].
- Громова ОА, Торшин ИЮ, Гришина ТР, Лисица АВ. Перспективы использования препаратов на основе органических солей кальция. Молекулярные механизмы кальция. Лечащий врач. 2013;(4):42-4. [Gromova OA, Torshin IYu, Grishina TR, Lisitsa AV. Prospects of use of preparations based on organic calcium salts. *Molekulyarnye mekhanizmy kal'tsiya. Lechashchii vrach*. 2013;(4):42-4. (In Russ.)].
- Багметов МН. Церебропротективное действие композиций фенибута и фенотропила и их солей в условиях экспериментальной ишемии головного мозга. Дисс. докт. мед. наук. Волгоград; 2006. [Bagmetov MN. Cerebroprotective effect of the compositions of Phenotropil and phenibut and their salts in experimental cerebral ischemia. Diss. doct. med. sci. Volgograd; 2006.]
- http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin_/2/mak307bul.pdf
- Jho Eh, Lomvardas S, Costantini F. A GSK3beta phosphorylation site in axin modulates interaction with beta-catenin and Tcf-mediated gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Dec 9;266(1):28-35.
- Jope RS, Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci*. 2004 Feb;29(2):95-102.
- Ali A, Hoefflich KP, Woodgett JR. Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. *Chem Rev*. 2001 Aug;101(8):2527-40.
- Zheng J, Liu Z, Li W, et al. Lithium posttreatment confers neuroprotection through glycogen synthase kinase-3beta inhibition in intracerebral hemorrhage rats. *J Neurosurg*. 2016 Oct 14:1-9. [Epub ahead of print].
- Foltz DR, Santiago MC, Berechid BE, Nye JS. Glycogen synthase kinase-3beta modulates notch signaling and stability. *Curr Biol*. 2002 Jun 25;12(12):1006-11.
- Espinosa L, Ingles-Esteve J, Aguilera C, Bigas A. Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways. *J Biol Chem*. 2003 Aug 22;278(34):32227-35. Epub 2003 Jun 6.
- Bolos V, Grego-Bessa J, de la Pompa JL. Notch signaling in development and cancer. *Endocr Rev*. 2007 May;28(3):339-63. Epub 2007 Apr 4.
- Welsh GI, Proud CG. Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem J*. 1993 Sep 15;294 (Pt 3):625-9.
- Shim M, Smart RC. Lithium stabilizes the CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBPalpha) through a glycogen synthase kinase 3 (GSK3)-independent pathway involving direct inhibition of proteasomal activity. *J Biol Chem*. 2003 May 30;278(22):19674-81. Epub 2003 Mar 30.
- Haimovich A, Eliav U, Goldbourt A. Determination of the lithium binding site in inositol monophosphatase, the putative target for lithium therapy, by magic-angle-spinning solid-state NMR. *J Am Chem Soc*. 2012 Mar 28;134(12):5647-51. doi: 10.1021/ja211794x. Epub 2012 Mar 15.
- Ackermann KE, Gish BG, Honchar MP, Sherman WR. Evidence that inositol 1-phosphate in brain of lithium-treated rats results mainly from phosphatidylinositol metabolism. *Biochem J*. 1987 Mar 1;242(2):517-24.
- Sherman WR, Gish BG, Honchar MP, Munsell LY. Effects of lithium on phosphoinositide metabolism in vivo. *Fed Proc*. 1986 Oct;45(11):2639-46.
- Shtein L, Agam G, Belmaker RH, Bersudsky Y. Inositol-deficient food augments a behavioral effect of long-term lithium treatment mediated by inositol monophosphatase inhibition: an animal model with relevance for bipolar disorder. *J Clin Psychopharmacol*. 2015 Apr;35(2):175-7. doi: 10.1097/JCP.0000000000000284.
- Damri O, Sade Y, Tokar L, et al. Molecular effects of lithium are partially mimicked by inositol-monophosphatase (IMPA)1 knockout mice in a brain region-dependent manner. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2015 Mar;25(3):425-34. doi: 10.1016/j.euroneuro.2014.06.012. Epub 2014 Aug 7.
- Ryves WJ, Harwood AJ. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;280(3):720-725.
- Shannon RD. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Cryst*. 1976. A32, 751-67. doi: 10.1107/S0567739476001551
- Dudev T, Lim C. Competition between Li+ and Mg2+ in metalloproteins. Implications for lithium therapy. *J Am Chem Soc*. 2011 Jun 22;133(24):9506-15. doi: 10.1021/ja201985s. Epub 2011 May 31.
- McManus EJ, Sakamoto K, Armit LJ, et al. Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *EMBO J*. 2005 Apr 20;24(8):1571-83. Epub 2005 Mar 24.
- Fan M, Song C, Wang T, et al. Protective effects of lithium chloride treatment on repeated cerebral ischemia-reperfusion injury in mice. *Neurol Sci*. 2015 Feb;36(2):315-21. doi: 10.1007/s10072-014-1943-x. Epub 2014 Sep 7.
- Pollack SJ, Atack JR, Knowles MR, et al. Mechanism of inositol monophosphatase, the putative target of lithium therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jun 21;91(13):5766-70.
- Greasley PJ, Gore MG. Bovine inositol monophosphatase. Studies on the binding interactions with magnesium, lithium and phosphate ions. *FEBS Lett*. 1993 Sep 27;331(1-2):114-8.

Поступила 20.11.2016

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.