

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

Гребенчиков О.А.¹, Касаткина И.С.¹, Кузовлев А.Н.¹, Лобанов А.В.², Ершов А.В.^{1,3}

Влияние хлорида лития на активацию нейтрофилов при развитии синдрома системного воспалительного ответа у пациентов после операций на сердце с использованием аппарата искусственного кровообращения

¹ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», 107031, Москва, Россия, ул. Петровка, д. 25, стр. 2;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;

³ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2

Цель исследования – изучение *in vitro* действия хлорида лития на активность нейтрофилов человека при действии сывороток пациентов с синдромом системного воспалительного ответа, развившемся после операций на сердце с искусственным кровообращением.

Методика. Исследование проводили *in vitro* на нейтрофилах, выделенных из крови 6 здоровых доноров. Нейтрофилы активировали при помощи сыворотки пациентов с синдромом системного воспалительного ответа (ССВО), перенесших операции на сердце с искусственным кровообращением (ИК). Активность нейтрофилов оценивали с использованием флуоресцентных антител к маркерам дегрануляции CD11b и CD66b. Уровень апоптоза и некроза нейтрофилов оценивали через 22 ч после выделения из крови здоровых доноров; 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 9,0 мМ.

Результаты. Инкубация нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с ССВО после операций на сердце с ИК увеличивала экспрессию CD11b в 1,5 раза и экспрессию CD66b в 1,4 раза в сравнении с экспрессией на интактных нейтрофилах. Инкубация нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с ССВО и раствором хлорида лития в концентрациях 3,0 и 9,0 мМ приводило к статистически значимому снижению уровня экспрессии CD11b CD66b на поверхности нейтрофилов в сравнении с активированными контрольными. Установлено, что хлорид лития в концентрациях 3,0 и 9,0 мМ возвращал уровни экспрессии CD11b и CD66b на активированных нейтрофилах к уровню экспрессии на интактных нейтрофилах. В концентрации 0,3 мМ хлорид лития, используемый при инкубации с активированными нейтрофилами, не вызывал значимого снижения экспрессии CD11b и CD66b относительно контрольных активированных нейтрофилов. Экспрессия CD11b и CD66b на активированных нейтрофилах при их инкубации с хлоридом лития в концентрации 0,3 мМ была значимо выше относительно экспрессии данных молекул на интактных нейтрофилах. Сыворотка пациентов с развившемся ССВО снижала спонтанный апоптоз нейтрофилов, а раствор хлорида лития в концентрации 3,0 или 9,0 мМ, добавленный в среду инкубации, увеличивал способность нейтрофилов к спонтанному апоптозу.

Заключение. Хлорид лития оказывал противовоспалительный эффект снижал дегрануляцию и активацию нейтрофилов посредством уменьшения уровня экспрессии молекул CD11b и CD66b на поверхности нейтрофилов, которые предварительно были активированы сыворотками пациентов с ССВО. В концентрации 3,0 мМ и выше хлорид лития индуцировал спонтанный апоптоз нейтрофилов, активированных сыворотками пациентов с ССВО после операций на сердце с ИК.

Ключевые слова: синдром системного воспалительного ответа; операции на сердце; апоптоз нейтрофилов: хлорид лития; активация нейтрофилов; CD11b; CD66b

Для цитирования: Гребенчиков О.А., Касаткина И.С., Кузовлев А.Н., Лобанов А.В., Ершов А.В. Влияние хлорида лития на активацию нейтрофилов при развитии синдрома системного воспалительного ответа у пациентов после операций на сердце с использованием аппарата искусственного кровообращения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(4): 47-53.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.47-53

Для корреспонденции: Гребенчиков Олег Александрович, e-mail: oleg.grebenchikov@yandex.ru

Участие авторов: концепция и дизайн работы – Гребенчиков О.А., Касаткина И.С.; сбор данных – Касаткина И.С.; анализ и интерпретация данных – Касаткина И.С., Гребенчиков О.А.; написание статьи – Гребенчиков О.А., Касаткина И.С.; редактирование статьи – Гребенчиков О.А., Кузовлев А.Н., Лобанов А.В., Ершов А.В. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.
Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Поступила 23.05.2020
Принята к печати 16.10.2020
Опубликована 26.11.2020

Grebenchikov O.A.¹, Kasatkina I.S.¹, Kuzovlev A.N.¹, Lobanov A.V.², Ershov A.V.^{1,3}

Influence of lithium chloride on neutrophil activation in the development of systemic inflammatory response syndrome in patients after on-pump cardiac surgery

¹FSBSI Federal Research and Clinical Center for Reanimatology and Rehabilitation, 25, p. 2, Petrovka St., 107031, Moscow, Russia;

²FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8 Baltiyskaya St., 125315 Moscow, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Trubetskaya St., 8, bld. 2, Moscow, 119991, Russia

The aim of this work was to study the anti-inflammatory effect of lithium chloride on human neutrophils in vitro under the action of the serum of patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS), which developed after on-pump cardiac surgery.

Methods. The study was performed on neutrophils isolated from the blood of five healthy donors, which was activated using serum from patients with SIRS. Neutrophil activity was assessed using fluorescent antibodies to CD11b and CD66b degranulation markers. The level of apoptosis and necrosis of human neutrophils was evaluated 22 hours after isolation. Quantification was performed using annexin V and propidium iodide on a flow cytometer. Intact and activated neutrophils were treated with 0.3, 3.0 and 9.0 mM lithium chlorides.

Results. Incubation of neutrophils with the blood serum of patients with SIRS after on-pump cardiac surgery increased the expression of CD11b by 1.5 times and the expression of CD66b by 1.4 times compared to expression on intact neutrophils. Incubation of neutrophils with blood serum of patients with SIRS and 3.0 and 9.0 mM lithium chloride solutions led to a statistically significant decrease in the level of expression of CD11b CD66b on the surface of neutrophils in comparison with control activated neutrophils. It was found that 3.0 and 9.0 mM lithium chloride solutions returned the expression levels of CD11b and CD66b on activated neutrophils to the expression level on intact neutrophils. 0.3 mM of lithium chloride, used during incubation with activated neutrophils, did not cause a significant decrease in the expression of CD11b and CD66b relative to control activated neutrophils. The expression of CD11b and CD66b on activated neutrophils during their incubation with 0.3 mM of lithium chloride was significantly higher relative to the expression of these molecules on intact neutrophils. The serum of patients with advanced SIRS decreased the ability of neutrophils to spontaneous apoptosis. 3.0 or 9.0 mM lithium chloride solutions added to the incubation medium increased the ability of neutrophils to spontaneous apoptosis.

Conclusion. Lithium chloride reduced the degranulation and activation of neutrophils by reducing the expression level of CD11b and CD66b molecules on the surface of neutrophils that were previously activated by the serum of patients with SIRS. This effect determines the anti-inflammatory influence of lithium chloride. Lithium chloride at 3.0 mM and higher induced spontaneous apoptosis of neutrophils activated by the serum of patients with SIRS after on-pump cardiac surgery.

Keywords: systemic inflammatory response syndrome; heart surgery; neutrophil apoptosis; lithium chloride; neutrophil activation; CD11b; CD66b

For citation: Grebenschikov O.A., Kasatkina I.S., Kuzovlev A.N., Lobanov A.V., Ershov A.V. Influence of lithium chloride on neutrophil activation in the development of systemic inflammatory response syndrome in patients after on-pump cardiac surgery. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological physiology and experimental therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 47-53. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.47-53

For correspondence: **Grebenschikov Oleg A.**, chief researcher of the laboratory of organoprotection in critical conditions of the V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, e-mail: oleg.grebenschikov@yandex.ru

Contribution: research concept and design - Grebenschikov O.A., Kasatkina I.S.; material collecting - Kasatkina I.S.; data analysis and interpretation - Kasatkina I.S., Grebenschikov O.A.; writing text Grebenschikov O.A., Kasatkina I.S.; text editig - Grebenschikov O.A., Kuzovlev A.N., Lobanov A.V., Ershov A.V. Approval of the final version of the article - all co-authors.

Acknowledgments. The study did not have sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Information about the authors:Grebenchikov O.A., <http://orcid.org/0000-0001-9045-6017>Kasatkina I.S., <http://orcid.org/0000-0002-6177-3360>Kuzovlev A.N., <http://orcid.org/0000-0002-5930-0118>Lobanov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-5159-3227>Ershov A.V., <http://orcid.org/0000-0001-5758-8552>

Received 23.05.2020

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

Введение

Не разрешаемое воспаление, сопровождаемое гибелью множества клеток и развитием полиорганной недостаточности, повышенная восприимчивость к инфекционным возбудителям являются основными причинами, лежащими в основе высокого риска смерти, характерного для критических состояний. Это определяет необходимость разработки новых подходов для патогенетического воздействия на данные причины. На сегодняшний день нет достаточно эффективных методов купирования гиперактивированного состояния иммунной системы. Поэтому одной из важнейших задач современной реаниматологии является поиск препаратов для профилактики и лечения пациентов с синдромом системного воспалительного ответа или предотвращения последующих осложнений. Операции на сердце в условиях искусственного кровообращения (ИК) представляют крайнюю степень хирургической агрессии к специфическим факторам, к которым относятся ишемические и реперфузионные повреждения органов, которые, в свою очередь, приводят к окислительному стрессу и развитию системной воспалительной реакции в послеоперационном периоде, что ведет к увеличению летальности. [1]. По данным Vall и соавторами 30-дневная летальность при операциях реваскуляризации миокарда составляет 4,0–5,4% и 6,5–9,1% при операциях на клапанах сердца [2].

Чувствительными маркерами системного воспалительного ответа являются молекулы CD11b и CD66b, которые находятся во внутриклеточных гранулах нейтрофилов. При действии воспалительных стимулов гранулы сливаются с цитоплазматической мембраной и эти молекулы экспонируются на поверхности клеток (рис. 1), этот процесс называется дегрануляцией. CD11b взаимодействует с рецепторами ICAM-1 на эндотелиальных клетках, что обеспечивает адгезию нейтрофилов и последующую их миграцию через эндотелиальный барьер к очагу воспаления [3], в то время как CD66b связан с агрегацией нейтрофилов [4].

Определение экспрессии молекул CD11b и CD66b широко используется в клинической диагностике. Из-

вестно, что их уровень значительно повышается у пациентов с различными видами бактериальных инфекций [5] и сепсисе [6].

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, а также в профилактике его депрессивных фаз и периодических депрессий. Однако, в последнее время накопилось достаточно новых сведений о его высокой эффективности для терапии некоторых других состояний, прежде всего, обусловленных ишемией/реперфузией. Основную роль ионам лития отводят в нейтрализации последствий окислительного дистресса, сопутствующего большому ряду генетических (нейро- и миопатии) и приобретенных (инфаркт, инсульт, сочетанные травмы) патологий. Препарат лития принадлежит к веществам, которые обладают выраженными цитопротективными свойствами вследствие способности фосфорилировать киназу 3-бета гликогенсинтетазы (GSK-3 β) и инактивировать этот фермент. Установлен значительный терапевтический потенциал хлорида лития для предотвращения гибели клеток в результате ишемии-реперфузии [7–9]. Экспериментальные исследования доказали реальные возможности лития для прекодиционирования (защиты от ишемии-реперфузии) ткани миокарда, почек, печени [10–12].

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, как на инфекционные, так и неинфекционные повреждающие агенты.

Цель исследования – изучение *in vitro* действия хлорида лития на активность нейтрофилов человека *при* действии сывороток пациентов с синдромом системного воспалительного ответа, развившемся после операций на сердце с искусственным кровообращением.

Методика

Исследование проводили на нейтрофилах, полученных из крови здоровых доноров (мужчины, $n=6$, средний возраст 35,6 [28,7; 45,0] лет).

Для изучения противовоспалительных эффектов хлорида лития изучали его действие на дегрануляцию и апоптоз нейтрофилов. Дегрануляцию нейтрофилов определяли: 1) на нейтрофилах, полученных от здоровых доноров, без дополнительного воздействия – интактных нейтрофилах, 2) на нейтрофилах активированных сывороткой крови больных с ССВО, 3) нейтрофилах, активированных сывороткой крови больных с ССВО и инкубированных с раствором хлорида лития в разных концентрациях.

Для выделения нейтрофилов гепаринизированную венозную кровь смешивали с раствором декстрана Т-500 (Pharmacosmos, Дания) до конечной концентрации декстрана 1% и оставляли при комнатной температуре на 30 мин 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 300 g 30 мин в центрифуге с отключённым тормозом. Затем удаляли супернатант и все дальнейшие процедуры проводили на льду с использованием охлажденных растворов. Удаление эритроцитов проводили при помощи ресуспендирования осадка в 2 мл деионизированной стерильной воды в течение 45 с, к которой затем добавляли 2 мл двукратного фосфатного буфера (PBS) для восстановления точности и центрифугировали при 200g, +4 °C в течение 10 мин. Осаждённые нейтрофилы промывали PBS

и ресуспендировали в культуральной среде RPMI-1640 (Пан Эко, Россия), 10% FBS с низким содержанием эндотоксинов. Для изучения дегрануляции нейтрофилов использовали концентрат клеток 4 млн/мл.

Сыворотку крови, которую использовали для активации нейтрофилов, получали из крови больных с развившимся синдромом системного воспалительного ответа (ССВО). Забор крови проводили в первые и вторые сутки после проведения операций на сердце с ИК (мужчины, $n=5$; средний возраст 38,4 [29,8–42,4] лет). Критериями выбора больных были параметры, предложенные Американской Коллегией Врачей (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference [13]): температура > 38 или <36 °C; ЧСС > 90 уд./мин; ЧДД > 20/мин или PCO_2 <32 мм рт. ст.; лейкоцитоз > 12000 или лейкопения < 4000.

Для активации нейтрофилов к концентрату нейтрофилов от здоровых доноров добавляли сыворотку больных с ССВО и инкубировали 30 мин при +37 °C. Для определения влияния соли лития на дегрануляцию нейтрофилов к концентрату нейтрофилов от здоровых доноров добавляли сыворотку больных с ССВО и хлорид лития в концентрациях 0,3; 3,0 и 9,0 мМ и также инкубировали 30 мин при +37 °C. Затем добавляли антитела, конъюгированные с флуоресцентными красителями CD11b-FITC и CD66b-AlexaFluor647 (BD Biosciences, США), и инкубировали 30 мин на льду, после чего измеряли уровень флуоресценции (условные единицы флуоресценции) на проточном цитофлуориметре Beckman-Coulter FC 500.

Для определения апоптоза нейтрофилы от здоровых доноров с добавлением сыворотки больных с

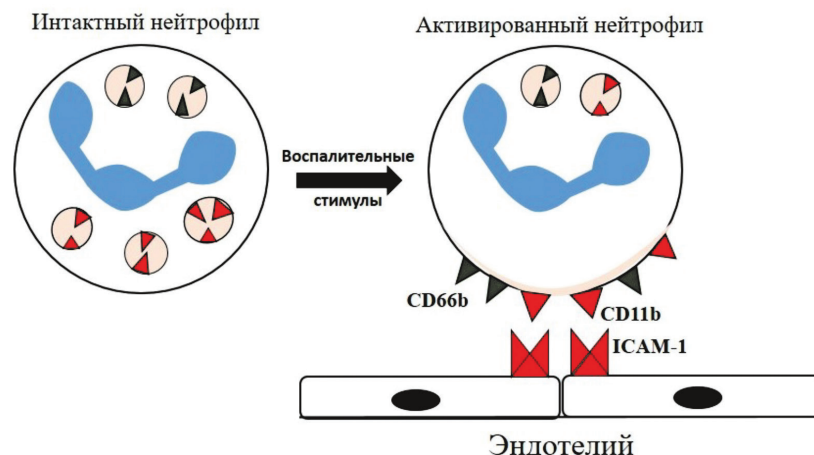


Рис. 1. Активация нейтрофилов и экспрессия ими молекул адгезии CD11b (красный треугольник) и CD66b (зеленый треугольник) под действием воспалительного стимула. ICAM-1 – англ. Inter-Cellular Adhesion Molecule, молекула клеточной адгезии, которая экспрессируется эндотелием.

ССВО и нейтрофилы от здоровых доноров с добавлением сыворотки больных с ССВО и хлорида лития в разных концентрациях (0,3; 3,0 и 9,0 мМ) инкубировали в течение 22 ч при 37 °С в увлажнённом CO₂-инкубаторе. Затем клетки центрифугировали при 400 g в течение 5 мин и ресуспендировали осадок в 70 мкл буфера (10 мМ HEPES, 120 мМ NaCl, 2,5 мМ CaCl₂, рН = 7,4). К каждой пробе добавляли 2,5 мкл аннексина V, конъюгированного с флуоресцентным красителем FITC (ThermoFisher, США) и оставляли на 25 мин при 37 °С. Далее добавляли иодид пропидия до конечной концентрации 5 мкг/мл, инкубировали ещё 5 мин, 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.

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

Результаты

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.

В проведенном исследовании уровень экспрессии CD11b на поверхности интактных нейтрофилов (здоровые доноры) составлял 3577,50 у.е.ф. Инкубация нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с ССВО при ИК увеличивала экспрессию тех же молекул в 1,5 раза в сравнении с экспрессией на интактных нейтрофилах. Добавление раствора хлорида лития в концентрации 9,0 мМ к интактным нейтрофилам незначимо уменьшало экспрессию молекул CD11b (табл. 1). Хлорид лития в концентрации 0,3 мМ, используемый при инкубации нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с ССВО, вызывал снижение экспрессии CD11b на уровне тенденции относительно экспрессии данной молекулы на контрольных активированных нейтрофилах без добавления препарата. Добавление лития хлорида в среду инкубации нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с

ССВО в больших концентрациях 3,0 и 9,0 мМ приводило к статистически значимому снижению уровня экспрессии CD11b на поверхности нейтрофилов в сравнении с контрольными активированными нейтрофилами (табл. 1). Сравнение уровня экспрессии CD11b на активированных нейтрофилах, которые инкубировали с хлоридом лития в концентрации 0,3 мМ, с уровнем экспрессии данной молекулы на интактных нейтрофилах статистически значимого различия не выявило. Хлорид лития в концентрациях 3,0 и 9,0 мМ возвращал уровни экспрессии CD11b на активированных нейтрофилах к уровню экспрессии, показанному на интактных нейтрофилах. Более того, использование максимальной концентрации 9,0 мМ не значимо (на 30 %) снижало экспрессию этих молекул в сравнении с интактными нейтрофилами (табл. 1).

Выявленные в эксперименте закономерности экспрессии CD11b на нейтрофилах были также характерны и для экспрессии CD66b в тех же условиях. Уровень экспрессии CD66b на поверхности интактных нейтрофилов (здоровые доноры) составлял 10778,0 у.е.ф (табл. 2).

Инкубация нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с ССВО при ИК увеличивала экспрессию

Таблица 1

Уровень экспрессии CD11b на поверхности нейтрофилов при воздействии сыворотки пациентов с развившемся синдромом системного воспалительного ответа после операций на сердце с искусственным кровообращением и раствора хлорида лития

Нейтрофилы	Инкубация с раствором хлорида лития, концентрация	Экспрессия CD11b, у.е.ф.
Интактные	-	3577,50 [3389,0–3889,0]
	9,0 мМ	2978,9 [2588,0–3778,0]
Активированные	-	5369,0 [5115,0–5456,0] *
	0,3 мМ	5098,0 [4527,0–5375,0]
	3,0 мМ	3688,50 [3200,0–3974,0] #
	9,0 мМ	2998,50 [1912,0–3194,0] #

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 интактные нейтрофилы – нейтрофилы, полученные от здоровых доноров; активированные нейтрофилы – интактные нейтрофилы, инкубированные с сывороткой крови пациентов с развившемся ССВО после ИК. Данные представлены медианой и межквартильным интервалом, * - $p < 0,05$ в сравнении экспрессией CD66b на интактных нейтрофилах, # - $p < 0,05$ в сравнении экспрессией CD66b на активированных нейтрофилах (по Манна-Уитни).

CD66b в 1,4 раза в сравнении с экспрессией на интактных нейтрофилах. Добавление раствора хлорида лития в концентрации 9,0 мМ к интактным нейтрофилам значимо уменьшало экспрессию молекул CD66b по отношению к интактным нейтрофилам (табл. 2). Добавление хлорида лития в концентрациях 3,0 и 9,0 мМ в среду инкубации нейтрофилов, активированных сывороткой крови пациентов с ССВО, вызывало статистически значимое уменьшение экспрессии CD66b на поверхности нейтрофилов в сравнении с экспрессией CD66b на активированных нейтрофилах без добавления хлорида лития. Использование концентрации 0,3 мМ при инкубации активированных нейтрофилов значимо не влияло на экспрессию CD66b в сравнении с его экспрессией на активированных нейтрофилах без добавления препарата. Уровень экспрессии CD66b на активированных нейтрофилах, которые инкубировали с хлоридом лития в концентрации 0,3 мМ, был значимо выше, чем экспрессия данной молекулы на интактных нейтрофилах.

Хлорид лития в концентрациях 3,0 и 9,0 мМ восстанавливал уровни экспрессии CD66b на активированных нейтрофилах до уровня экспрессии на интактных нейтрофилах. Использование максимальной концентрации 9,0 мМ не значимо (на 20 %) снижало экспрессию этих молекул при сравнении с интактными нейтрофилами (табл. 2).

Апоптоз – крайне важный и сложно регулируемый этап в жизненном цикле нейтрофилов, поскольку слишком быстрая и массовая гибель нейтрофилов приведёт к нейтропении и подверженности организма инфекциям, а излишне долгая жизнь – напротив, может вызвать хроническое воспаление [14].

Таблица 2

Уровень экспрессии CD66b на поверхности интактных нейтрофилов при воздействии сыворотки пациентов с развившемся синдромом системного воспалительного ответа после операций на сердце с искусственным кровообращением и раствора лития хлорида

Нейтрофилы	Инкубация с раствором хлорида лития, концентрация	Экспрессия CD66b, у.е.ф.
Интактные	-	10778,0 [10088,0–11555,0]
	9,0 мМ	7555,0 [6888,0–8545,0] *
Активированные	-	15105,0 [15658,0–15892,0] *
	0,3 мМ	14187,0 [13678,0–15877,0] *
	3,0 мМ	11712,0 [10587,0–11985,0] #
	9,0 мМ	8333,0 [6989,0–9845,0] #

Результаты исследования показали, что уровень апоптоза нейтрофилов человека через 22 ч после выделения составляет 57,70%. Инкубация нейтрофилов с сыворотками пациентов, у которых развился ССВО после операций на сердце с ИК, значимо в 1,6 раза уменьшает количество нейтрофилов, которые подверглись спонтанному апоптозу. Добавление раствора хлорида лития в концентрации 9,0 мМ к интактным нейтрофилам значимо на 31% уменьшало количество нейтрофилов, которые подверглись спонтанному апоптозу. Апоптоз активированных нейтрофилов, инкубированных с растворами хлорида лития в концентрациях 0,3; 3,0 или 9,0 мМ был значимо ниже, чем спонтанный апоптоз интактных нейтрофилов. Хлорид лития в концентрациях 3,0 и 9,0 мМ, добавленный в среду инкубации нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с ССВО, значимо увеличивал количество нейтрофилов, подвергшихся спонтанному апоптозу в сравнении с апоптозом активированных нейтрофилов (табл. 3).

Эти данные свидетельствуют, что сыворотка пациентов с развившемся ССВО после операций на сердце с ИК снижает возможности нейтрофилов к спонтанному апоптозу, а раствор лития хлорида в концентрации 3,0 мМ и выше, добавленный в среду инкубации, способен увеличить способность нейтрофилов к спонтанному апоптозу.

Заключение

Проведенные исследования показали, что реализация противовоспалительного эффекта солей лития на повреждающие агенты осуществляется, в том числе, через воздействие на нейтрофилы, что при-

Таблица 3

Уровень апоптоза анексин-положительных (ап+) нейтрофилов при инкубации с сыворотками пациентов с развившемся синдромом системного воспалительного ответа после операций на сердце с искусственным кровообращением и раствором лития хлорида

Нейтрофилы	Инкубация с раствором хлорида лития, концентрация	Уровень апоптоза и некроза, %
Интактные	-	57,70 [56,70–58,30]
	9,0 мМ	39,95 [39,50–43,50]
Активированные	-	35,80 [33,80–39,00] *
	0,3 мМ	34,45 [33,90–35,10] *
	3,0 мМ	46,55 [43,00–47,70] *.#
	9,0 мМ	44,40 [40,50–48,80] *.#

водит к снижению экспрессии на их поверхности маркеров дегрануляции CD11b и CD66b. В тоже время раствор лития хлорида увеличивает способность нейтрофилов к спонтанному апоптозу. Полученные результаты позволяют предположить возможные перспективы применения лития хлорида для профилактики и лечения ССВО после операций на сердце с ИК.

Литература

(п.п. 2-9; 13; 14 см. References)

1. Гребенчиков О.А., Лихванцев В. В., Плотников Е. Ю., Силачев Д.Н., Певзнер И.Б., Зорова Л.Д. и др. Молекулярные механизмы развития и адресная терапия синдрома ишемии-реперфузии. *Анестезиология и реаниматология*. 2014; 3: 59–67.
10. Васильева А.К., Плотников Е.Ю., Казаченко А.В., Кирпатовский В.И., Зоров Д.Б. Ингибирование GSK₃β снижает индуцированную ишемией гибель клеток почки. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* 2010; 149(3): 276–81.
11. 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): 43–9.
12. 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.

References

1. Grebenchikov O.A., Likhvantsev V.V., Plotnikov E.Yu., Silachev D.N., Pevzner I.B., Zorova L.D. et al. Grebenchikov Molecular mechanisms of ischemic-reperfusion syndrome and its therapy. *Anesthesiology and reanimatology*. 2014; 3: 59–67.
2. Ball L., Costantino F., Pelosi P. Postoperative complications of patients undergoing cardiac surgery. *Current Opinion in Critical Care*. 2016; 22(4): 386–92.

Сведения об авторах:

Гребенчиков Олег Александрович, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. органопротекции при критических состояниях НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского ФНКЦ РР, e-mail: oleg.grebenchikov@yandex.ru;

Касаткина Ирина Сергеевна, соискатель каф. патофизиологии ИВДПО ФНКЦ РР;

Кузовлев Артем Николаевич, доктор мед. наук, заместитель директора-руководитель НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского ФНКЦ РР;

Лобанов Александр Владимирович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП;

Ершов Антон Валерьевич, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского ФНКЦ РР.

3. Parkos A., Colgan P., Madara J.L. Interaction of Neutrophils With Epithelial Cells: Lessons From the Intestine. *J Am Soc Nephrol*. 1994; 5(2): 138–52.
4. Schmidt T., Zündorf J., Grüger T., Brandenburg K., Reiners A.L., Zinslerling J. et al. 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.
5. Lilius E.M., Nuutila J. Bacterial infections, DNA virus infections, and RNA virus infections manifest differently in neutrophil receptor expression. *Scientific World Journal*. 2012; 2012: 527347.
6. 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; 26(7): 883–92.
7. Klein P.S., Melton D.A. A molecular mechanism for the effect of lithium on development Proc. *Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 8455–9.
8. Stambolic V., Ruel L., Woodgett J.R. Lithium inhibits glycogen synthase kinase₃ activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr. Biol.*, 1996; 6: 1664–8.
9. Zorov D.B., Kim S.H., Pepe S., Fu Q., Fishbein K.W., Ziman B.D. et al. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J. Clin. Invest.* 2004; 113(11): 1535–49.
10. Vasileva A.K., Plotnikov E.Y., Zorov D.B., Kazachenko A.V., Kirpatovsky V.I. Inhibition of GSK-3β decreases the ischemia-induced death of renal cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2010; 149(3): 303–7.
11. Grebenchikov O.A., Lobanov A.V., Shayhutdinova E.R., Kuzovlev A.N., Ershov A.V., Likhvantsev V.V. Cardioprotective effect of lithium chloride on a rat model of myocardial infarction. *Circulatory pathology and cardiac surgery*. 2019; 23(2): 43–9.
12. Ostrova I.V., Grebenchikov O.A., Golubeva N.V. Neuroprotective effect of lithium chloride on a model of cardiac arrest in rats (experimental study). *Obshchaya reanimatologiya*. 2019; 15(3): 73–82.
13. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.* 1992; 20(6): 864–74.
14. Bartels M, Murphy K, Rieter E, Bruin M. Understanding chronic neutropenia: Life is short. *Br J Haematol*. 2016; 172(2): 157–69.