

Протективный эффект лития хлорида на эндотелиоциты при септическом шоке

О. А. Гребенчиков, В. Т. Долгих, М. Д. Прокофьев, И. С. Касаткина, А. В. Ершов

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

Protective Effect of Lithium Chloride on Endothelial Cells in Septic Shock

Oleg A. Grebenchikov, Vladimir T. Dolgikh, Maxim D. Prokofiev,
Irina S. Kasatkina, Anton V. Ershov

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

Для цитирования: О. А. Гребенчиков, В. Т. Долгих, М. Д. Прокофьев, И. С. Касаткина, А. В. Ершов. Протективный эффект лития хлорида на эндотелиоциты при септическом шоке. *Общая реаниматология*. 2020; 16 (3): 94–105. DOI: 10.15360/1813-9779-2020-3-94-105 [На русск. и англ.]

For citation: Oleg A. Grebenchikov, Vladimir T. Dolgikh, Maxim D. Prokofiev, Irina S. Kasatkina, Anton V. Ershov. Protective Effect of Lithium Chloride on Endothelial Cells in Septic Shock. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2020; 16 (3): 94–105. DOI: 10.15360/1813-9779-2020-3-94-105 [In Russ. and Engl.]

Резюме

Цель — изучить эффективность действия хлорида лития в качестве средства, предотвращающего повреждение монослоя эндотелиальных клеток *in vitro* под действием сыворотки пациентов с септическим шоком.

Материал и методы. При проведении исследования использовали токсичную сыворотку больных септическим шоком в количестве 5 человек, отобранных в соответствии с критериями «Сепсис-3». Кровь для проведения экспериментов забирали в течении 2 часов после выявления септического шока. В качестве контрольной группы исследовали сыворотку крови 5 практически здоровых доноров. Эндотелиальные клетки Ea.hy926 инкубировали в течение 3 часов при 37°C с сывороткой здорового человека (контроль), а также с сывороткой пациента с септическим шоком без хлорида лития и в его присутствии в конечных концентрациях 0,01 ммоль/л, 0,1 ммоль/л, 1 ммоль/л, 10 ммоль/л. Хлорид лития добавляли за 1 час до смены сывороток. После инкубации с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии оценивали состояние актина, VE-кадгерина и клаудина, с помощью вестерн-блоттинга определяли содержание и степень фосфорилирования гликогенсинтазы киназы 3β (GSK-3β).

Результаты. Установили, что токсичная сыворотка подавляла фосфорилирование GSK-3β в эндотелиоцитах, а также вызывала расщепление VE-кадгерина, уменьшение количества клаудина. Токсическая сыворотка также изменяла форму эндотелиоцитов — они теряли нативную многоугольную форму, вытягивались, между ними образовывались промежутки. Инкубация монослоя эндотелиоцитов с хлоридом лития в концентрации от 1,0 ммоль/л и выше практически полностью предотвращала разборку клаудина, актина и VE-кадгерина. При моделировании защиты хлоридом лития эндотелиоцитов от токсичной сыворотки обнаружили, что прединкубация с хлоридом лития длительностью 1 час, в концентрации 1 ммоль/л предотвращала инактивацию (дефосфорилирование) GSK-3β и даже, наоборот, стимулировало ее фосфорилирование на временном интервале 1–4 часа после воздействия сыворотки.

Заключение. В результате проведенного исследования четко показали наличие протективного эффекта хлорида лития относительно монослоя эндотелиоцитов путем активации фосфорилирования GSK-3β (перевод фермента в неактивную форму). При этом воздействие хлорида лития имело выраженный дозозависимый характер начиная с концентрации 0,01 ммоль/л.

Ключевые слова: хлорид лития; септический шок; эндотелиоцит; гликогенсинтаза киназа 3β; GSK-3β

Summary

The aim is to study the effectiveness of lithium chloride for preventing damage to the monolayer of endothelial cells *in vitro* exposed to serum of patients with septic shock.

Адрес для корреспонденции:

Олег Александрович Гребенчиков
E-mail: oleg.grebenchikov@yandex.ru

Correspondence to:

Oleg A. Grebenchikov
E-mail: oleg.grebenchikov@yandex.ru

Material and methods. Serum samples prepared from blood of 5 septic shock patients selected according to «Sepsis-3» criteria and 5 healthy volunteers (control serum) were used in the study. Blood for experiments was withdrawn within 2 hours after the diagnosis of septic shock. The Ea.hy926 endothelial cells were incubated with the serum of a patient with septic shock (toxic serum) or control serum for 3 hours at 37°C without or with lithium chloride at final concentrations of 0.01 mmol/l, 0.1 mmol/l, 1 mmol/l, 10 mmol/l. Lithium chloride was added 1 hour before the serum change. After incubation, the expressions of actin, VE-cadherin and claudin were assessed by immunofluorescent microscopy; the level and degree of phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) were determined using western blotting.

Results. Toxic serum significantly inhibited GSK-3 β phosphorylation, induced cleavage of VE-cadherin and reduced the claudin in endothelial cells. Toxic serum also altered the shape of endothelial cells: they lost their native polygonal shape and became elongated with gaps between them. Incubation of endothelial cells monolayer with lithium chloride at concentrations equal or higher 1.0 mmol/l almost completely prevented cleavage of claudin, actin and VE-cadherin. When studying the *in vitro* protection of endothelial cells from effects of toxic serum with lithium chloride, pre-incubation with the drug at a concentration of 1 mmol/l for 1 hour prevented inactivation (dephosphorylation) of GSK-3 β and even to stimulate its phosphorylation in 1–4 hours after exposure to the serum.

Conclusion. The study clearly showed the protective effect of lithium chloride on endothelial cell monolayer by activating phosphorylation of GSK-3 β (enzyme conversion into inactive form). Moreover, the effect of lithium chloride exhibited a distinct dose-dependent character starting with a concentration of 0.01 mmol/l.

Keywords: lithium chloride; septic shock; endothelial cell; glycogen synthase kinase 3 β ; GSK-3 β

DOI: 10.15360/1813-9779-2020-3-94-105

Введение

Препараты лития уже многие годы успешно применяются в психиатрии для лечения биполярных расстройств [1]. Однако к настоящему моменту в литературе накоплено большое количество экспериментальных данных, свидетельствующих о кардио-, нефро- и нейропротекторных свойствах лития [2]. Впервые защитные свойства ионов лития были обнаружены *in vitro* на кардиомиоцитах в 2004 году, когда их инкубация с хлоридом лития приводила к выраженному снижению гибели клеток от ишемии/реоксигенации, предотвращая открытие митохондриальной поры через фосфорилирование (ингибиование) фермента гликогенсинтазы 3 β (GSK-3 β) [3]. В дальнейшем они были подтверждены на модели ишемии перфузируемого по Лангendorфу сердца [4] и *in vivo* на модели инфаркта миокарда у крыс [5].

В этой связи представляет большой интерес недавнее исследование [6] на модели остановки сердца по В. Г. Корпачеву. При гистологическом исследовании установлено, что 10-минутная остановка сердца приводила к снижению числа жизнеспособных нейронов в поле CA1 гиппокампа на 37,5% ($p<0,001$), в поле CA3/CA4 — на 12,9% ($p<0,05$). Применение LiCl способствовало увеличению числа жизнеспособных нейронов гиппокампа у реанимированных крыс — в поле CA1 на 37% ($p<0,01$), в поле CA3/CA4 — на 11,5% ($p\leq 0,1$) по сравнению с нелеченными животными. Этот эффект мог быть обусловлен повышением содержания фосфорилированной формы белка GSK-3 β .

Синдром системного воспалительного ответа возникает в ответ на различные повреждающие воздействия, как инфекционного (бак-

Introduction

Lithium preparations have been successfully used for many years in psychiatry to treat bipolar disorders [1]. However, to date, a lot of experimental data have been accumulated in the literature, indicating cardio-, nephro- and neuroprotective properties of lithium [2]. The protective properties of lithium ions were first discovered *in vitro* on cardiomyocytes in 2004 when their incubation with lithium chloride led to a marked decrease in cell death from ischemia/reoxygenation, preventing the opening of mitochondrial pore via phosphorylation (inhibition) of glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) [3]. Later the lithium effects were confirmed using the Langendorff perfusion heart [4] and *in vivo* myocardial infarction model in rats [5].

In this connection, a recent study [6] that employed modeling the cardiac arrest according to method by V. G. Korpachev is of great interest. Histological study revealed that 10-minute cardiac arrest resulted in a 37.5% ($P<0.001$) decrease in the number of viable neurons in the CA1 field of the hippocampus and 12.9% ($P<0.05$) decrease in the CA3/CA4 field. The use of LiCl was associated with an increase in the number of viable hippocampal neurons in resuscitated rats by 37% in the CA1 field ($P<0.01$) and by 11.5% in the CA3/CA4 field ($P\leq 0.1$) compared to untreated animals. This effect may have been due to the increased content of phosphorylated protein GSK-3 β .

The systemic inflammatory response syndrome (SIRS) occurs as a result of various damaging effects of both infectious (bacterial pathogens) and non-infectious (traumas, burns, and large volume surgical interventions) origin. [7] SIRS is manifested by increased production of proinflammatory cytokines and their penetration through

териальные возбудители), так и неинфекционного (травмы, ожоги, оперативные вмешательства большого объема) генеза [7] и проявляется гиперпродукцией провоспалительных цитокинов, их проникновением через гистогематические барьеры с последующей инфильтрацией лейкоцитами и цитокинами тканей органов-мишеней [8, 9]. Последнее приводит к развитию полиорганной недостаточности, являющейся основной причиной гибели пациентов в палатах интенсивной терапии. Важнейшую роль в развитии, регуляции и разрешении воспаления играют нейтрофилы — клетки, участвующие в формировании неспецифической резистентности организма. Иммунный ответ на повреждение тканей или инфекцию начинается с секреции нейтрофилами провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, что направлено на удаление повреждающего агента и восстановление гомеостаза.

Высокочувствительными и диагностически значимыми маркерами системного воспалительного ответа являются молекулы CD11b и CD66b, которые находятся во внутриклеточных гранулах нейтрофилов. CD11b взаимодействует с рецепторами ICAM-1 на эндотелиальных клетках, что обеспечивает адгезию нейтрофилов и последующую их миграцию через эндотелиальный барьер к очагу воспаления [10].

Эндотелий представлен одним слоем специализированных клеток, выстилающих внутреннюю поверхность кровеносных и лимфатических сосудов. Помимо барьерной, эндотелий выполняет ряд других физиологических функций: поддержание онкотического давления, участие в свертывании крови, ангиогенезе и прочее. При развитии некоторых патологических процессов эндотелиальная дисфункция становится их важной составляющей и во многом определяет тяжесть течения атеросклероза, сепсиса, ишемических и реперфузионных повреждений, тяжелой сочетанной травмы, а также синдрома системной воспалительной реакции, в том числе, и в раннем послеоперационном периоде [11]. Этот синдром — ключевой феномен критических состояний, сопровождающийся увеличением проникновения провоспалительных цитокинов через гистогематические барьеры и приводящий к нарушению целостности последних, с последующей инфильтрацией тканей лейкоцитами и цитокинами [12]. Транскапиллярная утечка жидкости, возникающая вследствие нарушения барьерной функции эндотелия или гибели клеток, приводит к возникновению интерстициального отека, что, на уровне организма, манифестирует полиорганной недостаточностью — состоянием, представляющим серьезную угрозу жизни больного [13, 14].

blood-tissue barriers with subsequent infiltration of target organ tissues with leukocytes and cytokines [8, 9]. The latter leads to the development of multi-organ failure, which is the main cause of death of patients in intensive care wards. The most important role in development, control and resolution of inflammation is played by neutrophils, which participate in formation of nonspecific resistance of the body. Immune response to tissue damage or infection begins with neutrophils secreting pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines aimed at eliminating the damaging agent and restoring homeostasis.

The CD11b and CD66b molecules, which are found in neutrophil intracellular granules, are highly sensitive and diagnostically significant markers of the systemic inflammatory response. CD11b interacts with ICAM-1 receptors on endothelial cells, allowing for neutrophil adhesion and their subsequent migration through the endothelial barrier to the inflammation site [10].

Endothelium is a monolayer of specialized cells lining the inner surface of blood and lymphatic vessels. The main physiological functions of endothelium include barrier, maintenance of oncotic pressure, participation in blood coagulation, angiogenesis, etc. Endothelial dysfunction is an important component of various pathological processes and largely affects the severity of atherosclerosis, sepsis, ischemic and reperfusion injuries, severe combined trauma, as well as SIRS occurring in the early postoperative period [11]. This syndrome is a key event of critical conditions accompanied by increased penetration of pro-inflammatory cytokines through blood-tissue causing their impaired integrity with subsequent tissue infiltration by leukocytes and cytokines [12]. Transcapillary fluid leakage resulting from endothelial barrier function disturbance or cell death leads to interstitial edema contributing to the life-threatening multi-organ failure [13, 14].

Prevention, treatment and minimization of the consequences of systemic inflammatory response syndrome is one of the main challenges in anesthesiology and intensive care. The presence of anti-inflammatory activity (i. e., the ability to inhibit the systemic inflammatory response syndrome) and, consequently, the ability to prevent endothelial dysfunction, is a beneficial «side effect» of some well-known drugs [15].

According to available experimental data lithium chloride possesses strong organoprotective properties, but their mechanisms, particularly for endothelial protection, remains unexplored.

The aim of the study was to evaluate the efficacy of lithium chloride for preventing damage to the monolayer of endothelial cells *in vitro* exposed to the serum of patients with septic shock.

Предупреждение, лечение и минимизация последствий синдрома системной воспалительной реакции является одной из основных задач анестезиологии и реаниматологии. Наличие противовоспалительной активности (т. е. способности тормозить развитие синдрома системной воспалительной реакции) и, как следствие, способность предотвращать развитие эндотелиальной дисфункции, является положительным побочным эффектом ряда известных препаратов [15].

По имеющимся на сегодняшний день экспериментальным данным хлорид лития обладает выраженными органопротекторными свойствами, но механизм реализации его защитных свойств и в особенности на функцию эндотелия остаются неизученными.

Цель исследования — изучить эффективность действия хлорида лития в качестве средства, предотвращающего повреждение монослоя эндотелиальных клеток *in vitro* под действием сыворотки пациентов с септическим шоком.

Материал и методы

Больных с развивающимся септическим шоком в количестве 5 человек отобрали в соответствии с критериями «Сепсис-3» (средний возраст 32,4 [25,6; 42,4]) [21]. Кровь для проведения экспериментов забирали в течение 2 часов после выявления септического шока. В качестве контрольной группы исследовали сыворотку крови практически здоровых доноров (5 человек), медиана возраста 35,6 [28,7; 45,0] лет. В каждой из групп было 3 мужчины и 2 женщины. Таким образом, в каждой серии опытов (в постановках с добавлением разной концентрации препарата, токсичной сыворотки) количество экспериментов составляло 5.

Эндотелиальные клетки Ea.hy926 растали в среде DMEM (Gibco, USA) с 10% телячьей эмбриональной сывороткой — FBS (HyClone, USA) до монослоя. Затем клетки инкубировали в течение 3 часов при 37°C с 5%-ной телячьей эмбриональной сывороткой (контроль), с сывороткой крови здорового человека, а также с сывороткой пациента с септическим шоком без хлорида лития и в его присутствии в конечных концентрациях 0,01 ммоль/л, 0,1 ммоль/л, 1 ммоль/л, 10 ммоль/л. Хлорид лития добавляли за 1 час до смены сывороток. После инкубации клетки промывали теплым раствором DMEM без сыворотки, а затем фиксировали 2%-ным раствором параформа и permeabilizovavali 1%-ным раствором Triton X-100. Фиксированные клетки окрашивали первичными антителами к VE-кадгерину (BD Biosciences, США), а затем инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем Oregon Green 488 (Life Technologies, США), а также с фаллоидином красным (Invitrogen, США) и красителем Hoechst 33342 (Life Technologies, США). Обработку изображений, полученных на флуоресцентном микроскопе, а также их количественный анализ проводили с помощью программ ImageJ 1.44p и MetaVue 4.6.

Materials and Methods

Five patients with progressive septic shock were selected according to «Sepsis-3» criteria (median age 32.4 [25.6; 42.4]) [21]. Blood for experiments was withdrawn within 2 hours after the diagnosis of septic shock. The sera samples from 5 healthy volunteers were used in the control group (median age 35.6 years [28.7; 45.0]). There were 3 men and 2 women in each group. Thus, each series of tests (with addition of various concentrations of the drug and toxic serum) had 5 experiments.

Endothelial cells Ea.hy926 were grown until monolayer formation in the DMEM medium (Gibco, USA) with 10% calf embryonic serum (CES, HyClone, USA). The cells were then incubated for 3 hours at 37°C with 5% CES (control), with healthy human serum, and with the serum of patient with septic shock without and with lithium chloride at final concentrations of 0.01 mmol/l, 0.1 mmol/l, 1 mmol/l, 10 mmol/l. Lithium chloride was added 1 hour before serum change. After incubation the cells were washed with warm DMEM solution without serum, and then fixed with 2% solution of paraformaldehyde and permeabilized with 1% solution of Triton X-100. The fixed cells were stained with primary antibodies to VE-cadherin (BD Biosciences, USA) and then incubated with secondary antibodies conjugated with fluorescent dye Oregon Green 488 (Life Technologies, USA), as well as with phalloidin red (Invitrogen, USA) and Hoechst 33342 dye (Life Technologies, USA). Processing of images obtained with a fluorescence microscope as well as their quantitative analysis was done using ImageJ 1.44p and MetaVue 4.6 software.

For western blotting, Ea.hy926 endothelial cells were grown and incubated in the same way as described above. After incubation, the cells were lysed in hot buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8; 2% SDS; 10% glycerin; 50 mM DTT, 0.01% bromophenol blue), incubated at +94°C for 4 minutes. The proteins were separated in 12% polyacrylamide gel and transferred to PVDF membranes. Antibodies to VE-cadherin and claudin (BD Biosciences, USA) as well as secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (BD Biosciences, USA) were used. Visualization was performed with SuperSignal West Pico (Thermo Scientific, USA) kit. Image Lab software (Bio-Rad, USA) was used for densitometric analysis.

For statistical analysis, the data were presented as mean values with standard deviations, or as medians and quartiles. The statistical significance of differences between quantitative variables was calculated using Mann-Whitney test whereas qualitative differences were evaluated using the χ^2 criterion. Prior to the statistical analysis, the distribution of variables was checked for normality using the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilks tests. The material was graphically presented as medians (lower quartile; upper quartile).

Results and Discussion

Incubation of endothelial cell monolayer with 5% toxic serum resulted in loss of adhesion contact protein, the VE-cadherin (fig. 1). Incubation of cells with patients' serum samples caused a decrease in the level of claudin, one of the main proteins of dense (closing) endothelial contacts. Toxic serum significantly altered the shape of cells: they lost the

Для проведения вестерн-блоттинга эндотелиальные клетки Ea.hy926 растяли и инкубировали так же, как описано выше. После инкубации клетки лизировали в горячем буфере (62,5 mM Трис-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 10% глицерин; 50 mM ДТТ, 0,01% бромфенолового синего) инкубировали при +94°C, 4 минуты. Белки разделяли в 12% поликариламидном геле и переносили на PVDF-мембранны. Использовали антитела к VE-кадгерину и клаудину (BD Biosciences, США), а также вторичные антитела, коньюгированные с пероксидазой хрина (BD Biosciences, США). Визуализацию проводили набором SuperSignal West Pico (Thermo Scientific, США). Для денситометрического анализа использовали программу Image Lab (BioRad, США).

В процессе статистического анализа полученные данные представляли в виде среднего со стандартными отклонениями, медианы и квартилей. Статистическую значимость различий количественных показателей рассчитывали с помощью теста Манна–Уитни, а качественных — с помощью критерия χ^2 . Предварительно, перед проведением статистического анализа определяли нормальность распределения признаков вариационном ряду с помощью критерия Колмогорова–Смирнова и теста Шапиро–Уилка. Графически материал представили как медиану (нижний квартиль; верхний квартиль).

Результаты и обсуждение

Инкубация монослоя эндотелиальных клеток с 5%-й токсической сывороткой приводила к потере белка адгезионных контактов VE-кадгерина (рис. 1). Также инкубация с сыворотками крови пациентов вызывала уменьшение количества клаудина, одного из главных белков плотных (замыкающих) контактов эндотелия. Токсическая сыворотка также изменяла форму клеток: они теряли нативную многоугольную форму, вытягивались, между ними образовывались проме-

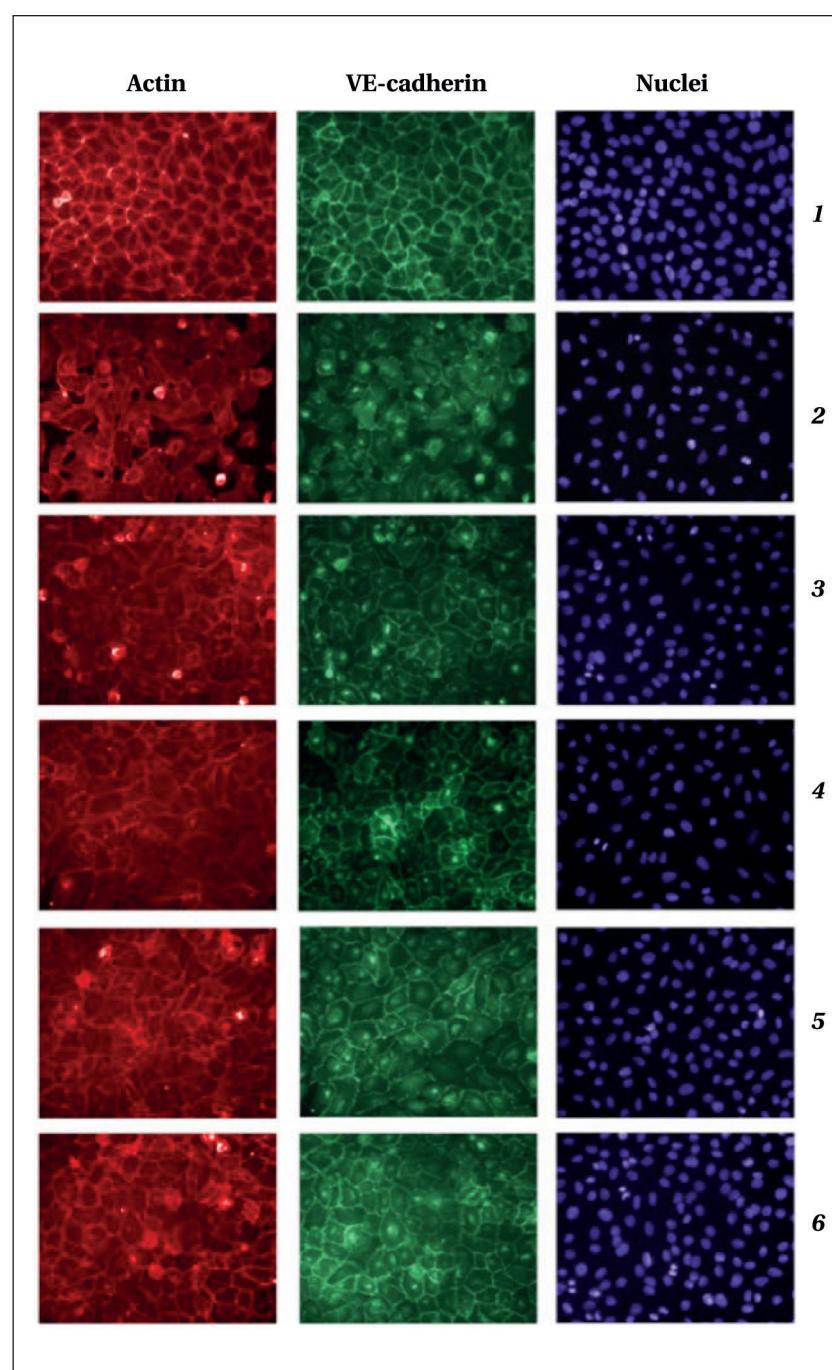


Рис. 1. Иммунофлуоресцентная микроскопия эндотелиальных клеток Ea.hy926, инкубированных с различными концентрациями хлорида лития (моль/л) и обработанных 5%-ной токсичной сывороткой.

Fig. 1. Immunofluorescent microscopy of Ea.hy926 endothelial cells incubated with various concentrations of lithium chloride (mmol/l) and treated with 5% toxic serum.
Note. Actin — cell staining for actin microfilaments; VE-cadherin — staining for the intercellular contact protein VE-cadherin; Nuclei — staining of the cell nuclei. 1 — control; 2 — toxic serum; 3 — toxic serum and lithium chloride 0.01 mmol/l; 4 — toxic serum and lithium chloride 0.1 mmol/l; 5 — toxic serum and lithium chloride 1.0 mmol/l; 6 — toxic serum and lithium chloride 10.0 mmol/l.

Примечание. Actin — окраска клеток на актиновые микрофильтры; VE-cadherin — окраска на белок межклеточных контактов VE-кадгерин; Nuclei — окраска ядер клеток. 1 — контроль; 2 — добавление токсичной сыворотки; 3 — добавление токсичной сыворотки и хлорида лития 0,01 ммоль/л; 4 — добавление токсичной сыворотки и хлорида лития 0,1 ммоль/л; 5 — добавление токсичной сыворотки и хлорида лития 1,0 ммоль/л; 6 — добавление токсичной сыворотки и хлорида лития 10,0 ммоль/л.

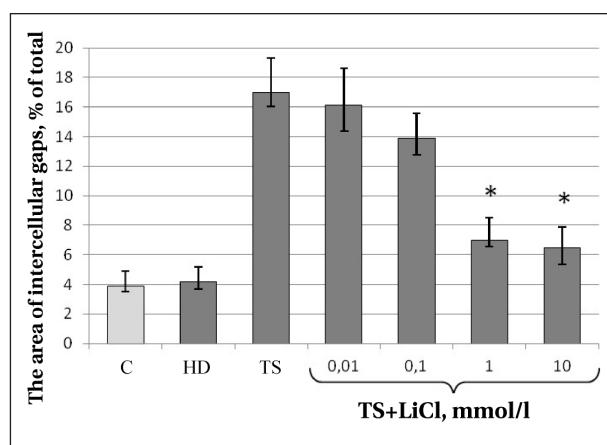


Рис. 2. Влияние различных концентраций хлорида лития на образование межклеточных промежутков монослоя эндотелиальных клеток под действием 5%-ой токсичной сыворотки.

Fig. 2. Effect of various concentrations of lithium chloride on the formation of intercellular gaps in the endothelial monolayer cells after exposure to 5% toxic serum.

Note. For Fig. 2-7: C — the control serum; HD — healthy donors' serum; TS — toxic serum; TS+LiCl — a combination of lithium chloride and toxic serum. The results are presented as mean values and standard deviation; * — $P<0.05$ vs C.

Примечание. The area of intercellular gaps, % of total — площадь межклеточных промежутков, % от общей площади. Для рис. 2-7: C — контрольная сыворотка FBS; HD — сыворотка доноров; TS — токсичная сыворотка; TS+LiCl, mmol/l — сочетание хлорида лития в указанных концентрациях с токсичной сывороткой. Результаты представлены в виде среднего значения со стандартным отклонением; * — $p<0,05$ по отношению к С.

жутки, поскольку разбирались еще и пучки периферических актиновых микрофиламентов. Такие изменения, прежде всего, характерны для эндотелиальной дисфункции, сопровождающейся нарушением межклеточных контактов. Подобные эффекты не наблюдали при инкубации с 5%-ной телячьей эмбриональной сывороткой (контроль) или 5%-ной сывороткой здоровых людей.

По данным иммунофлуоресцентной микроскопии, инкубация с хлоридом лития в концентрации 0,01 ммоль/л не предотвращала разборку клаудина (одного из главных белков плотных (замыкающих) контактов эндотелия), актина (основного белка цитоскелета) и VE-кадгерина (белка адгезионных контактов). Прединкубация с хлоридом лития в концентрации 0,1 ммоль/л статистически незначимо предотвращала разборку клаудина ($p>0,05$), но в более высоких концентрациях (1 ммоль/л, 10 ммоль/л) практически полностью защищала эндотелиальный монослой от разрушения межклеточных контактов под действием токсической сыворотки. Численный анализ данных микроскопии представили на рис. 2.

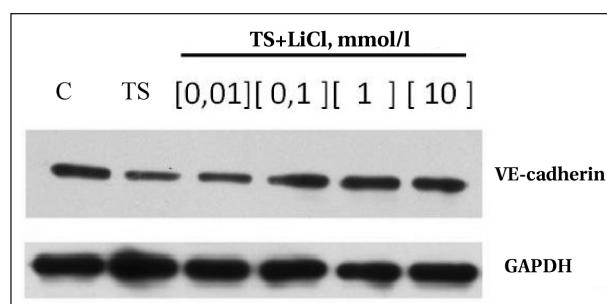


Рис. 3. Влияние различных концентраций хлорида лития на расщепление белка адгезивных контактов VE-кадгерина.

Fig. 3. Effect of various concentrations of lithium chloride on the cleavage of VE-cadherin adhesive contact protein.

Примечание. GAPDH — контрольный белок глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (ГАФД).

native polygonal shape, became elongated with gaps between them, as bundles of peripheral actin microfilaments were also dismantled. Such changes were considered as prime parameters of endothelial dysfunction accompanied by impaired intercellular contacts. These effects were not observed when cells were incubated with 5% CES (control) or 5% human serum from control volunteers.

According to immunofluorescence microscopy data, incubation with lithium chloride at a concentration of 0.01 mmol/l did not prevent cleavage of claudin (one of the main proteins of dense (closing) endothelial contacts), actin (the main protein of cytoskeleton) and VE-cadherin (the protein of adhesion contacts). Pre-incubation of cells with lithium chloride at concentration of 0.1 mmol/l insignificantly prevented cleavage of claudin ($P>0.05$), but in higher concentrations (1 mmol/l, 10 mmol/l) almost completely prevented endothelial monolayer from destruction of intercellular contacts after exposure to toxic serum. Quantitative analysis of microscopy data is shown in fig. 2.

Note. C — control serum; TS — toxic serum; C+LiCl — combination of lithium chloride and toxic serum; GAPDH — the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase control protein.

Western blotting was used to quantify protein changes in VE-cadherin intercellular contacts. Incubation with 5% toxic serum reduced the level of VE-cadherin in cellular lysates by about 50% (fig. 3). Incubation with lithium chloride protected against the protein cleavage after exposure to toxic serum in a dose-dependent mode. The graphic presentation of the results is given in fig. 4, a.

Western blotting was also used to quantify changes in the level of claudin, the dense contact protein. Incubation with lithium chloride also protected against the degradation of this protein after exposure to toxic serum in a dose-dependent mode. Graphical presentation of experiment is shown in fig. 4, b.

Для количественной оценки изменения белка межклеточных контактов VE-кадгерина использовали Вестерн-блоттинг. Инкубация с 5%-ной токсичной сывороткой примерно в половину уменьшала количество VE-кадгерина в клеточных лизатах (рис. 3). Инкубация с хлоридом лития защищала от расщепления этого белка под действием токсичной сыворотки в дозозависимом режиме. Количественный обсчет данных эксперимента привели на рис. 4, а.

Для количественной оценки изменения количества белка плотных контактов клаудина также использовали Вестерн-блоттинг. Инкубация с хлоридом лития также защищала от расщепления этого белка под действием токсичной сыворотки в дозозависимой режиме. Количественный обсчет данных эксперимента привели на рис. 4, б.

Хлорид лития в концентрации 0,01 ммоль/л не обладал протективным действием на эндотелий. Прединкубация с хлоридом лития в концентрации 0,1 ммоль/л не оказывала значительного эффекта, а в концентрациях 1 ммоль/л и 10 ммоль/л он оказывал выраженное протективное действие на эндотелий.

Поскольку киназа GSK-3 β является основной сигнальной молекулой, участвующей в повреждении многих типов клеток, включая эндотелиальные, исследовали действие токсичной сыворотки на уровень фосфорилирования данной киназы. Оказалось, что токсичная сыворотка практически не влияет на содержание фосфо-GSK-3 β через 5, 15, 30 минут и 1 час после действия сыворотки, но вызывает значительное, примерно на 60%, уменьшение содержания фосфо-GSK-3 β через 2 и 4 часа, что свидетельствовало об активации GSK-3 β при действии факторов крови из данной сыворотки на эндотелиальные клетки (рис. 5, а, б).

Параллельно с вышеописанным опытом изучили действие хлорида лития (1 ммоль/л) на динамику фосфорилирования GSK-3 β в эндотелиальных клетках. Обнаружили, что хлорид лития (1 ммоль/л) вызывал значительное повышение содержания фосфо-GSK-3 β уже через 15 мин после воздействия, и этот эффект сохранялся вплоть до 4 ч (рис. 5, а, б).

При моделировании защиты хлоридом лития клеток эндотелия от токсичной сыворотки обнаружили, что прединкубация с хлоридом лития длительностью 1 час, в концентрации 1 ммоль/л предотвращала инактивацию (дефосфорилирование) GSK-3 β и даже, наоборот, стимулировала ее фосфорилирование во временном интервале 1–4 часа после воздействия сыворотки (рис. 6).

Затем изучили действие различных концентраций лития хлорида (0,01 ммоль/л, 0,1 ммоль/л, 1 ммоль/л, 10 ммоль/л) на фосфори-

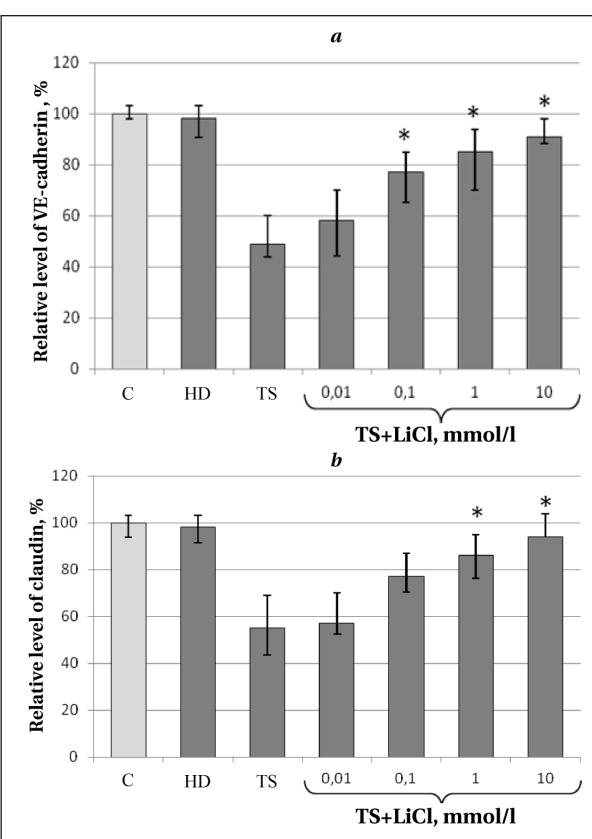


Рис. 4. Влияние различной концентрации хлорида лития на относительное содержание VE-кадгерина (а) и клаудина (б) в монослое эндотелиальных клеток, обработаных 5%-ной токсичной сывороткой.

Fig. 4. Effect of various concentrations of lithium chloride on the relative level of VE-cadherin (a) and claudin (b) in a monolayer of endothelial cells treated with 5% toxic serum.

Note. The results are presented as mean values with standard deviation. * — $P<0.05$ vs C

Примечание. Для рис. 4–7: relative level of — относительное содержание. Результаты представлены в виде среднего значения со стандартным отклонением. * — $p<0,05$ по отношению к С.

Lithium chloride at the concentration of 0.01 mmol/l had no protective effect on endothelium. Pre-incubation with lithium chloride at concentrations of 0.1 mmol/l had no significant effect, and in concentrations of 1 mmol/l and 10 mmol/l it provided a strong protective effect on endothelium.

Since GSK-3 β kinase is the main signal molecule involved in the damage of many cell types, including endothelial cells, we investigated the effect of toxic serum on the phosphorylation level of this kinase. Toxic serum was found to have practically no effect on the level of phospho-GSK-3 β 5, 15, 30 minutes and 1 hour after serum exposure, but it caused a significant decrease (by approx. 60%) in the level of phospho-GSK-3 β after 2 and 4 hours demonstrating the activation of GSK-3 β due to the influence of blood factors from this serum on endothelial cells (fig. 5, а, б).

In parallel with the above experience, the effect of lithium chloride (1 mmol/l) on the changes

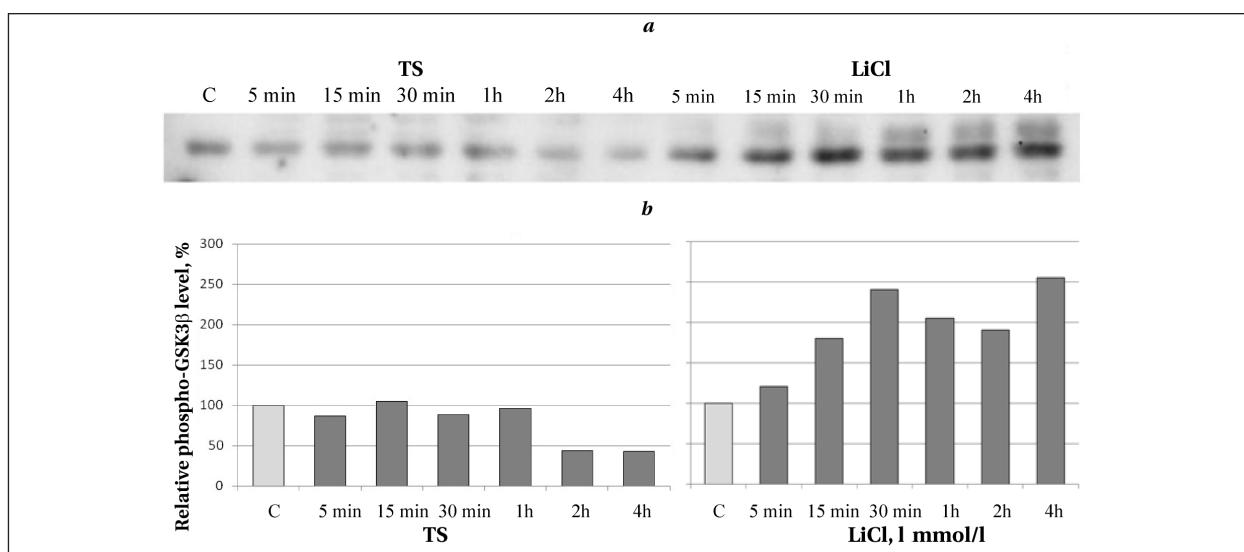


Рис. 5. Действие токсичной сыворотки и хлорида лития на фосфорилирование киназы GSK-3 β (Ser9) в клетках эндотелия (а). Качественный обсчет данных иммуноблота (б, в).

Fig. 5. Effects of toxic serum and lithium chloride on phosphorylation of GSK-3 β (Ser9) kinase in endothelial cells (a). Immunoblot data quantification (b, c).

Note. Data of immunoblot analysis for various time points after exposure of cells to toxic serum or lithium chloride are given. Fig. b, c: Y-direction shows % in relation to the total protein in cells.

Примечание. Приведены данные иммуноанализа различных временных точек после действия на клетки токсичной сыворотки или хлорида лития. Для рис. 5 б, в, 6 б, 7 б по оси ординат указан % относительно общего белка в клетках.

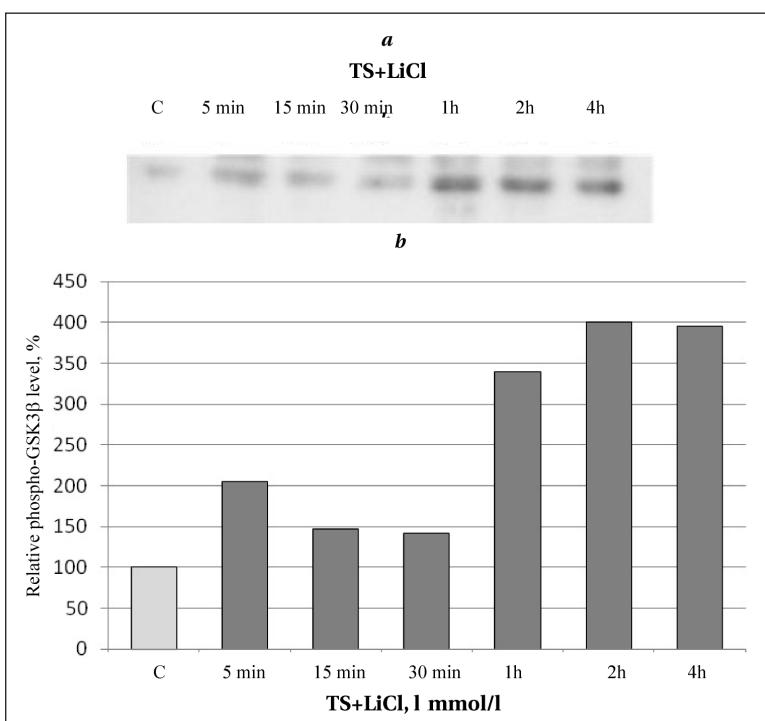


Рис. 6. Совместное действие токсичной сыворотки и хлорида лития на фосфорилирование киназы GSK-3 β в клетках эндотелия (а). Качественный обсчет данных иммуноблота (б).

Fig. 6. Joint action of toxic serum and lithium chloride (1 mmol/l) on phosphorylation of GSK-3 β kinase in endothelial cells (a). Immunoblot data quantification (b).

Note. Immunoblot analysis data for various time points after exposure of cells to lithium chloride (1 hour pre-incubation) and toxic serum (incubation time is shown above the immunoblot tracks).

Примечание. Приведены данные иммуноанализа различных временных точек после действия на клетки хлорида лития (1 час прединкубации) и токсичной сыворотки (время инкубации указано над дорожками иммуноблota).

in GSK-3 β phosphorylation in endothelial cells was studied. Lithium chloride (1 mmol/l) was found to have caused a significant increase in the level of GSK-3 β phosphorylation 15 min after exposure, and this effect persisted until up to 4 h (fig. 5, a, b).

When the lithium chloride-induced protection of endothelial cells from toxic serum was studied, pre-incubation with lithium chloride at a concentration of 1 mmol/l for 1 hour not only prevented the inactivation (dephosphorylation) of GSK-3 β but stimulated its phosphorylation during 1–4 hours after serum exposure (fig. 6).

We then studied the effects of lithium chloride in various concentrations (0.01 mmol/l, 0.1 mmol/l, 1 mmol/l, 10 mmol/l) on GSK-3 β phosphorylation. Endothelial cells were pre-incubated for 30 minutes with lithium chloride in specified concentrations and then exposed to toxic serum. Two hours after the incubation, the immunoblot analysis was processed. The results of the experiment are presented in fig. 7, a, and graphic representation of data is shown in fig. 7, b. Lithium chloride was found to prevent GSK-3 β dephosphorylation in all studied con-

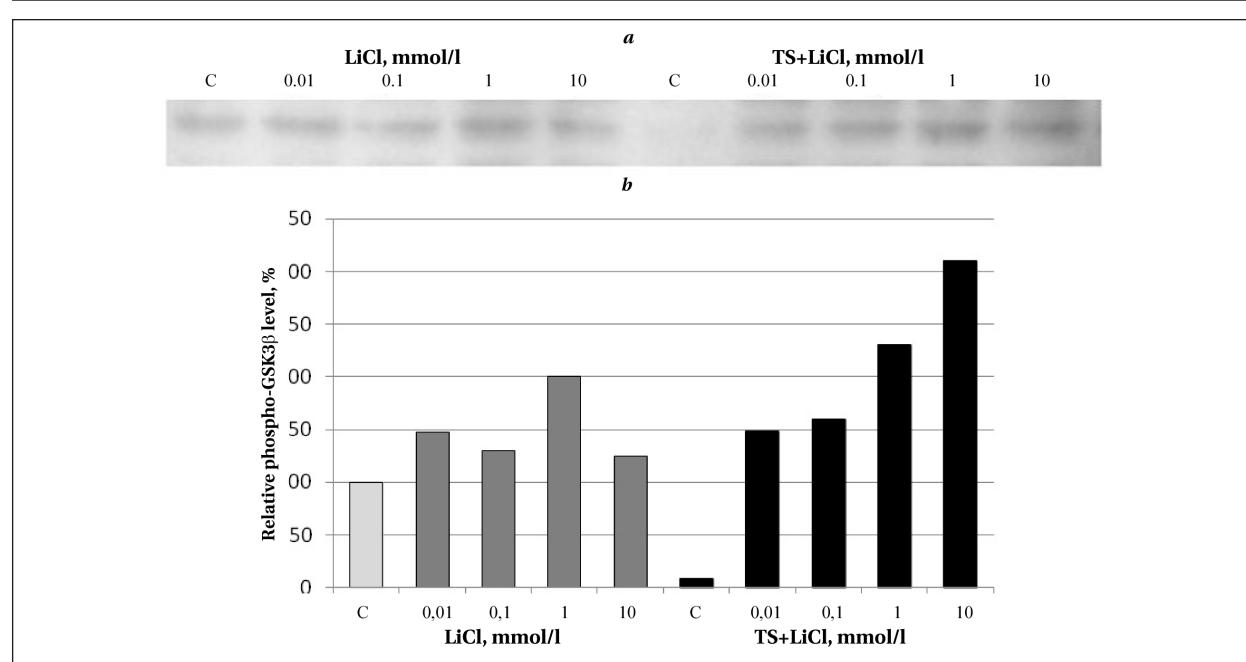


Рис. 7. Совместное действие токсичной сыворотки и хлорида лития (предобработка 30 мин) на фосфорилирование киназы GSK-3 β в клетках эндотелия (а). Количественный обсчет данных иммуноблота (б).

Fig. 7. Joint action of toxic serum and pretreatment with lithium chloride (pre-treatment for 30 min) on phosphorylation of GSK-3 β kinase in endothelial cells (a). Quantitative immunoblot data analysis (b).

Note. The data of immunoblot analysis after 2 hours of incubation with toxic serum are presented.

Примечание. Приведены данные иммуноблот-анализа после 2-часовой инкубации с токсичной сывороткой.

лирование GSK-3 β . Клетки эндотелия прединкубировали 30 минут с указанными концентрациями хлорида лития, а затем на них воздействовали токсичной сывороткой. Через два часа инкубации проводили иммуноблот-анализ. Результаты опыта представили на рис. 7, а, а количественный обсчет — на рис. 7, б. Обнаружили, что лития хлорид предотвращал дефосфорилирование GSK-3 β во всех исследованных концентрациях, при этом при увеличении концентрации хлорида лития наблюдали дозозависимое повышение уровня фосфорилирования GSK-3 β .

До настоящего времени действие хлорида лития изучалось в основном лишь на постмитотических органах: головной мозг, миокард, почечный эпителий. Известно, что различные цитокины воспаления, например, TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) вызывают расщепление VE-кадгерина — эндотелиального белка адгезионных контактов [17]. Также при действии подобных провоспалительных агентов происходит деградация белков плотных контактов, например, клаудина. Протеолиз этих важнейших белков межклеточных контактов вызывает образование промежутков между клетками, что приводит к увеличению проницаемости и нарушению барьера функции эндотелия. В крайних случаях может развиться эндотелиальная дисфункция, которая в настоящее время считается одним из основных

concentrations, and the dose-dependent increase of GSK-3 β phosphorylation was observed when lithium chloride concentration was increased.

So far, the action of lithium chloride has been studied using the postmitotic organs such as brain, myocardium, kidney epithelium. It is known that different cytokines of inflammation, e.g. TNF- α (tumor necrosis factor α) cause the cleavage of VE-cadherin, the endothelial protein of adhesion contacts [17]. Also, such pro-inflammatory agents cause degradation of dense contact proteins, e. g., claudin. Proteolysis of these important intercellular contact proteins results in the formation of gaps between cells, which leads to increased permeability and impaired endothelial barrier function. In extreme cases, endothelial dysfunction may develop, which is currently considered to be one of the main factors of multi-organ failure in sepsis and septic shock [18].

The present study has shown that lithium chloride is capable of preventing cleavage of claudin, actin and VE-cadherin in intercellular contacts of Ea.hy926 endothelial cells caused by exposure to the toxic serum from patients with septic shock. To date, the mechanisms of lithium chloride action on endothelial cells have not been clarified. In this regard, we consider important our data on the protection of endothelial intercellular contacts through phosphorylation of the enzyme GSK-3 β . The importance of the enzyme GSK-3 β inactivation is well known today: by preventing mitochondrial

факторов развития полиорганной недостаточности при сепсисе и септическом шоке [18].

В настоящем исследовании показали, что хлорид лития способен предотвращать разборку клаудина, актина и VE-кадгерина в межклеточных контактах эндотелиальных клеток линии Ea.hy 926, вызванную действием токсичной сыворотки, полученной от пациентов с септическим шоком. На сегодняшний день механизмы действия хлорида лития на эндотелиальные клетки остаются неизученными. В этой связи, нам представляется важными экспериментальные данные о защите эндотелиальных межклеточных контактов через фосфорилирование фермента GSK-3 β , которые были получены на модели воспаления в головном мозге. На сегодняшний день хорошо известно значение инактивации фермента GSK-3 β , которая, предотвращая открытие митохондриальной поры, защищает постмитотические клетки от ишемии/реперфузии [19, 20].

В работе коллектива авторов в 2013 году под руководством Persydsky Y. [21] было показано, что фосфорилирование фермента GSK-3 β приводит к увеличению времени жизни белков плотных межклеточных контактов (в результате увеличения времени полураспада на 38 и 43% соответственно), обеспечивающих целостность эндотелиального барьера. Таким образом, появились серьезные основания считать, что, фосфорилирование GSK-3 β — это один из путей, регулирующих сосудистую проницаемость. А полученные ранее убедительные данные о фосфорилировании GSK-3 β в ткани почек хлоридом лития в дозе 30 мг/кг [20], в ткани миокарда [21] и головном мозге [6, 22] экспериментальных животных позволяют предположить о наличии механизма реализации защитных эффектов хлорида лития на эндотелий через влияние на GSK-3 β .

Заключение

В результате выполнения настоящей работы, гипотеза о реализации защитных эффектов хлорида лития на эндотелий через GSK-3 β получила свое предварительное подтверждение: обнаружили, что токсичная сыворотка подавляла фосфорилирование GSK-3 β и переводила фермент в активную форму, а хлорид

pore opening it protects postmitotic cells from ischemia/reperfusion [19, 20].

In a paper by Persydsky Y. et al. (2013) [21], phosphorylation of GSK-3 β enzyme was shown to cause an increase in the life span of dense intercellular contact protein (as a result of the increase in half-life by 38% and 43%, respectively), ensuring the integrity of the endothelial barrier. Thus, there are good reasons to consider the phosphorylation of GSK-3 β as one of the signaling mechanisms regulating vascular permeability. Moreover, the earlier data on GSK-3 β phosphorylation by lithium chloride at a dose of 30 mg/kg in kidney tissue [20], in myocardial tissue [21] and in brain tissue [6, 22] of experimental animals support mechanistic links of GSK-3 β phosphorylations and protective effects of lithium chloride on endothelium.

Conclusion

Therefore, our study has provided an initial rationale for the hypothesis on mediation of protective effects of lithium chloride on endothelium through GSK-3 β . The toxic serum was observed to inhibit phosphorylation of GSK-3 β and to convert the enzyme into an active form, while lithium chloride, on the contrary, increased phosphorylation (inactivation) of GSK-3 β and, most importantly, even prevented dephosphorylation of GSK-3 β caused by toxic serum. However, it remains unclear whether this mechanism is working *in vivo*. Notably, even at minimal concentrations (0.01 mmol/l) lithium chloride prevented the toxic serum-induced inhibition of GSK-3 β phosphorylation, which is generally a dose-dependent process.

лития, наоборот, увеличивал фосфорилирование (инактивацию) GSK-3 β , и, что более важно, предотвращал вызванное токсичной сывороткой уменьшение фосфорилирования GSK-3 β . Тем не менее, остается неясным, реализуется ли такой механизм *in vivo*. Важно отметить, что даже в минимальных концентрациях (0,01 ммоль/л) хлорид лития предотвращал вызванное токсичной сывороткой ингибирование фосфорилирования GSK-3 β , имея, в целом, выраженный дозозависимый характер.

Литература

- Baldessarini R.J., Tondo L., Davis P., Pompili M., Goodwin EK, Hennen J. Decreased risk of suicides and attempts during long-term lithium treatment: a meta-analytic review. *Bipolar Disord.* 2006; 8: 625–629. DOI: 10.1111/j.1399-5618.2006.00344.x. PMID: 17042835
- Moroz V.V., Silachev D.N., Plotnikov E.Yu., Zorova L.D., Pevzner I.B., Grebenchikov O.A., Likhvantsev V.V. 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. DOI: 10.15360/1813-9779-2013-1-63

References

- Baldessarini R.J., Tondo L., Davis P., Pompili M., Goodwin EK, Hennen J. Decreased risk of suicides and attempts during long-term lithium treatment: a meta-analytic review. *Bipolar Disord.* 2006; 8: 625–629. DOI: 10.1111/j.1399-5618.2006.00344.x. PMID: 17042835
- Moroz V.V., Silachev D.N., Plotnikov E.Yu., Zorova L.D., Pevzner I.B., Grebenchikov O.A., Likhvantsev V.V. Mechanisms of cell damage and protection in ischemia/reperfusion and experimental rationale for the use of lithium-based preparations in anesthesiology. *General Reanimatology=Obshchaya Reanimatologiya.* 2013; 9 (1): 63–72 [In Russ.]. DOI: 10.15360/1813-9779-2013-1-63

Experimental Studies

3. Juhaszova M., 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
4. Faghihi M., Mirershadi F., Dehpour A.R., Bazargan M. Preconditioning with acute and chronic lithium administration reduces ischemia/reperfusion injury mediated by cyclooxygenase not nitric oxide synthase pathway in isolated rat heart. *Eur. J. Pharmacol.* 2008; 597: 57–63. DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.08.010. PMID: 18789320
5. 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
6. Островы И.В., Гребенчиков О.А., Голубева Н.В. Нефропротективное 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
7. 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
8. Qin L., Wu X., Block M.L., Liu Y., Breese G.R., Hong J-S., Knapp D.J., Crews FT. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007; 55 (5): 453–462. DOI: 10.1002/glia.20467. PMID: 17203472
9. 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. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.08.006. PMID: 17884256
10. 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
11. Féletalou M., Vanhoutte P. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006; 291 (3): H985–H1002. DOI: 10.1152/ajpheart.00292.2006. PMID: 16632549. PMID: 16632549
12. Hughes C.G., Patel M.B., Pandharipande P.P. Pathophysiology of acute brain dysfunction: what's the cause of all this confusion? *Curr. Opin. Crit. Care*. 2012; 18 (5): 518–526. DOI: 10.1097/MCC.0b013e328357effa. PMID: 22941208
13. Hirase T., Node K. Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2012; 302 (3): H499–H505. DOI: 10.1152/ajpheart.00325.2011. PMID: 22081698
14. Opal S., van der Poll T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J. Intern. Med.* 2014; 277 (3): 277–293. DOI: 10.1111/joim.12331. PMID: 25418337
15. Pearson T.A., Mensah G.A., Alexander R.W., Anderson J.L., Cannon R.O. 3rd, Criqui M., Fadl Y.Y., Fortmann S.P., Hong Y., Myers G.L., Rifai N., Smith S.C. Jr., Taubert K., Tracy R.P., Vinicor F.; Centers for Disease Control and Prevention; American Heart Association. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003; 107 (3): 499–511. DOI: 10.1161/01.CIR.0000052939.59093.45. PMID: 12551878
16. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.D., Coopersmith C.M., Hotchkiss R.S., Levy M.M., Marshall J.C., Martin G.S., Opal S.M., Rubenfeld G.D., van der Poll T., Vincent J.L., Angus D.C. The Third International Consensus definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315 (8): 801–810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287
17. Galkin I.I., Pletjushkina O.Y., Zinovkin R.A., Zakharova V.V., Birjukov I.S., Chernyak B.V., Popova E.N. Mitochondria-targeted antioxidants prevent TNF α -induced endothelial cell damage. *Biochemistry (Mosc)*. 2014; 79: 124–130. DOI: 10.1134/S0006297914020059
18. Polat G., Ugan R.A., Cadirci E., Halici Z. Sepsis and Septic Shock: Current Treatment Strategies and New Approaches. *Eurasian J Med*. 2017; 49: 53–58. DOI: 10.5152/eurasianjmed.2017.17062. PMID: 28416934
19. Abello P.A., Fidler S.A., Bulkley G.B., Buchman T.G. Antioxidants modulate induction of programmed endothelial cell death (apoptosis) by endotoxin. *Arch Surg*. 1994; 129 (2): 134–140. DOI: 10.1001/archsurg.1994.01420260030003. PMID: 8304825
20. Plotnikov E.Y., Babenko V.A., Pevzner I.B., Zorova L.D., Likhvantsev V.V., Zorova D.B. Nephroprotective effect of GSK-3beta inhibition by lithium ions and mu-opioid receptor agonist dalargin on gentamicin-induced nephrotoxicity. *Toxicology Letters Journal*. 2013; 220: 303–308. DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.04.023
21. Борисов К.Ю., Мороз В.В., Гребенчиков О.А., Плотников Е.Ю., Левиков Д.И., Черпаков Р.А., Лихванцев В.В. Влияние пропофола на анестетическое прекондиционирование миокарда севофлураном
3. Juhaszova M., 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
4. Faghihi M., Mirershadi F., Dehpour A.R., Bazargan M. Preconditioning with acute and chronic lithium administration reduces ischemia/reperfusion injury mediated by cyclooxygenase not nitric oxide synthase pathway in isolated rat heart. *Eur. J. Pharmacol.* 2008; 597: 57–63. DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.08.010. PMID: 18789320
5. Grebenchikov O.A., Lobanov A.V., Shajhutdinova E.R., Kuzovlev A.N., Ershov A.V., Likhvantsev V.V. Cardioprotective properties of lithium chloride in a rat myocardial infarction model. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya*. 2019; 23 (2): 43–49 [In Russ.]. DOI: 10.21688/1681-3472-2019-2-43-49
6. Ostrova 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 [In Russ.]. DOI: 10.15360/1813-9779-2019-3-73-82
7. 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
8. Qin L., Wu X., Block M.L., Liu Y., Breese G.R., Hong J-S., Knapp D.J., Crews FT. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007; 55 (5): 453–462. DOI: 10.1002/glia.20467. PMID: 17203472
9. 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. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.08.006. PMID: 17884256
10. 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
11. Féletalou M., Vanhoutte P. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006; 291 (3): H985–H1002. DOI: 10.1152/ajpheart.00292.2006. PMID: 16632549. PMID: 16632549
12. Hughes C.G., Patel M.B., Pandharipande P.P. Pathophysiology of acute brain dysfunction: what's the cause of all this confusion? *Curr. Opin. Crit. Care*. 2012; 18 (5): 518–526. DOI: 10.1097/MCC.0b013e328357effa. PMID: 22941208
13. Hirase T., Node K. Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2012; 302 (3): H499–H505. DOI: 10.1152/ajpheart.00325.2011. PMID: 22081698
14. Opal S., van der Poll T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J. Intern. Med.* 2014; 277 (3): 277–293. DOI: 10.1111/joim.12331. PMID: 25418337
15. Pearson T.A., Mensah G.A., Alexander R.W., Anderson J.L., Cannon R.O. 3rd, Criqui M., Fadl Y.Y., Fortmann S.P., Hong Y., Myers G.L., Rifai N., Smith S.C. Jr., Taubert K., Tracy R.P., Vinicor F.; Centers for Disease Control and Prevention; American Heart Association. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003; 107 (3): 499–511. DOI: 10.1161/01.CIR.0000052939.59093.45. PMID: 12551878
16. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.D., Coopersmith C.M., Hotchkiss R.S., Levy M.M., Marshall J.C., Martin G.S., Opal S.M., Rubenfeld G.D., van der Poll T., Vincent J.L., Angus D.C. The Third International Consensus definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315 (8): 801–810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287
17. Galkin I.I., Pletjushkina O.Y., Zinovkin R.A., Zakharova V.V., Birjukov I.S., Chernyak B.V., Popova E.N. Mitochondria-targeted antioxidants prevent TNF α -induced endothelial cell damage. *Biochemistry (Mosc)*. 2014; 79: 124–130. DOI: 10.1134/S0006297914020059
18. Polat G., Ugan R.A., Cadirci E., Halici Z. Sepsis and Septic Shock: Current Treatment Strategies and New Approaches. *Eurasian J Med*. 2017; 49: 53–58. DOI: 10.5152/eurasianjmed.2017.17062. PMID: 28416934
19. Abello P.A., Fidler S.A., Bulkley G.B., Buchman T.G. Antioxidants modulate induction of programmed endothelial cell death (apoptosis) by endotoxin. *Arch Surg*. 1994; 129 (2): 134–140. DOI: 10.1001/archsurg.1994.01420260030003. PMID: 8304825
20. Plotnikov E.Y., Babenko V.A., Pevzner I.B., Zorova L.D., Likhvantsev V.V., Zorova D.B. Nephroprotective effect of GSK-3beta inhibition by lithium ions and mu-opioid receptor agonist dalargin on gentamicin-induced nephrotoxicity. *Toxicology Letters Journal*. 2013; 220: 303–308. DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.04.023
21. Борисов К.Ю., Мороз В.В., Гребенчиков О.А., Плотников Е.Ю., Левиков Д.И., Черпаков Р.А., Лихванцев В.В. Влияние пропофола на анестетическое прекондиционирование миокарда севофлураном

- ном в эксперименте. *Общая реаниматология*. 2013; 9 (4): 30–33. DOI: 10.15360/1813-9779-2013-4-30
22. Шевелев О.А., Петрова М.В., Сайдов Ш.Х., Ходорович Н.А., Прадхан П. Механизмы нейропротекции при перебральной гипотермии (обзор). *Общая реаниматология*. 2019; 15 (6): 94–114. DOI: 10.15360/1813-9779-2019-6-94-114
- Reanimatology=Obshchaya Reanimatologiya*. 2013; 9 (4): 30-33 [In Russ.]. DOI: 10.15360/1813-9779-2013-4-30
22. Shevelev O.A., Petrova M.V., Saidov S.K., Khodorovich N.A., Pradkhan P. Neuroprotection Mechanisms in Cerebral Hypothermia (Review). *General Reanimatology=Obshchaya Reanimatologiya*. 2019; 15 (6): 94-114. [In Russ.]. DOI: 10.15360/1813-9779-2019-6-94-114

Поступила 08.03.2020

Received 08.03.2020