

Влияние лития хлорида на активацию нейтрофилов под действием сыворотки пациентов с септическим шоком (экспериментальное исследование)

О. А. Гребенчиков, И. С. Касаткина, К. К. Каданцева, М. А. Мешков, А. А. Баева

НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКИЦ РР,
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

The Effect of Lithium Chloride on Neutrophil Activation on Exposure to Serum of Patients with Septic Shock

Oleg A. Grebenchikov, Irina S. Kasatkina, Kristina K. Kadantseva,
Mikhail A. Meshkov, Anastasiya A. Bayeva

V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Research
and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology,
25 Petrovka Str., Bldg. 2, 107031 Moscow, Russia

Для цитирования: О. А. Гребенчиков, И. С. Касаткина, К. К. Каданцева, М. А. Мешков, А. А. Баева. Влияние лития хлорида на активацию нейтрофилов под действием сыворотки пациентов с септическим шоком (экспериментальное исследование). *Общая реаниматология*. 2020; 16 (5): 45–55. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2020-5-45-55> [На русск. и англ.]

For citation: Oleg A. Grebenchikov, Irina S. Kasatkina, Kristina K. Kadantseva, Mikhail A. Meshkov, Anastasiya A. Bayeva. The Effect of Lithium Chloride on Neutrophil Activation on Exposure to Serum of Patients with Septic Shock. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2020; 16 (5): 45–55. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2020-5-45-55> [In Russ. and Engl.]

Резюме

Цель исследования — изучить противовоспалительное действие хлорида лития путем воздействия на нейтрофилы человека сыворотки пациентов с септическим шоком *in vitro*.

Материал и методы. Исследование проводили на выделенных из крови 6 здоровых доноров нейтрофилах, которые активировали с помощью сыворотки пациентов с септическим шоком, после чего оценивали их активность с помощью флуоресцентных антител к маркерам дегрануляции CD11b и CD66b. Уровень апоптоза и некроза нейтрофилов человека оценивали через 22 часа после выделения; количественная оценка была проведена с использованием аннексина V и йодистого пропидия на проточном цитофлуориметре. Интактные и активированные нейтрофилы обрабатывали раствором хлорида лития в концентрациях 0,3; 3,0 и 9 ммоль.

Результаты. Уровень экспрессии CD11b на поверхности интактных нейтрофилов (здоровые доноры) составил 3434,50 [3311,0–3799,0] условных единиц флуоресценции (у.е.ф.). Инкубация нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с септическим шоком увеличивала экспрессию CD11b в 2,5 раза — 8589,0 [7279,0–11258,0] у.е.ф. ($p=0,005$) в сравнении с интактными лейкоцитами, и увеличивала экспрессию CD66b в 2,7 раза до 27 600,0 [22 999,0–28 989,0] у.е.ф. ($p=0,005$) в сравнении с интактными нейтрофилами. Лития хлорид дозозависимо в концентрациях — 0,3 ммоль, 3,0 и 9,0 ммоль снижал уровень экспрессии молекул CD11b и CD66b на поверхности активированных нейтрофилов. Септическая сыворотка уменьшала спонтанный апоптоз нейтрофилов, а раствор лития хлорида в дозе 3 ммоль и выше индуцировал спонтанный апоптоз нейтрофилов.

Закключение. Хлорид лития снижает степень активации нейтрофилов, предварительно активированных сывороткой пациентов с септическим шоком, снижает уровень экспрессии молекул CD11b и CD66b на поверхности нейтрофилов, ингибируя процесс их активации (дегрануляции). Лития хлорида в концентрации 3 ммоль и выше способен индуцировать спонтанный апоптоз нейтрофилов, активированных сыворотками пациентов с септическим шоком.

Ключевые слова: септический шок; апоптоз нейтрофилов; лития хлорид; CD11b; CD66b; гликогенсинтаза киназа-3 β ; GSK-3 β

Summary

The aim of the study: to examine the anti-inflammatory effect of lithium chloride by exposing the human neutrophils to serum of patients with septic shock *in vitro*.

Адрес для корреспонденции:

Олег Александрович Гребенчиков
E-mail: oleg.grebenchikov@yandex.ru
Кристина Кирилловна Каданцева
E-mail: kristina161093@gmail.com

Correspondence to:

Oleg A. Grebenchikov
E-mail: oleg.grebenchikov@yandex.ru
Kristina K. Kadantseva
E-mail: kristina161093@gmail.com

Material and methods. The study was carried out on neutrophils extracted from the blood of 6 healthy donors, which were activated with serum from patients with septic shock. The neutrophil activity was evaluated with fluorescent antibodies to the CD11b and CD66b markers of degranulation. The level of human neutrophil apoptosis and necrosis was assessed 22 hours after extraction; quantitative assessment was made using annexin V and propidium iodide with flow cytofluorimetry. Intact and activated neutrophils were treated with 0.3, 3.0 and 9.0 mmol lithium chloride solution.

Results. The level of CD11b expression on the surface of intact neutrophils (healthy donors) was 3434.50 [3311.0–3799.0] arbitrary fluorescence units (AFU). Incubation of neutrophils with serum of patients with septic shock increased CD11b expression 2.5 times to 8589.0 [7279.0–11258.0] AFU ($P=0.005$) vs intact leukocytes, and increased CD66b expression 2.7 times up to 27 600.0 [22 999.0–28 989.0] AFU ($P=0.005$) vs intact neutrophils. Lithium chloride in concentrations of 0.3, 3.0 and 9.0 mmol in a dose-dependent manner reduced the level of expression of CD11b and CD66b molecules on the surface of activated neutrophils. Septic serum reduced spontaneous neutrophil apoptosis, and 3.0 mmol and higher lithium chloride solution induced spontaneous neutrophil apoptosis.

Conclusion. Lithium chloride reduces the activation of neutrophils preactivated by serum of patients with septic shock, reduces expression of CD11b and CD66b molecules on the neutrophil surface, inhibiting the process of their activation (degranulation). Lithium chloride in concentration of 3.0 mmol and higher is able to induce spontaneous apoptosis of neutrophils activated by serum of patients with septic shock.

Keywords: CD11b; CD66b; lithium chloride; GSK-3 β ; glycogen synthase kinase 3 β ; septic shock; neutrophil apoptosis

https://doi.org/10.15360/1813-9779-2020-5-45-55

Введение

Синдром системного воспалительного ответа (ССВО) возникает при повреждении, вызванном как воздействием бактериальных или вирусных агентов, так и тяжелой сочетанной травмой, ожогами, оперативными вмешательствами большого объема [1]. Выраженность ССВО зависит от продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, активации нейтрофилов и макрофагов, с последующим их проникновением через гистогематические барьеры и инфильтрацией тканей органов-мишеней [2, 3], что является причиной полиорганной недостаточности, являющейся на сегодняшний день основной причиной летальности пациентов в реанимационных отделениях. В развитии и разрешении воспаления важную роль играют нейтрофилы. Иммунный ответ на инфекцию и повреждение тканей направлен на удаление повреждающего агента, восстановление гомеостаза и берет свое начало с выделения нейтрофилами провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [4].

Белковые молекулы CD11b и CD66b являются наиболее изученными маркерами ССВО, находящимися во внутриклеточных гранулах нейтрофилов. Воспалительные стимулы способствуют слиянию гранул с цитоплазматической мембраной, в результате чего молекулы CD11b и CD66b экспонируются на поверхности клеток (рис. 1). Данный процесс получил название дегрануляции. Известно, что CD11b способен взаимодействовать с рецепторами ICAM-1 на эндотелии, что обеспечивает адгезию нейтрофилов к эндотелиальному барьеру и дальнейшее их продвижение к очагу воспа-

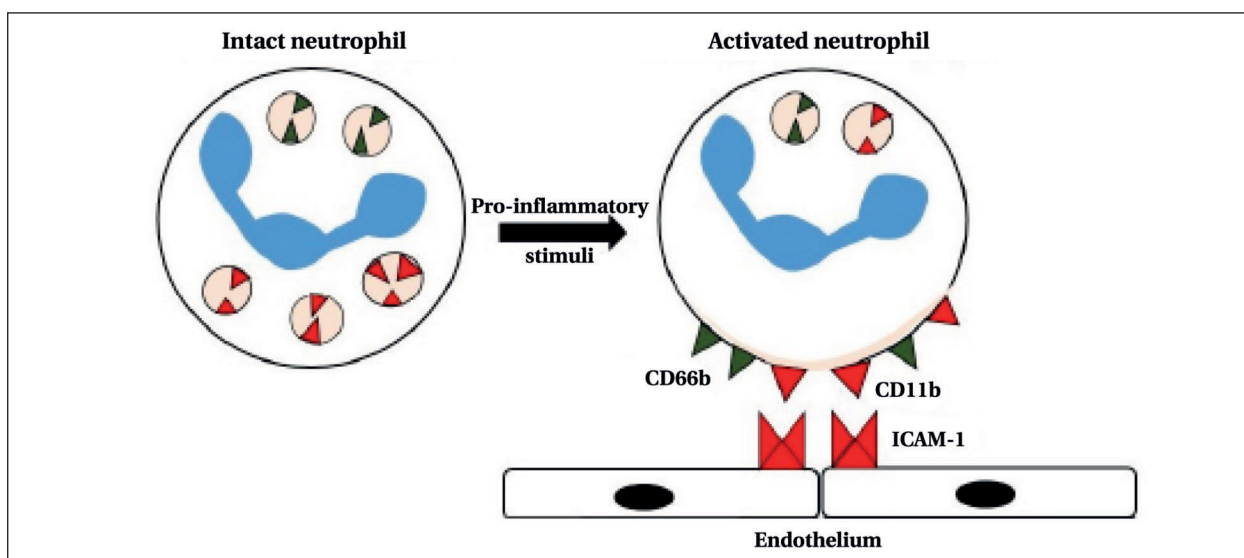
Introduction

Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) occurs in response to the damage caused by exposure to bacterial and viral agents, as well as severe combined injuries, burns and major surgical interventions [1]. Severity of SIRS depends on production of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, activation of neutrophils and macrophages, their subsequent penetration through the blood-tissue barriers and infiltration of target organ tissue [2, 3], which can result in multi-organ failure, being the leading cause of death in patients in intensive care units. Neutrophils play an important role in the development and resolution of inflammation. The immune response to infection and tissue damage aims to remove the damaging agent, restore homeostasis, and starts with the release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines by neutrophils [4].

The protein molecules CD11b and CD66b located in intracellular neutrophil granules are the most studied markers of SIRS. Inflammatory stimuli promote fusion of granules with cytoplasmic membrane and cause exposition of CD11b and CD66b molecules on the cell surface (Fig.). This process is called degranulation. CD11b is known to interact with endothelial ICAM-1 receptors ensuring the adhesion of neutrophils to the endothelial barrier and their further advancement to the inflammation zone [5]. The CD66b molecule is associated with neutrophil aggregation [6].

Expression of CD11b and CD66b molecules is consistently increased in patients with sepsis of various causes, and their level assessment has long been used in clinical diagnostics [7, 8].

Excessive immune response associates with over-activation of neutrophils and other immune



Активация нейтрофилов и экспрессия ими молекул адгезии CD11b (красный треугольник) и CD66b (зеленый треугольник) под действием воспалительного стимула.

Activation of neutrophils and expression of the CD11b (red triangle) and CD66b (green triangle) adhesion molecules after exposure to a pro-inflammatory stimulus.

Note. ICAM-1 — Inter-Cellular Adhesion Molecule, expressed on endothelium.

Примечание. ICAM-1 — англ. Inter-Cellular Adhesion Molecule, молекула клеточной адгезии, которая экспрессируется эндотелием; intact/activated neutrophil — интактный/активированный нейтрофил; pro-inflammatory stimuli — воспалительные стимулы.

ления [5]. Молекула CD66b связана с агрегацией нейтрофилов [6].

В клинической диагностике достаточно давно применяется определение экспрессии молекул CD11b и CD66b, уровень которых достоверно повышается у пациентов при сепсисе различного генеза [7, 8].

Избыточный иммунный ответ сопровождается чрезмерной активацией нейтрофилов, а также других клеток иммунной системы и избыточным синтезом провоспалительных цитокинов, приводящих к развитию такого опасного явления, как «цитокиновая буря». Она нередко сопровождается последующим развитием «иммунного паралича», который, в свою очередь, является причиной увеличения числа осложнений и летальности у пациентов, находящихся на лечении в палате интенсивной терапии [9].

В этой связи важнейшей задачей современной реаниматологии является поиск препаратов для купирования гиперактивированного состояния иммунной системы.

Таблетированный препарат, основой которого являются соли лития (карбонат лития, седалит), ограниченно, но длительное время используется (в психиатрии), прежде всего - для лечения маниакальных и гипоманиакальных фаз биполярного аффективного расстройства. Однако, в последнее время накопилось достаточно новых данных о его высокой эффективности при критических состояниях,

cells with excessive production of pro-inflammatory cytokines, leading to potentially lethal «cytokine storm». It is often followed by «immune paralysis», which causes an increase in morbidity and mortality in patients of intensive care units [9].

In this regard, the search for drugs to relieve the immune hyperactivation is an important challenge of contemporary intensive care.

The tablet preparation based on lithium salts (lithium carbonate) has been used for a long time (with some limitations) in psychiatric practice primarily to treat manic and hypomaniacal phases of bipolar affective disorder. However, recently there has been sufficient evidence of its high efficiency in ischemia/reperfusion conditions. Lithium ions play a major role in neutralizing the effects of oxidative distress associated with a wide range of diseases (e.g., myocardial infarction, stroke, severe combined trauma). Lithium salts have distinct cytoprotective properties due to the ability to phosphorylate glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) causing its inactivation and preventing cell death as a result of ischemia-reperfusion [10–12]. Recent experimental studies have proven the real potential of lithium chloride to protect the brain, myocardium, and kidneys from ischemia-reperfusion [13–15]. In previous studies lithium salts were shown to prevent inflammatory damage to cells and tissues in the *in vivo* models of inflammation-associated diseases [16–18]. Lithium is known to suppress neuroinflammation developing after brain injury and prevent the blood-brain bar-

обусловленных ишемией/реперфузией. Основную роль ионам лития отводят в нейтрализации последствий окислительного дистресса, сопутствующего большому ряду заболеваний (например, инфаркт, инсульт, тяжелая сочетанная травма). Соли лития обладают выраженными цитопротективными свойствами благодаря способности фосфорилировать киназу 3-бета гликогенсинтетазы (GSK-3 β), что приводит к ее инактивации, и предотвращает гибель клеток в результате ишемии-реперфузии [10–12]. Недавние экспериментальные исследования доказали реальные возможности лития хлорида для защиты мозга, миокарда, почек от ишемии-реперфузии [13–15]. В предыдущих исследованиях было показано, что соли лития в моделях патологий, которые были связаны с воспалением *in vivo*, предотвращали воспалительные повреждения клеток и тканей [16–18]. Известно, что литий подавляет нейровоспаление, которое развивается после травмы головного мозга, предотвращает нарушение гематоэнцефалического барьера и нейродегенерацию [19]. Хроническое воспаление кишечника также эффективно подавлялось хлоридом лития [20].

На сегодняшний день молекулярные механизмы реализации противовоспалительных свойств солей лития остаются неизученными и вполне оправданным представляется предположение, что хлорид лития способен модулировать воспалительный ответ организма через фосфорилирование GSK-3 β в нейтрофилах.

Цель исследования — изучение противовоспалительного действия хлорида лития путем воздействия на нейтрофилы человека сыворотки пациентов с септическим шоком *in vitro*.

Материал и методы

Больных ($n=6$) с развившимся септическим шоком отобрали в соответствии с критериями «Сепсис-3» [21].

Больной 1: Ф., 59 лет, перфорация сигмовидной кишки, фибринозно-гнойный перитонит, септический шок, ОРДС. Больной 2: Г., 39 лет, внебольничная левосторонняя пневмония, септический шок. Больной 3: А., 59 лет, нозокомиальная двусторонняя пневмония, ОРДС, септический шок. Больной 4: В., 45 лет, дивертикулез толстой кишки, перфорация сигмовидной кишки, разлитой гнойный перитонит, септический шок. Больной 5: В., 54 года, тупая травма брюшной полости, разрыв тонкого кишечника, разлитой перитонит. Больной 6: Н., 41 года, проникающее ранение брюшной полости с повреждением тонкого и толстого кишечника, разлитой гнойный перитонит, септический шок.

В качестве контрольной группы использовали биоматериал, полученный от 6 практически здоровых доноров, средний возраст 35,6 [28,7; 45,0] лет. В каждой из групп было 3 мужчин и 3 женщины.

rier disruption and neurodegeneration [19]. Chronic bowel inflammation was also effectively suppressed by lithium chloride [20].

To date, the molecular mechanisms of anti-inflammatory action of lithium salts remain unexplored and it is quite reasonable to assume that lithium chloride can modulate the body inflammatory response through GSK-3 β phosphorylation in neutrophils.

The aim of the study was to investigate the anti-inflammatory effect of lithium chloride by exposing human neutrophils to the serum of patients with septic shock *in vitro*.

Materials and Methods

Patients ($n=6$) with septic shock were selected according to «Sepsis-3» criteria [21].

Patient 1: F., 59 years old, perforation of the sigmoid colon, fibrinopurulent peritonitis, septic shock, ARDS. Patient 2: G., 39 years old, community acquired left-sided pneumonia, septic shock. Patient 3: A., 59 years old, nosocomial bilateral pneumonia, ARDS, septic shock. Patient 4: E., 45 years old, colonic diverticulosis, sigmoid perforation, generalized purulent peritonitis, septic shock. Patient 5: V., 54 years old, blunt abdominal trauma, rupture of the small intestine, generalized peritonitis. Patient 6: N., 41 years old, penetrating abdominal wound with damage to small and large intestine, generalized purulent peritonitis, septic shock.

The material obtained from 6 apparently healthy donors with an average age of 35.6 [28.7; 45.0] years was used as the control. Each group included 3 men and 3 women.

Heparinized venous blood mixed with T-500 dextran solution (Pharmacosmos, Denmark) to achieve the 1% final concentration of dextran and left at room temperature for 30 minutes for erythrocyte sedimentation was used for neutrophil isolation. The upper plasma layer (enriched with white blood cells and devoid of red blood cells) was placed onto ficoll (PanEco, Russia) with the density of 1.077 g/ml and centrifuged at room temperature at 300g for 30 minutes in a centrifuge with the brake off. Then the supernatant was removed and all further procedures were carried out on ice and using cooled solutions. The erythrocytes were removed by resuspending the sediment in 2 ml of deionized sterile water for 45 seconds, then 2 ml of 2-fold PBS were added to restore tonicity and centrifuged at 200g, 4°C for 10 minutes. Precipitated neutrophils were washed with PBS and resuspended in a culture medium (RPMI-1640 by PanEco, Russia, 10% FBS with low endotoxin content).

Activation (degranulation) of neutrophils was assessed by increasing CD11b, CD66b molecules (membrane components of secondary, or specific granules, and tertiary, or gelatinase granules) on the cell surface after their incubation with serum of 6 patients with septic shock used as an inflammatory inductor. Measurements were made with antibodies conjugated with fluorescent dyes, CD11b-FITC and CD66b-AlexaFluor647 (BD Biosciences, USA) according to the manufacturer's protocol.

In order to evaluate the effect of lithium salt on neutrophil degradation, the patient serum and lithium chloride in concentrations of 0.3, 3.0 and 9.0 mmol/l

Для выделения нейтрофилов использовали гепаринизированную венозную кровь, которую смешивали с раствором декстрана Т-500 (Pharmacosmos, Дания) до конечной концентрации декстрана 1% и оставляли при комнатной температуре на 30 минут для осаждения эритроцитов. Верхний слой плазмы (обогащенный лейкоцитами и лишенный эритроцитов) наслаивали на фиколл (ПанЭко, Россия) с плотностью 1,077 г/мл и центрифугировали при комнатной температуре при 300g, 30 минут в центрифуге с отключенным тормозом. Затем удаляли супернатант и все дальнейшие процедуры проводили на льду и с использованием охлажденных растворов. Удаление эритроцитов проводили с помощью ресуспендирования осадка в 2 мл деионизированной стерильной воды в течение 45 сек, а затем добавляли 2 мл 2-х кратного PBS для восстановления тоничности и центрифугировали при 200g, 4°C, на протяжении 10 минут. Осажденные нейтрофилы промывали PBS и ресуспендировали в культуральной среде (RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), 10% FBS с низким содержанием эндотоксинов).

Активацию (дегрануляцию) нейтрофилов оценивали по увеличению на поверхности клеток молекул CD11b, CD66b (компоненты мембран специфических, желатиназных и четвертичных гранул) после их инкубации с сывороткой 6 пациентов с септическим шоком, использованной в качестве индуктора воспаления. Измерения проводили с помощью антител, конъюгированных с флуоресцентными красителями (CD11b-FITC и CD66b-AlexaFluor647 (BD Biosciences, USA)) согласно протоколу производителя.

С целью определения влияния соли лития на дегрануляцию нейтрофилов к концентрату клеток 4 млн/мл от здоровых доноров добавляли сыворотку пациентов и хлорид лития в концентрации 0,3, 3,0 и 9,0 ммоль/л и инкубировали 30 мин при 37°C. Затем добавляли антитела и инкубировали 30 минут во льду, после чего измеряли уровень флуоресценции в условных единицах (у. е. ф.) на проточном цитофлуориметре Beckman-Coulter FC 500.

Апоптоз нейтрофилов. С целью определения апоптоза нейтрофилов от здоровых доноров их инкубировали с сыворотками пациентов с септическим шоком в течение 22 часов при 37°C в увлажненном CO₂-инкубаторе. Затем клетки центрифугировали при 400 g в течение 5 минут и ресуспендировали осадок в 70 мкл буфера (10 mM HEPES, 120 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, pH = 7,4). К каждой пробе добавляли 2,5 мкл аннексина V, конъюгированного с флуоресцентным красителем FITC (ThermoFisher, США) и оставляли на 25 минут при 37°C. Далее добавляли иодид пропидия до конечной концентрации 5 мкг/мл, инкубировали еще 5 минут, после чего анализировали не менее 50 тысяч клеток с помощью проточного цитофлуориметра Beckman Coulter CytoFLEX. Апоптотическими считали аннексин V-положительные и пропидий иодид-отрицательные клетки.

Иммуноблоттинг. Электрофорез белков проводили в 12,5% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Образцы растворяли в буфере, содержащем 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8), 4% додецилсульфата натрия (Sigma Chemical Co., США), 20% глицерина, 0,005% бромфенола синего (Sigma Chemical Co., США) и 10% 2β-меркаптоэтанола (Merck, Герма-

were added to the 4 million/ml cell concentrate from healthy donors and incubated for 30 minutes at 37°C. Then antibodies were added and incubated for 30 minutes in ice, after which the fluorescence level was measured in arbitrary fluorescence units (AFU) on the Beckman-Coulter FC 500 flow cytometer.

Apoptosis of neutrophils. In order to determine apoptosis of neutrophils from healthy donors, the cells were incubated with sera of patients with septic shock for 22 hours at 37°C in a humidified CO₂ incubator. The cells were then centrifuged at 400 g for 5 minutes and the sediment was resuspended in the 70 μl buffer (10 mM HEPES, 120 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH=7.4). 2.5 μl of annexin V conjugated with FITC fluorescent dye (ThermoFisher, USA) was added to each sample and left for 25 minutes at 37°C. Then propidium iodide was added to the final concentration of 5 μg/ml, incubated for another 5 minutes, and then at least 50 thousand cells were analyzed with a flow cytometer Beckman Coulter CytoFLEX. Cells which were annexin V positive and propidium iodide negative were considered apoptotic.

Immunoblotting. Protein electrophoresis was performed in 12.5% polyacrylamide gel under denaturing conditions. The samples were dissolved in a buffer containing 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 4% sodium dodecyl sulphate (Sigma Chemical Co., USA), 20% glycerin, 0.005% bromophenol blue (Sigma Chemical Co., USA) and 10% 2β-mercaptoethanol (Merck, Germany). The samples were heated for 2 minutes in a water bath and introduced into gel wells. For preparation of the separating gel, a 30% mixture of acrylamide (Sigma Chemical Co., USA) and bis-acrylamide (Sigma Chemical Co., USA) (37.5:1) was used, which was diluted to 12.5% by 1.5 M Tris-HCl buffer (pH=8.8) and water to the final Tris-HCl concentration of 375 mmol. Sodium dodecyl sulphate 0.1%, ammonium persulfate (Sigma Chemical Co., USA) 0.1% and TEMED (tetramethylethylenediamine, Acros, Belgium) 0.1% were also added to the mixture. For preparation of the concentrating gel, 30% mixture of acrylamide and bis-acrylamide was diluted to 5% 1 M Tris-HCl buffer (pH=6.8) and water to the final Tris-HCl concentration of 125 mmol. 0.1% sodium dodecyl sulphate, 0.1% ammonium persulphate and 0.1% TEMED were also added to the mixture. Gels 8x10 cm with 1 mm thick spacers was used. For electrophoresis we used Tris-glycine electrode buffer containing 25 mmol Tris-HCl, 192 mmol glycine, 0.1% sodium dodecyl sulphate, pH=8.3. Electrophoresis was carried out at direct current of 10 mA in concentration mode and 15 mA in separation mode. At the end of electrophoresis, proteins were transferred to PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech, United Kingdom). The transfer was carried out by the semi-dry method for 2 hours at 200 mA, 20 V. Transfer quality was estimated by dyeing of a part of gel and membrane with 2% Ponceau solution (Sigma Chemical Co., USA). The membranes were blocked for 12 hours at +40°C in a tris-buffer medium (Sigma Chemical Co., USA) containing 5% skimmed milk powder. Then the membranes were washed with tris-buffer medium 3 times for 10 minutes and incubated for 2 hours at room temperature with primary antibodies (against GSK-3β or phosphorylated GSK-3β) in 1:1000 dilution in tris-buffer medium containing 0.5% of bovine serum albumin («Calbiochem») and 0.01% of Tween-20 («Sigma Chemical Co.»). The membranes were washed three times dur-

ния). Образцы кипятили 2 мин на водяной бане и вносили в лунки для геля. Для приготовления раздвояющего геля использовали 30% смесь акриламида (Sigma Chemical Co., США) и бис-акриламида (Sigma Chemical Co., США) (37,5:1), которую разводили до 12,5% 1,5 М Трис-НСI буфером (pH=8,8) и водой до конечной концентрации Трис-НСI 375 мМ. В смесь также добавляли додецилсульфат натрия до 0,1%, персульфат аммония (Sigma Chemical Co., США) до 0,1% и ТЕМЕД (тетраметилэтилендиамин, Acros, Бельгия) до 0,1%. Для приготовления концентрирующего геля 30% смесь акриламида и бис-акриламида разводили до 5% 1 М Трис-НСI буфером (pH = 6,8) и водой до конечной концентрации Трис-НСI 125 мМ. В смесь также добавляли 0,1% додецилсульфата натрия, 0,1% персульфат аммония и 0,1% ТЕМЕД. В работе использовали стекла 8×10 см со спейсерами толщиной 1 мм. Для проведения электрофореза использовали Трис-глициновый электродный буфер, содержащий 25 мМ Трис-НСI, 192 мМ глицин, 0,1% додецилсульфата натрия, pH = 8,3. Электрофорез проводили при постоянном токе 10 мА в режиме концентрирования и 15 мА в режиме разделения. По окончании электрофореза переносили белки на PVDF мембрану (Amersham Pharmacia Biotech, Объединенные Королевства). Перенос проводили полусухим методом в течение 2 часов при 200 мА, 20 V. Качество переноса оценивали окрашиванием части геля и окрашиванием мембраны 2% раствором Ронсеау (Sigma Chemical Co., США). Мембраны блокировали 12 часов при +4°C в трис-буферной среде (Sigma Chemical Co., США), содержащей 5% обезжиренного сухого молока. Затем мембраны промывали трис-буферной средой 3 раза по 10 минут и инкубировали 2 часа при комнатной температуре с первичными антителами (против GSK-3β или фосфорилированной формы GSK-3β) в разведении 1:1000 в трис-буферной среде, содержащем 0,5% бычьего сывороточного альбумина («Calbiochem») и 0,01% Tween-20 («Sigma Chemical Co.»). Мембраны три раза по 15 минут промывали в TBS, содержащем 0,01% Tween-20 и инкубировали 1 час с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в разведении 1:10000 в трис-буферной среде, содержащем 0,01% Tween-20. После финальной отмывки от несвязанных антител, полосы детектировали с помощью хемилуминесцентного субстрата пероксидазы хрена ECL (Enhanced chemiluminescence system, Amersham Pharmacia Biotech, Бельгия). Хемилуминесценцию детектировали на фотопленку Kodak Professional T-MAX P3200 TMZ 135-36 (Kodak, США). Изображение оцифровывали на сканере Epson Perfection V750 Pro (Seiko Epson Corp., Япония) и анализировали с помощью программы ImageJ.

Содержание фосфорилированной формы GSK-3β выражали в условных единицах хемилуминесценции (у. е. л.).

Для статистического анализа использовали программы Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.) и MedCalc 12.5.0.0 (MedCalc Software bvba). Средние значения представили медианой с межквартильным интервалом. Межгрупповые различия показателей оценивали при помощи *U*-критерия Уитни-Манна и принимали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

ing 15 minutes in a TBS containing 0.01% Tween-20, and incubated for 1 hour with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase in a 1:10000 dilution in a tris-buffer medium containing 0.01% Tween-20. After the final washing of unbound antibodies, the signal bands were detected with horseradish peroxidase chemiluminescence substrate ECL (Enhanced chemiluminescence system, Ensham Pharmacia Biotech, Belgium). Chemiluminescence was registered on Kodak Professional T-MAX P3200 TMZ 135-36 film (Kodak, USA). The image was digitized on an Epson Perfection V750 Pro scanner (Seiko Epson Corp., Japan) and analyzed using the ImageJ software.

The level of phosphorylated GSK-3β was expressed in arbitrary luminescence units (ALU).

Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.) and MedCalc 12.5.0.0 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium) software were used for statistical analysis. The mean values were represented by the median with the interquartile interval. Intergroup differences were estimated using the Whitney Mann *U*-criterion and considered significant at $P < 0.05$.

Results and Discussion

The effect of sera of patients with septic shock on the CD11b and CD 66b expression on the neutrophil surface. Neutrophil activation is one of the phases of inflammation where morphological and physiological changes (flattening, degranulation, migration, cytokine secretion, oxidative explosion, etc.) are observed due to external signals. The CD11b and CD66b molecules located in the intracellular granules of neutrophils are sensitive markers of activation and degranulation.

As shown in Table 1, the CD11b expression on the surface of intact neutrophils (healthy donors) was 3434.50 [3311.0–3799.0] AFU. Incubation of neutrophils with serum of patients with septic shock increased the number of CD11b molecules on the neutrophil surface by 2.5 times up to the value of 8589.0 [7279.0–11258.0] AFU ($P=0.005$).

Addition of 9 mmol lithium chloride to intact neutrophils did not reduce the expression of CD11b molecules vs. control, it was 2703.9 [2514.0–3578.0] AFU ($P>0.05$). Incubation of neutrophils with serum of patients with septic shock and 0.3 mmol lithium chloride did not affect the increased level CD11b on the neutrophil surface (after septic serum exposure) — 7998.0 [7527.0–10115.0] AFU ($P>0.05$), while the addition of 3.0 mmol lithium chloride virtually brought the expression back to the control value ($P>0.05$), and the addition of 9.0 mmol lithium chloride significantly reduced (by 40%) the expression of CD11b molecules on the neutrophil surface vs the control ($P=0.04$).

As seen from Table 2, the CD 66b expression on the surface of intact neutrophils was 10125.0 [9887.0–10575.0] AFU. Incubation of neutrophils with serum of patients with septic shock increased the expression of the above-mentioned molecules by 2.7 times up to the value of

Таблица 1. Значения экспрессии CD11b на поверхности нейтрофилов при воздействии сыворотки пациентов с септическим шоком и раствора лития хлорида (0,3 мМ; 3 мМ; 9 мМ), Me [LQ–HQ].**Table 1. CD11b expression on the surface of neutrophils after exposure to the sera of patients with septic shock lithium chloride solution (0.3 mmol; 3.0 mmol; 9.0 mmol), Me [LQ–HQ].**

| Neutrophils | CD11b expression, AFU | P value vs control |
|-----------------------|-----------------------------|--------------------|
| Intact (control) | 3434.5 [3311.0–3799.0] | |
| + SS | 8589.0 [7279.0–11258.0] | 0.005 |
| + LiCl, 9 mmol | 2703.9 [2514.0–3878.0] | >0.05 |
| + SS + LiCl, 0.3 mmol | 7998.0 [7527.0–10115.0] | 0.004 |
| + SS + LiCl, 3.0 mmol | 3571.5 [3299.0–3894.0] | >0.05 |
| + SS + LiCl, 9.0 mmol | 2068.5 [1951.0–2394.0] ???? | 0.04 |

Note. For tables 1–4: intact neutrophils — neutrophils obtained from apparently healthy donors (control); SS — septic serum (serum of patients with septic shock); + — added to the control.

Примечание. Для табл. 1–4: intact — интактные нейтрофилы, полученные от практически здоровых доноров (контроль); SS — септическая сыворотка (сыворотка крови пациентов с септическим шоком); + — добавление к контролю; AFU — у. е. ф.

Результаты и обсуждение

Влияние сывороток пациентов с септическим шоком на уровень экспрессии CD11b и CD 66b на поверхности нейтрофилов. Активация нейтрофилов – одна из стадий развития воспаления, при которой под действием внешних сигналов у нейтрофилов наблюдаются морфологические и физиологические изменения (уплощение, дегрануляция, миграция, секреция цитокинов, окислительный взрыв и другие). Чувствительными маркерами активации и дегрануляции являются молекулы CD11b и CD66b, которые находятся во внутриклеточных гранулах нейтрофилов.

Как видно из табл. 1, показатель экспрессии CD11b на поверхности интактных нейтрофилов (здоровые доноры) составил 3434,50 [3311,0–3799,0] у. е. ф. Инкубация нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с септическим шоком повышала количество молекул CD11b на поверхности нейтрофилов в 2,5 раза до значения показателя экспрессии — 8589,0 [7279,0–11258,0] у. е. ф. ($p=0,005$).

Добавление к интактным нейтрофилам хлорида лития в концентрации 9 ммоль, не уменьшало экспрессию молекул CD11b по отношению к контролю — 2 703,9 [2514,0–3578,0] у. е. ф. ($p>0,05$). Инкубация нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с септическим шоком и хлоридом лития в концентрации 0,3 ммоль не влияла на повышенное септической сывороткой содержание CD11b на их поверхности — 7998,0 [7527,0–10115,0] у. е. ф. ($p>0,05$), в то время как добавление хлорида лития в концентрации 3,0 ммоль практически возвращало показатель экспрессии к контрольному значению ($p>0,05$), а добавление хлорида лития в концентрации 9 ммоль значительно уменьшало (на 40%) экспрессию молекул CD11b на поверхности нейтрофилов по отношению к контролю ($p=0,04$).

Как видно из табл. 2, показатель экспрессии CD 66b на поверхности интактных нейтрофилов составил 10125,0 [9887,0–10575,0] у. е. ф. Инкуба-

27688.0 [22999.0–28989.0] AFU ($P=0.005$) vs. the intact leukocytes.

Addition of 9 mmol lithium chloride to intact neutrophils significantly reduced the expression of CD66b molecules vs the control down to 7050.0 [6888.0–8 545.0] AFU ($P=0.047$).

Incubation of neutrophils with serum of patients with septic shock and 0.3 mmol lithium chloride did not affect the increased level of CD66b on the neutrophil surface (after the serum exposure), which was 21565.0 [20897.0–26933.0] AFU ($P=0.009$), while the addition of 3.0 mmol lithium chloride restored their expression to the value similar to the controls at 11712.0 [10587.0–11985.0] AFU ($P>0.05$), and the addition of 9 mM lithium chloride did not reduce the CD11b expression on neutrophil surface vs the control group reaching 8750.0 [6835.0–9745.0] AFU ($P>0.05$).

The effect of sera of patients with septic shock on apoptosis and necrosis of human neutrophils 22 hours after extraction. The study results showed that the proportion of human neutrophils with signs of apoptosis and necrosis 22 hours after excretion is 57.1 [55.8–57.9] % (Table 3, control).

Incubation of neutrophils with serum of patients with septic shock reduces by 2.6 times the number of spontaneously apoptotic neutrophils down to 21.95 [19.50–23.90] % ($P=0.004$) (Table 3, + SS). Addition of 9.0 mmol lithium chloride to intact neutrophils significantly reduced the number of neutrophils with preserved ability to spontaneous apoptosis — down to 39.75 [38.50–42.70] % ($P=0.002$) (by 30%).

Addition of 0.3 mmol lithium chloride to the incubation medium of neutrophils with sera of patients with septic shock did not affect the number of spontaneously apoptotic neutrophils which was 26.0 [21.5–27.2] % ($P=0.7$).

Notably, the addition of 3.0 lithium chloride to the incubation medium of neutrophils with serum of patients with septic shock significantly increased the number of spontaneously apoptotic neutrophils by 1.8 times to as much as 39.5 [37.7–40.0] % ($P=0.03$). The increase of lithium chloride con-

Таблица 2. Значение экспрессии CD66b на поверхности нейтрофилов при воздействии сыворотки пациентов с септическим шоком и раствора лития хлорида (0,3мМ; 3мМ; 9 мМ), Me [LQ–HQ].

Table 2. CD66b expression on the surface of neutrophils after exposure to the sera of patients with septic shock and lithium chloride solution (0.3 mmol; 3.0 mmol; 9.0 mmol), Me [LQ–HQ].

| Neutrophils | CD66b expression, AFU | P value vs control |
|-----------------------|---------------------------|--------------------|
| Intact (control) | 10125.0 [9887.0–10575.0] | |
| + SS | 27688.0 [22999.0–28989.0] | 0.005 |
| + LiCl, 9.0 mmol | 7050.0 [6888.0–8545.0] | 0.047 |
| + SS + LiCl, 0.3 mmol | 21565.0 [20897.0–26933.0] | 0.009 |
| + SS + LiCl, 3.0 mmol | 11712.0 [10587.0–11985.0] | >0.05 |
| + SS + LiCl, 9.0 mmol | 8150.0 [6835.0–9745.0] | >0.05 |

Таблица 3. Показатель апоптоза и некроза аннексин-положительных (an+) нейтрофилов при инкубации с сыворотками пациентов с септическим шоком и раствором лития хлорида (0,3мМ; 3мМ; 9 мМ), Me [LQ–HQ].

Table 3. Percentage of apoptosis and necrosis of annexin-positive (an+) neutrophils after incubation with the sera of patients with septic shock and lithium chloride solution (0.3 mmol; 3.0 mmol; 9.0 mmol), Me [LQ–HQ].

| Neutrophils | Percentage of apoptotic and necrotic cells, % | P value | |
|-----------------------|---|------------|---------|
| | | vs control | vs + SS |
| Intact (control) | 57.1 [55.8–57.9] | | |
| + SS | 21.95 [19.50–23.90] | 0.004 | |
| + LiCl, 9.0 mmol | 39.75 [38.50–42.70] | 0.002 | |
| + SS + LiCl, 0.3 mmol | 26.0 [21.5–27.2] | 0.002 | 0.7 |
| + SS + LiCl, 3.0 mmol | 39.5 [37.7–40.0] | 0.004 | 0.03 |
| + SS + LiCl, 9.0 mmol | 40.2 [38.8–41.1] | 0.002 | 0.007 |

Примечание. Percentage of apoptotic and necrotic cells — доля клеток с признаками апоптоза и некроза.

ция нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с септическим шоком увеличивала экспрессию тех же молекул в 2,7 раза, до значения 27688,0 [22999,0–28989,0] у. е. ф. ($p=0,005$), в сравнении с показателем интактных лейкоцитов.

Добавление хлорида лития в концентрации 9 ммоль к интактным нейтрофилам значительно уменьшало экспрессию молекул CD 66b по отношению к контролю — 7 050,0 [6 888,0–8 545,0] у. е. ф. ($p=0,047$).

Инкубация нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с септическим шоком и хлоридом лития в концентрации 0,3 ммоль не влияла на повышенное септической сывороткой содержание CD 66b на их поверхности 21565,0 [20897,0–26933,0] у. е. ф. ($p=0,009$), в то время как добавление хлорида лития в концентрации 3,0 ммоль возвращало значение их экспрессии к показателю, не отличающемуся от контрольного значения — 11712,0 [10587,0–11985,0] у. е. ф. ($p>0,05$), а добавление хлорида лития в концентрации 9 мМ не уменьшало показатель экспрессии CD11b на поверхности нейтрофилов по отношению к контролю — 8750,0 [6835,0–9745,0] у. е. ф. ($p>0,05$).

Влияние сывороток пациентов с септическим шоком на показатель апоптоза и некроза нейтрофилов человека через 22 часа после выделения. Результаты исследования показали, что доля нейтрофилов человека с признаками апоптоза и некроза через 22 часа после выделения составляет 57,1 [55,8–57,9] % (табл. 3, контроль);

Инкубация нейтрофилов с сывороткой пациентов с септическим шоком в 2,6 раза уменьшает количество нейтрофилов, которые подверглись спонтанному апоптозу – до значения

concentration up to 9 mmol similarly increased the number of neutrophils capable of spontaneous apoptosis to 40.2 [38.8–41.1] % ($P=0.007$).

In line with present-day ideas, neutrophils are rather short-lived leukocytes: after leaving bone marrow the average lifetime of neutrophils is 4–5 days [22]. During this time, neutrophils leave the bone marrow, mature and age. Under normal physiological conditions, the aging of neutrophils is accompanied by increased expression of CXCR4 chemokine receptor, which leads to neutrophils' migration to bone marrow, liver and other organs where they undergo apoptosis and are phagocytized by macrophages. Apoptosis is an extremely important and sophisticated stage in the neutrophil life cycle, because accelerated massive neutrophil death leads to neutropenia and increased susceptibility to infections, while overly long lifespan, on the contrary, may cause chronic inflammation [23].

The results show that septic serum drastically reduces the ability of neutrophils to «escape» from the inflammation site by apoptosis and thus contributes to «nonresolving inflammation», whereas the addition of lithium chloride in a concentration of 3 mmol and above can induce spontaneous neutrophil apoptosis. At the same time, the 9.0 mmol lithium chloride added to intact neutrophils reduces the number of neutrophils capable of spontaneous apoptosis, which from the whole body perspective can be promising for the treatment of neutropenia, as it has been shown in a clinical study [24].

The effect of sera of patients with septic shock on GSK-3β phosphorylation in neutrophils and the impact of lithium chloride. This study also examined the effect of sera of patients with septic shock on the

21,95 [19,50–23,90] % ($p=0,004$) (табл. 3, + СС). Добавление хлорида лития в концентрации 9 ммоль к интактным нейтрофилам значительно уменьшало количество нейтрофилов, сохранивших способность к спонтанному апоптозу – до значения 39,75 [38,50–42,70] % ($p=0,002$) (на 30%).

Добавление хлорида лития в концентрации 0,3 ммоль в среду инкубации нейтрофилов с сыворотками крови пациентов с септическим шоком не влияло на количество нейтрофилов, которые подверглись спонтанному апоптозу – 26,0 [21,5–27,2] % ($p=0,7$).

Важно отметить, что добавление хлорида лития в концентрации 3 ммоль, в среду инкубации нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с септическим шоком, значительно, в 1,8 раза — 39,5 [37,7–40,0] % ($p=0,03$), увеличивало количество нейтрофилов, подвергшихся спонтанному апоптозу. Увеличение концентрации хлорида лития до 9 ммоль сопоставимо увеличивало количество нейтрофилов, сохранивших способность к спонтанному апоптозу — 40,2 [38,8–41,1] % ($p=0,007$).

Согласно современным представлениям, нейтрофилы — это достаточно короткоживущие лейкоциты: после выхода из костного мозга среднее время жизни нейтрофилов составляет 4–5 дней [22]. В течение этого времени нейтрофилы выходят из костного мозга, созревают и стареют. При нормальных физиологических условиях старение нейтрофилов сопровождается увеличением экспрессии рецептора хемокинов CXCR4, что приводит к миграции нейтрофилов в костный мозг, печень и другие органы, где они подвергаются апоптозу и фагоцитируются макрофагами. Апоптоз — крайне важный и сложно регулируемый этап в жизненном цикле нейтрофилов, поскольку слишком быстрая и массовая смерть нейтрофилов приводит к нейтропении и подверженности организма инфекциям, а излишне долгая жизнь, наоборот, может вызвать хроническое воспаление [23].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что септическая сыворотка резко снижает возможности нейтрофилов «уйти» из очага воспаления путем апоптоза и таким образом способствует формированию «неразрешаемого воспаления», а добавление хлорида лития в концентрации 3 ммоль и выше способно индуцировать спонтанный апоптоз нейтрофилов. В тоже время, хлорид лития, добавленный к интактным нейтрофилам в концентрации 9 ммоль, приводит к уменьшению количества нейтрофилов, способных к спонтанному апоптозу, что в условиях целостного организма может быть перспективно в плане терапии нейтропении, как было отмечено в клиническом исследовании [24].

phosphorylation of GSK-3 beta, a key enzyme protecting cell from ischemia reperfusion, a cascade that is rapidly activated in response to pro-inflammatory signals. The content of phosphorylated GSK-3 beta in intact neutrophils was 899557 [821555–931223] ALU (Table 4). Incubation of neutrophils with serum of patients with septic shock for 10–15 minutes resulted in dephosphorylation (activation) of the enzyme, leading to a 2-fold reduction of the phosphorylated GSK-3 beta ($P<0.05$) to the value of 412743 [400532–445331] ALU (Table 4), without affecting the enzyme activity in neutrophils. Addition of 9.0 mmol lithium chloride to intact neutrophils significantly increased the level of GSK-3 beta up to the value of 2407799 [2201343–2938373] ALU ($P=0.002$) (by 270%). Addition of 0.3 mmol lithium chloride to the incubation medium of neutrophils with serum of patients with septic shock did not significantly affect the level of GSK-3 beta in neutrophils, which was 478755 [400532–445331] ALU ($P=0.002$), while the addition of 3.0 mmol lithium chloride increased the level of phospho-GC-3 beta in neutrophils virtually to the control values reaching 858454 [810535–955723] ($P=0.006$) ALU. Increase of lithium chloride concentration up to 9 mmol further (practically 2 times higher than in the control) increased the level of phosphorylated GSK-3 beta in neutrophils up to 1759454 [1519555–1911121] ($P=0.004$) ALU.

Conclusion

The experimental results confirmed the effect of lithium chloride on GSK-3 beta phosphorylation in neutrophils which suggests that lithium chloride is able to modulate the inflammatory activation of neutrophils on exposure to serum of patients with septic shock due to GSK-3 beta phosphorylation in neutrophils.

This study demonstrated that one of the possible anti-inflammatory mechanisms of lithium chloride could be phosphorylation of GSK-3 beta in neutrophils, which in turn leads to reduced expression of CD11b and CD66b degranulation markers on neutrophil surface. The lithium chloride solution was found to increase the capability of neutrophils to spontaneous apoptosis and probably could contribute to the resolution of inflammation. The results of this study open the prospects for the use of lithium chloride to treat «excess» inflammation in bacterial sepsis, but these encouraging data require confirmation on *in vivo* models, which may allow initiating a clinical trial to study the presumed organoprotective and anti-inflammatory properties of lithium chloride.

Действие сывороток пациентов с септическим шоком на показатель фосфорилирования GSK-3β в нейтрофилах и влияния на него хлорида лития. В настоящем исследова-

Таблица 4. Денситометрический анализ Вестерн-блотов на содержание в нейтрофилах киназы фосфо-ГСК-3 бета при воздействии сыворотки пациентов с септическим шоком, Me [LQ-HQ].**Table 4. Western blot densitometry analysis for the neutrophil phospho-GSK-3 beta after exposure to sera of patients with septic shock, Me [LQ-HQ].**

| Neutrophils | Phosphorylated GSK-3 β , ALU | % | P value vs +SS |
|-----------------------|------------------------------------|-----|----------------|
| Intact (control) | 899557 [821555–931223] | 100 | |
| + SS | 412743* [400532–445331] | 51 | |
| + LiCl, 9.0 mmol | 2407799* [2201343–2938373] | 270 | |
| + SS + LiCl, 0.3 mmol | 428755* [400532–445331] | 53 | 0.8 |
| + SS + LiCl, 3.0 mmol | 858454 [810535–955723] | 95 | 0.006 |
| + SS + LiCl, 9.0 mmol | 1759454* [1519555–1911121] | 195 | 0.004 |

Note.* — $P < 0.05$ vs the control.Примечание. ALU — у. е. л.; * — $p < 0,05$ относительно контроля.

нии также изучили влияние сывороток пациентов с септическим шоком на фосфорилирование ГСК-3 бета, — ключевого фермента защиты клетки от ишемии-реперфузии — каскада, который быстро активируется в ответ на провоспалительные сигналы. Содержание фосфо-ГСК-3 бета в интактных нейтрофилах составило 899557 [821555–931223] у. е. л. (табл. 4) Инкубация нейтрофилов с сывороткой пациентов с септическим шоком в течение 10–15 минут приводила к дефосфорилированию (активации) фермента, снижая содержание фосфорилированной формы ГСК-3 бета в 2 раза ($p < 0,05$) — до значения 412743 [400532–445331] у. е. л. (табл. 4), не оказывая влияния на содержание самого фермента в нейтрофилах. Добавление хлорида лития в концентрации 9 ммоль к интактным нейтрофилам значимо увеличивало в них содержание фосфо-ГСК-3 бета — до значения 2407799 [2201343–2938373] у. е. л. ($p = 0,002$) (на 270%). Добавление хлорида лития в концентрации 0,3 ммоль в среду инкубации нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с септическим шоком значимо не влияло на содержание фосфо-ГСК-3 бета в нейтрофилах — 428755 [400532–445331] у. е. л., в то время как добавление хлорида лития в концентрации 3 ммоль увеличивало содержание фосфо-ГСК-3 бета в нейтрофилах практически до значения в контроле — 858454 [810535–955723] ($p = 0,006$) у. е. л. Увеличение концентрации хлорида лития до 9 мМ еще более, практически в 2 раза от показателя в контроле, увеличивало содер-

жание фосфо-ГСК-3 бета в нейтрофилах до 1759454 [1519555–1911121] ($p = 0,004$) у. е. л.

Заключение

Полученные экспериментальные результаты подтвердили влияние хлорида лития на фосфорилирование ГСК-3 бета в нейтрофилах, и в этой связи представляется логичным предположить, что хлорид лития способен модулировать воспалительную активацию нейтрофилов под действием сыворотки пациентов с септическим шоком, благодаря фосфорилированию ГСК-3 бета в нейтрофилах.

Данное исследование продемонстрировало, что один из возможных путей реализации противовоспалительных свойств хлорида лития может осуществляться через фосфорилирование ГСК-3 бета в нейтрофилах, что, в свою очередь, приводит к снижению экспрессии на поверхности нейтрофилов маркеров дегрануляции CD11b и CD66b. При этом важно отметить, что раствор лития хлорида увеличивает способность нейтрофилов к спонтанному апоптозу и, вероятно, будет способствовать разрешению воспаления. Результаты проведенного исследования открывают перспективы применения хлорида лития для лечения «избыточного» воспаления при бактериальном сепсисе, однако эти обнадеживающие данные требуют подтверждения в моделях *in vivo*, что, возможно, позволит инициировать клиническое испытание хлорида лития для изучения его предполагаемых органопротекторных и противовоспалительных свойств.

Литература

1. Balk R.A. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): Where did it come from and is it still relevant today? *Virulence*. 2014; 5 (1): 20–26. DOI: 10.4161/viru.27135. PMID: 24280933.
2. Qin L., Wu X., Block M.L., Liu Y., Breese G.R., Hong J.-S., Knapp D.J., Crews F.T. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007; 55: 453–462. DOI: 10.1002/glia.20467. PMID: 17203472.
3. Alexander J.J., Jacob A., Cunningham P., Hensley L., Quigg R.J. TNF is a key mediator of septic encephalopathy acting through its receptor, TNF receptor-1. *Neurochem Int*. 2008; 52: 447–456. DOI: 10.1016/j.neuint.2007.08.00.
4. Jaffer U., Wade R.G., Gourlay T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. *HSR Proc. Intensive Care Cardiovasc. Anesth*. 2010; 2 (3): 161–175. PMID: 23441054.

References

1. Balk R.A. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): Where did it come from and is it still relevant today? *Virulence*. 2014; 5 (1): 20–26. DOI: 10.4161/viru.27135. PMID: 24280933.
2. Qin L., Wu X., Block M.L., Liu Y., Breese G.R., Hong J.-S., Knapp D.J., Crews F.T. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007; 55: 453–462. DOI: 10.1002/glia.20467. PMID: 17203472.
3. Alexander J.J., Jacob A., Cunningham P., Hensley L., Quigg R.J. TNF is a key mediator of septic encephalopathy acting through its receptor, TNF receptor-1. *Neurochem Int*. 2008; 52: 447–456. DOI: 10.1016/j.neuint.2007.08.00.
4. Jaffer U., Wade R.G., Gourlay T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. *HSR Proc. Intensive Care Cardiovasc. Anesth*. 2010; 2 (3): 161–75. PMID: 23441054.

5. Parkos A., Colgan P., Madara J.L. Interaction of Neutrophils With Epithelial Cells: Lessons From the Intestine. *J Am Soc Nephrol.* 1994; 5 (2): 138–152. PMID: 7993993.
6. Schmidt T., Zündorf J., Grüger T., Brandenburg K., Reiners A.L., Zinserling J., Schnitzler N. CD66b overexpression and homotypic aggregation of human peripheral blood neutrophils after activation by a gram-positive stimulus. *J Leukoc. Biol.* 2012; 91 (5): 791–802. DOI: 10.1189/jlb.0911483. PMID: 22319104.
7. Lilius E.M., Nuutila J. Bacterial infections, DNA virus infections, and RNA virus infections manifest differently in neutrophil receptor expression. *Scientific World J.* 2012; 527347. DOI: 10.1100/2012/527347. PMID: 22536142.
8. Muller Kobold A., Tulleken J.E., Zijlstra J.G., Sluiter W., Hermans J. Leukocyte activation in sepsis; Correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med.* 2000 Jul; 26 (7): 883–892. DOI: 10.1007/s001340051277. PMID: 10990102.
9. Boomer J.S., Green J.M., Hotchkiss R.S. The changing immune system in sepsis. *Virulence.* 2014; 5 (1): 45–56. DOI: 10.4161/viru.26516. PMID: 24067565.
10. Klein P.S., Melton D.A. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl.Acad. Sci.* 1996; 93 (16): 8455–8459. DOI: 10.1073/pnas.93.16.8455. PMID: 8710892.
11. Stambolic V., Ruel L., Woodgett J.R. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr. Biol.* 1996 Dec 1; 6 (12): 1664–1668. DOI: 10.1016/s0960-9822(02)70790-2. PMID: 8994831.
12. Zorov D.B., Kim S.H., Pepe S., Fu Q., Fishbein K.W., Ziman B.D., Wang S., Ytrehus K., Antos C.L., Olson E.N., Sollott S.J. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J. Clin. Invest.* 2004; 113 (11): 1535–1549. DOI: 10.1172/JCI19906. PMID: 15173880
13. Васильева А.К., Плотников Е.Ю., Казаченко А.В., Кирпатовский В.И., Зоров Д.Б. Ингибирование GSK-3b снижает индуцированную ишемией гибель клеток почки. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* 2010; 149 (3): 276–281.
14. Гребенчиков О.А., Лобанов А.В., Шайхутдинова Э.Р., Кузовлев А.Н., Ершов А.В., Лихванцев В.В. Кардиопротекторные свойства хлорида лития на модели инфаркта миокарда у крыс. *Патология кровообращения и кардиохирургия.* 2019; 23 (2): 43–49. DOI: 10.21688/1681-3472-2019-2-43-49.
15. Острова И.В., Гребенчиков О.А., Голубева Н.В. Нейропротективное действие хлорида лития на модели остановки сердца у крыс (экспериментальное исследование). *Общая реаниматология.* 2019; 15 (3): 73–82. DOI: 10.15360/1813-9779-2019-3-73-82.
16. Albayrak A., Halici Z., Polat B., Karakus E., Cadirci E., Bayir Y., Kunak S., Karcioğlu S.S., Yigit S., Unal D., Atamanalp S.S. Protective effects of lithium: a new look at an old drug with potential antioxidative and antiinflammatory effects in an animal model of sepsis. *Int. immunopharmacol.* 2013; 16 (1): 35–40. DOI: 10.1016/j.intimp.2013.03.018. PMID: 23542012.
17. 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; 134 (12): 5647–5651. DOI: 10.1021/ja211794x. PMID: 22384802.
18. Мороз В.В., Силачев Д.Н., Плотников Е.Ю., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Гребенчиков О.А., Лихванцев В.В. Механизмы повреждения и защиты клетки при ишемии/реперфузии и экспериментальное обоснование применения препаратов на основе лития в анестезиологии. *Общая реаниматология.* 2013. 9 (1): 63–72.
19. Yu F, Wang Z., Tchantchou F, Chiu C.T., Zhang Y., Chuang D.M. Lithium ameliorates neurodegeneration, suppresses neuroinflammation, and improves behavioral performance in a mouse model of traumatic brain injury. *J. Neurotrauma.* 2012; 29 (2): 362–374. DOI: 10.1089/neu.2011.1942. PMID: 21895523.
20. Hofmann C., Dunger N., Scholmerich J., Falk W., Obermeier F. Glycogen synthase kinase 3-beta: a master regulator of toll-like receptor-mediated chronic intestinal inflammation. *Inflamm. Bowel Dis.* 2010 Nov; 16 (11): 1850–1858. DOI: 10.1002/ibd.21294. PMID: 20848477.
21. Seymour C.W., Liu V.X., Iwashyna T.J., Brunkhorst E.M., Rea T.D., André Scherag A., Rubenfeld G., Kahn J.M., Shankar-Hari M., Singer M., Deutschman S.C., Escobar G.J., Angus D.S. Assessment of clinical criteria for sepsis: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016; 315 (8): 762–774. DOI: 10.1001/jama.2016.0288. PMID: 26903335.
22. Pillay J., Braber I., Vrisekoop N., Kuast L.M., Boer R.J., Borghans J., Tselas K., Koenderman L. In vivo labeling with 2H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 2010; 116 (4): 625–627. DOI: 10.1182/blood-2010-01-259028. PMID: 20410504.
23. Bartels M., Murphy K., Rieter E., Bruin M. Understanding chronic neutropenia: Life is short. *British Journal of Haematology.* 2016; 172 (2): 157–169. DOI: 10.1111/bjh.13798. PMID: 26456767.
24. Petrini M., Azzarà A. Lithium in the Treatment of Neutropenia. *Curr Opin Hematol.* 2012 Jan; 19 (1): 52–57. DOI: 10.1097/MOH.0b013e32834da93b. PMID: 22123660.
5. Parkos A., Colgan P., Madara J.L. Interaction of Neutrophils With Epithelial Cells: Lessons From the Intestine. *J Am Soc Nephrol.* 1994; 5 (2): 138–152. PMID: 7993993.
6. Schmidt T., Zündorf J., Grüger T., Brandenburg K., Reiners A.L., Zinserling J., Schnitzler N. CD66b overexpression and homotypic aggregation of human peripheral blood neutrophils after activation by a gram-positive stimulus. *J Leukoc. Biol.* 2012; 91 (5): 791–802. DOI: 10.1189/jlb.0911483. PMID: 22319104.
7. Lilius E.M., Nuutila J. Bacterial infections, DNA virus infections, and RNA virus infections manifest differently in neutrophil receptor expression. *Scientific World J.* 2012; 527347. DOI: 10.1100/2012/527347. PMID: 22536142.
8. Muller Kobold A., Tulleken J.E., Zijlstra J.G., Sluiter W., Hermans J. Leukocyte activation in sepsis; Correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med.* 2000 Jul; 26 (7): 883–892. DOI: 10.1007/s001340051277. PMID: 10990102.
9. Boomer J.S., Green J.M., Hotchkiss R.S. The changing immune system in sepsis. *Virulence.* 2014; 5 (1): 45–56. DOI: 10.4161/viru.26516. PMID: 24067565.
10. Klein P.S., Melton D.A. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl.Acad. Sci.* 1996; 93 (16): 8455–8459. DOI: 10.1073/pnas.93.16.8455. PMID: 8710892.
11. Stambolic V., Ruel L., Woodgett J.R. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr. Biol.* 1996 Dec 1; 6 (12): 1664–1668. DOI: 10.1016/s0960-9822(02)70790-2. PMID: 8994831.
12. Zorov D.B., Kim S.H., Pepe S., Fu Q., Fishbein K.W., Ziman B.D., Wang S., Ytrehus K., Antos C.L., Olson E.N., Sollott S.J. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J. Clin. Invest.* 2004; 113 (11): 1535–1549. DOI: 10.1172/JCI19906. PMID: 15173880
13. Vasilyeva A.K., Plotnikov E.Yu., Kazachenko A.V., Kirpatovskiy V.I., Zorov D.B. Inhibition of GSK-3b reduces ischemia-induced renal cell death. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2010; 149 (3): 276–281. [In Russ.].
14. Grebenchikov O.A., Lobanov A.V., Shaikhutdinova E.R., Kuzovlev A.N., Ershov A.V., Likhvantsev V.V. Cardioprotective effect of lithium chloride on a rat model of myocardial infarction. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya.* 2019; 23 (2): 43–49. DOI: 10.21688/1681-3472-2019-2-43-49. [In Russ.].
15. Ostrava I.V., Grebenchikov O.A., Golubeva N.V. Neuroprotective Effect of Lithium Chloride in Rat Model of Cardiac Arrest. *General Reanimatology=Obshchaya Reanimatologiya.* 2019; 15 (3): 73–82. DOI: 10.15360/1813-9779-2019-3-73-82. [In Russ.].
16. Albayrak A., Halici Z., Polat B., Karakus E., Cadirci E., Bayir Y., Kunak S., Karcioğlu S.S., Yigit S., Unal D., Atamanalp S.S. Protective effects of lithium: a new look at an old drug with potential antioxidative and antiinflammatory effects in an animal model of sepsis. *Int. immunopharmacol.* 2013; 16 (1): 35–40. DOI: 10.1016/j.intimp.2013.03.018. PMID: 23542012.
17. 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; 134 (12): 5647–5651. DOI: 10.1021/ja211794x. PMID: 22384802.
18. Мороз В.В., Силачев Д.Н., Плотников Е.Ю., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Гребенчиков О.А., Лихванцев В.В. Механизмы повреждения и защиты клетки при ишемии/реперфузии и экспериментальное обоснование применения препаратов на основе лития в анестезиологии. *Общая реаниматология.* 2013. 9 (1): 63–72.
19. Yu F, Wang Z., Tchantchou F, Chiu C.T., Zhang Y., Chuang D.M. Lithium ameliorates neurodegeneration, suppresses neuroinflammation, and improves behavioral performance in a mouse model of traumatic brain injury. *J. Neurotrauma.* 2012; 29 (2): 362–374. DOI: 10.1089/neu.2011.1942. PMID: 21895523.
20. Hofmann C., Dunger N., Scholmerich J., Falk W., Obermeier F. Glycogen synthase kinase 3-beta: a master regulator of toll-like receptor-mediated chronic intestinal inflammation. *Inflamm. Bowel Dis.* 2010 Nov; 16 (11): 1850–1858. DOI: 10.1002/ibd.21294. PMID: 20848477.
21. Seymour C.W., Liu V.X., Iwashyna T.J., Brunkhorst E.M., Rea T.D., André Scherag A., Rubenfeld G., Kahn J.M., Shankar-Hari M., Singer M., Deutschman S.C., Escobar G.J., Angus D.S. Assessment of clinical criteria for sepsis: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016; 315 (8): 762–774. DOI: 10.1001/jama.2016.0288. PMID: 26903335.
22. Pillay J., Braber I., Vrisekoop N., Kuast L.M., Boer R.J., Borghans J., Tselas K., Koenderman L. In vivo labeling with 2H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 2010; 116 (4): 625–627. DOI: 10.1182/blood-2010-01-259028. PMID: 20410504.
23. Bartels M., Murphy K., Rieter E., Bruin M. Understanding chronic neutropenia: Life is short. *British Journal of Haematology.* 2016; 172 (2): 157–169. DOI: 10.1111/bjh.13798. PMID: 26456767.
24. Petrini M., Azzarà A. Lithium in the Treatment of Neutropenia. *Curr Opin Hematol.* 2012 Jan; 19 (1): 52–57. DOI: 10.1097/MOH.0b013e32834da93b. PMID: 22123660.

Поступила 10.06.20

Received 10.06.20