

## ВЛИЯНИЕ АНЕСТЕТИКА СЕВОФЛУРАНА НА НЕЙТРОФИЛЫ ЧЕЛОВЕКА

Даниил Олегович Старостин<sup>1</sup>, Владимир Терентьевич Долгих<sup>2,3</sup>,  
Артём Николаевич Кузовлев<sup>3</sup>, Олег Александрович Гребенчиков<sup>4</sup>

<sup>1,2,3,4</sup>НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии, Москва, Россия

<sup>1</sup>starostin\_daniil@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5069-6080>

<sup>2</sup>prof\_dolgih@mail.ru<sup>2,3</sup>, <https://orcid.org/0000-0001-9034-4912>

<sup>3</sup>artem\_kuzovlev@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5930-0118>

<sup>4</sup>oleg.grebenchikov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9045-6017>

**Аннотация. Цель** – изучить влияние севофлурана на функциональное состояние нейтрофилов в норме и патологии. **Материалы и методы.** Исследование провели на культуре нейтрофилов, выделенных из венозной крови доноров. Экспозицию нейтрофилов проводили с 0,5, 1,0 и 1,5 минимальной альвеолярной концентрацией севофлурана, оценивая влияние анестетика на их активацию. Интенсивность апоптоза оценивали с помощью аннексина V и йодистого пропидия. Активацию нейтрофилов липополисахаридом и пептидом хемотаксиса N-формил-метионин-лейцин-фенилаланина определяли по уровню экспрессии маркеров дегрануляции нейтрофилов – CD11b и CD66b, интерлейкина-1 $\beta$ , интерлейкина-6, интерлейкина-8 – и фосфорилированию гликоген-синтазы-киназы-3 $\beta$ . Статистическая обработка выполнялась с использованием математико-статистических методов расчета основных характеристик выборочных распределений (среднее арифметическое, стандартное отклонение, критерий Стьюдента, непараметрические методы) с использованием среды Windows и пакета компьютерной программы Statistica 10.0. **Результаты.** Инкубация нейтрофилов с липополисахаридом (200 нг/мл) и N-формил-метионин-лейцин-фенилаланином (100 нМ) статистически значимо повышала более чем в 2 раза экспрессию молекул CD11b и CD66b, а экспозиция севофлурана в дозе 1,5 минимальной альвеолярной концентрации снижала противовоспалительную активацию нейтрофилов под действием липополисахарида. Стимуляция нейтрофилов липополисахаридом сопровождалась дефосфорилированием гликогенсинтазинкиназа 3 бетта (GSK-3 $\beta$ ), а экспозиция с 1,5 минимальной альвеолярной концентрации севофлурана – способствовала ее фосфорилированию. Отмечено, что фосфорилирование гликоген-синтазы-киназы-3 $\beta$  в нейтрофилах под действием севофлурана снижает экспрессию CD11b и CD66b.

**Ключевые слова:** севофлуран, нейтрофилы, воспаление

**Шифр специальности:** 3.3.3. Патологическая физиология.

**Для цитирования:** Старостин Д. О., Долгих В. Т., Кузовлев А. Н., Гребенчиков О. А. Влияние анестетика севофлурана на нейтрофилы человека // Вестник СурГУ. Медицина. 2022. № 1 (51). С. 80–85. DOI 10.34822/2304-9448-2022-1-80-85.

### ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофилы – клетки крови, участвующие в формировании неспецифической резистентности организма, реагирующие на флогогенные факторы и быстро мигрирующие в очаг воспаления [1]. Они составляют 43–65 % ядросодержащих клеток периферической крови. Созревание нейтрофилов контролируется совокупностью сигнальных молекул, основным является гранулоцитарный колониестимулирующий фактор. Ключевым этапом в созревании нейтрофилов является формирование гранул, содержимое которых (различные ферменты, антимикробные катионные пептиды и др.) играет важную роль в неспецифической иммунной защите организма и развитии воспаления [2]. Помимо нейтрофилов, циркулирующих в сосудистом русле, в костном мозге содержится пул нейтрофилов, которые «выходят» в кровоток в ответ на стимулы, ассоциированные с инфекционным процессом или по-

вреждением тканей [1]. Выход нейтрофилов в кровоток и их активация наблюдается как при инфекционном, так и при асептическом воспалении [3].

У пациентов, находящихся в критическом состоянии, воспаление также может быть ключевым патогенетическим фактором повреждения тканей и прогрессирования полиорганной дисфункции [4], поэтому терапия, направленная на нормализацию функции нейтрофилов, может быть целесообразной у такой категории пациентов. Маркерами активации нейтрофилов служат белки CD11b и CD66b [5] и фосфорилированная киназа гликогенсинтазы-киназы 3 $\beta$  (фосфо-GSK-3 $\beta$ ). В настоящее время открыто большое количество нейтрофильных факторов, влияющих на возбудителей инфекции, компоненты иммунной системы. И тем не менее большая часть антимикробных препаратов характеризуется недостаточной избирательностью, раз-

витием нейтропении и иммуносупрессии вследствие подавления функции нейтрофилов [6].

Севофлуран, как ингаляционный анестетик, оказывает положительное влияние на функции нейтрофилов при критических состояниях [7–9], снижая выраженность воспалительного процесса и оксидативного стресса у пациентов после оперативных вмешательств [10]. К сожалению, на сегодня отсутствуют исследования по использованию анестетика севофлурана с целью коррекции воспалительных процессов у пациентов, находящихся в критическом состоянии.

**Цель** – изучить влияние севофлурана на функциональное состояние нейтрофилов в норме и патологии.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили нейтрофилы, выделенные из венозной крови здоровых мужчин в возрасте от 25 до 34 лет. В гепаринизированной крови осаждали эритроциты, а плазму наслаивали на фиколл с плотностью 1,077 г/мл, центрифугировали при 400 г в течение 30 мин и удаляли супернатант. Все дальнейшие процедуры проводили на льду с использованием охлажденных растворов. Эритроциты удаляли с помощью ресуспендирования осадка в 2 мл деионизированной стерильной воды в течение 45 сек, добавляли 2 мл 2-кратного фосфатно-солевого буфера (PBS) для восстановления тоничности и центрифугировали при 200 г и температуре 4 °C в течение 10 мин. Осажденные нейтрофилы промывали PBS и ре-

суспандировали в культуральной среде (RPMI-1640 + 10 % FBS) [11]. Выделенные нейтрофилы на 30 мин помещали в инкубатор, куда подавали воздушную смесь, содержащую различные концентрации севофлурана: 0,5 минимальной альвеолярной концентрации (МАК) (1 об. %); 1,0 МАК (2,0 об. %) и 1,5 МАК (3,0 об. %).

Активацию нейтрофилов осуществляли путем инкубации с липополисахаридом (LPS) и пептидом хемотаксиса N-формил-метионин-лейцин-фенилаланином (fMLP) и оценивали ее по уровню экспрессии маркеров дегрануляции нейтрофилов – CD11b и CD66b, интерлейкина-1 $\beta$ , интерлейкина-6, интерлейкина-8 – и фосфорилированию гликоген-синтазы-киназы-3 $\beta$ . После инкубации с LPS нейтрофилы лизировали в горячем буфере (62,5 мМ Tris-HCl, pH 6,8; 2 % SDS; 10 % глицерина; 50 мМ дитиотреитола (ДТТ), 0,01 % бромфенолового синего) в течение 4 мин при 94 °C. Белки разделяли в 12 %-м полиакриламидном геле и переносили на PVDF-мембраны (Amersham, США). Далее 5 %-й бычий сывороточный альбумин (БСА) в буфере трансферрин бычьей сыворотки (ТБСТ) (25мМ Tris pH 7,4, 0,15М NaCl, 0,1 % Tween20) блокировали сайты неспецифического связывания. Затем мембраны инкубировали при температуре 4 °C с антителами в 5 %-м растворе БСА, в ТБСТ мембраны инкубировали в течение 1 ч. Визуализацию проводили набором SuperSignal West Pico (ThermoFisher, США) с помощью геле-документирующей системы Bio-Rad ChemiDocTM Touch. Уровень активации нейтрофилов оценивали

Original article

## SEVOFLURANE EFFECT ON HUMAN NEUTROPHILS

Daniil O. Starostin<sup>1</sup>, Vladimir T. Dolgikh<sup>2</sup>, Artem N. Kuzovlev<sup>3</sup>, Oleg A. Grebenchikov<sup>4</sup>

<sup>1,2,3,4</sup>V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation, Moscow, Russia

<sup>1</sup>starostin\_daniil@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5069-6080>

<sup>2</sup>prof\_dolgih@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9034-4912>

<sup>3</sup>artem\_kuzovlev@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5930-0118>

<sup>4</sup>oleg.grebenchikov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9045-6017>

**Abstract. The study aims** to analyze the effect of sevoflurane on human neutrophils under normal and pathological conditions. **Materials and methods.** In the course of the research, the culture of neutrophils isolated from venous blood of donors was studied. The exposure of neutrophils was carried out with the minimal alveolar concentration of sevoflurane of 0.5, 1.0 and 1.5, evaluating the anesthetic effect on their activation. The apoptosis intensity was assessed using annexin V and propidium iodide. Neutrophils activation with lipopolysaccharide and chemotaxis peptide N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine was determined by the level of expression of neutrophil degranulation markers CD11b and CD66b, interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, interleukin-8 and phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . The statistical processing was carried out using math-and-stats methods of calculation of the basic measures of sampling distribution (arithmetic average, standard deviation, Student criterion, nonparametric methods), using Windows and Statistica 10.0 package. **Results.** Neutrophils incubation with lipopolysaccharide (200 ng/ml) and N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine (100 nM) statistically doubled the expression of CD11b and CD66b molecules, but the exposure to sevoflurane at the minimal alveolar concentration dose of 1.5 reduced the anti-inflammatory activation of neutrophils under the influence of lipopolysaccharide. Stimulation of neutrophils with lipopolysaccharide was accompanied with dephosphorylation of GSK-3 $\beta$ , and the exposure to the minimal alveolar concentration of sevoflurane of 1.5 contributed to its phosphorylation. It is noted that phosphorylation of GSK-3 $\beta$  in neutrophils reduces the expression of CD11b and CD66b under the influence of sevoflurane.

**Keywords:** sevoflurane, neutrophils, inflammation

**Code:** 3.3.3. Pathophysiology.

**For citation:** Starostin D. O., Dolgikh V. T., Kuzovlev A. N., Grebenchikov O. A. Sevoflurane Effect on Human Neutrophils // Vestnik SurGU. Medicina. 2022. No. 1 (51). P. 80–85. DOI 10.34822/2304-9448-222-1-80-85.

по увеличению на их поверхности молекул CD11b и CD66b с помощью проточной цитофлуориметрии, которую проводили после инкубирования образцов клеток с LPS в течение 30 мин при 37 °C и добавления 2,5 мкл антител к CD11b, конъюгированных с флуоресцентным красителем FITC (ThermoFisher, США), а также 0,5 мкл антител к CD66b, конъюгированных с флуоресцентным красителем AlexaFluor647 (ThermoFisher, США), и инкубирования на льду в течение 30 мин. Анализировали 50 тысяч клеток с помощью проточного цитофлуориметра Beckman Coulter CytoFLEX.

Апоптоз нейтрофилов оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии. Нейтрофилы инкубировали с LPS и fMLP в течение 22 ч при 37 °C в увлажненном CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Далее клетки центрифугировали при 400 g в течение 5 мин и ресуспендировали осадок в 70 мкл буфера (10 mM HEPES, 120 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH = 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 °C. После добавляли PI до конечной концентрации 10 мкг/мл, инкубировали еще 5 мин, после чего анализировали 50 тысяч клеток с помощью проточного цитофлуориметра Beckman Coulter CytoFLEX. Апоптотическими считали аннексин-V-положительные и PI-отрицательные клетки.

Иммуноферментный анализ (ИФА) осуществляли с помощью реагентов для определения концентрации анализируемых цитокинов в среде культивации нейтрофилов (Вектор-Бест, Россия). Образцы сывороток очищали центрифугированием при 400 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Для проведения анализа во все лунки стрипов используемых планшетов вносили по 100 мкл раствора для разведения образцов (PPO). Далее вносили в соответствующие лунки в дублях по 100 мкл каждого калибровочного образца и по 100 мкл контрольного образца, а в остальные лунки вносили в дублях по 100 мкл анализируемых образцов сывороток крови. Планшеты заклеивали пленкой и инкубировали 2 ч при встряхивании на шейкере при 37 °C и 700 об/мин. После удаления пленки для промывки и удаления остатков жидкости во все лунки

вносили по 100 мкл конъюгата № 1. После повторной инкубации и промывки во все лунки вносили по 100 мкл конъюгата № 2. После третьей инкубации и промывки во все лунки вносили по 100 мкл ТМБ и инкубировали в защищенном от света месте в течение 25 мин при комнатной температуре, после чего во все лунки внесли по 100 мкл стоп-реагента.

Статистическая обработка выполнялась с использованием компьютерной программы Statistica 10.0 и математико-статистических методов расчета основных характеристик выборочных распределений – среднее арифметическое, стандартное отклонение, с использованием для сравнения полученных данных в зависимости от характера их распределения параметрических (критерий Стьюдента) или непараметрических (критерий Вилкоксона) методов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке противовоспалительной активации нейтрофилов отметили, что уровни экспрессии CD11b и CD66b на поверхности интактных нейтрофилов в среднем составляли 3898,0 и 8786,0 условных единиц флуоресценции соответственно. Инкубация нейтрофилов с LPS и fMLP статистически повышала экспрессию CD11b и CD66b: при обработке LPS в дозе 200 нг/мл экспрессия CD11b и CD66b возросла на 130 и 120 % (табл. 1), а при обработке fMLP в дозе 100 нМ экспрессия CD11b и CD66b увеличилась на 70 и 100 % соответственно.

При инкубации нейтрофилов с такой же концентрацией LPS после экспозиции с севофлураном в дозах 0,5 и 1,0 МАК уровень экспрессии CD11b также значительно возрос на 130 и на 120 %, а уровень экспрессии CD66b – на 80 и 90 % по сравнению с интактными нейтрофилами. При инкубации нейтрофилов с концентрацией LPS после экспозиции с севофлураном в дозе 1,5 МАК уровень экспрессии CD11b и CD66b также увеличился по сравнению с интактными нейтрофилами, но всего лишь на 30 и 50 % соответственно (табл. 1). Таким образом, экспозиция севофлурана в дозе 1,5 МАК снижает провоспалительную активацию нейтрофилов под действием ЛПС.

Таблица 1

**Влияние различных концентраций севофлурана на увеличение провоспалительной активации (в процентах) маркеров дегрануляции нейтрофилов (CD11b и CD66b) под влиянием липополисахарида и формилпептида**

Серии исследования	Маркеры	Липополисахарид 200 нг/мл	Формилпептид 100 нМ
Без севофлурана	CD11b	130*	70*
	CD66b	120*	100*
0,5 минимальной альвеолярной концентрации	CD11b	130*	70*
	CD66b	80*	75*
1,0 минимальной альвеолярной концентрации	CD11b	120*	50*
	CD66b	90*	65*
1,5 минимальной альвеолярной концентрации	CD11b	30	20
	CD66b	50*	40

Примечание: \* –  $p < 0,05$  (по критерию Вилкоксона) по отношению к одноименным показателям интактных нейтрофилов.

Аналогичные данные получили при инкубации нейтрофилов с fMLP и экспозиции с севофлураном в дозе 0,5 МАК и 1 МАК: увеличение экспрессии CD11b и CD66b под действием fMLP было статистически значимым, хотя существенно не отличалось от такового без экспозиции севофлурана. При инкубации нейтрофилов с такой же концентрацией fMLP после экспозиции севофлурана в дозе 1,5 МАК уровень экспрессии CD11b и CD66b имел лишь тенденцию к увеличению по сравнению с интактными нейтрофилами (в 1,2 и 1,4 раза).

Таким образом, выявленное снижение экспрессии CD11b и CD66b при экспозиции севофлураном в дозе 1,5 МАК подтверждает возможность подавления избыточной активации нейтрофилов под действием этого анестетика.

Для изучения влияния севофлурана на уровень апоптоза и некроза нейтрофилов через 22 ч после их выделения использовали аннексин V и йодистый пропидий. Отмечено, что уровень спонтанного некроза и апоптоза нейтрофилов через 22 ч инкубации составил 57,0 % (56,8–57,9), а экспозиции севофлурана 0,5 и 1,5 МАК не влияли на способность нейтрофилов к спонтанному апоптозу: уровень апоптоза составил 52,9 % (50,1–54,5) для 0,5 МАК; 53 % (51,5–54,7) для 1,0 МАК и 57,3 % (53,0–58,8) для 1,5 МАК. Однако все эти изменения оказались статистически незначимыми, т. е. севофлуран не влиял на уровень апоптоза нейтрофилов.

Большой интерес представляла оценка влияния севофлурана на изменение экспрессии противовоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ИЛ-8 нейтрофилами под действием LPS и fMLP. В интактных ней-

трофилах определялся уровень ИЛ-6 и ИЛ-8, равный 4,1 (2,3–5,5) и 15,2 (12,3–17,2). Экспозиция севофлурана 0,5 МАК и 1,0 МАК на интактные нейтрофилы не повлияла на уровень экспрессии данных цитокинов. При экспозиции севофлурана 1,5 МАК отмечали лишь тенденцию к снижению уровня экспрессии данных цитокинов интактными нейтрофилами (табл. 2), что заслуживает более углубленного изучения влияния севофлурана на экспрессию противовоспалительных цитокинов интактными нейтрофилами.

Добавление в среду инкубации LPS в дозе 200 нг/мл и fMLP в дозе 100 нМ статистически значимо увеличивало уровень противовоспалительных цитокинов в нейтрофилах. Вместе с тем экспозиция 0,5 и 1,0 МАК севофлурана не влияла на изменение экспрессии цитокинов под воздействием LPS. Однако при добавлении в среду инкубации LPS в дозе 200 нг/мл к нейтрофилам и экспозиции 1,5 МАК севофлурана статистически значимо увеличивала уровень противовоспалительного цитокина ИЛ-1 $\beta$  в нейтрофилах, но не влияла на уровень ИЛ-6 и ИЛ-8. В аналогичном эксперименте, проведенном с активацией нейтрофилов 100 нМ fMLP, экспозиция севофлурана 0,5–1 МАК также не препятствовала увеличению экспрессии противовоспалительных цитокинов. При экспозиции 1,5 МАК севофлурана добавление в среду инкубации fMLP значимо увеличивало уровень экспрессии ИЛ-6 нейтрофилами, активированными LPS или fMLP, и экспрессии ИЛ-8 нейтрофилами, активированными LPS. Таким образом, экспозиция 1,5 МАК севофлурана препятствует увеличению экспрессии противовоспалительного цитокина ИЛ-6.

Таблица 2

**Влияние различных концентраций севофлурана на экспрессию цитокинов нейтрофилами, активированными LPS и fMLP**

Серии исследований	Интерлейкины	Интактные нейтрофилы	Липополисахарид 200 нг/мл	Формилпептид 100 нМ
Без севофлурана	интерлейкин-1 $\beta$ *	0	25,8 (20,2–28,8)**	21,4 (20,2–25,5)*
	интерлейкин - 6	4,1 (2,3–5,5)	128,1 (114,4–135,7)**	101,4 (95,9–107,3)*
	интерлейкин - 8	15,2 (12,3–17,2)	88,9 (87,0–98,5)**	86,8 (84,5–95,7)*
0,5 минимальной альвеолярной концентрации	интерлейкин - 1 $\beta$	0	22,7 (12,6–20,5)**	18,6 (17,3–19,7)*
	интерлейкин - 6	4,1 (4,0–5,8)	110,5 (100,7–112,9)**	81,9 (80,7–90,4)*
	интерлейкин -8	12,1 (10,2–12,5)	62,9 (58,7–68,8)**	67,7 (58,7–68,9)*
1,0 минимальной альвеолярной концентрации	интерлейкин -1 $\beta$	0	15,5 (12,7–18,7)*	10,5(8,7–13,7)*
	интерлейкин - 6	4,9 (4,5–6,4)	25,4 (33,5–41,5)*	31,0 (25,4–34,4)*
	интерлейкин - 8	11,0 (10,9–11,9)	32,9 (21,8–42,5)*	38,5 (32,9–42,1)*
1,5 минимальной альвеолярной концентрации	интерлейкин -1 $\beta$	0	10,5 (9,5–128,7)*	10,5 (8,3–12,7)*
	интерлейкин - 6	3,9 (3,4–4,4)	5,2 (4,7–6,4)	5,1 (3,8–7,0)
	интерлейкин - 8	11,9 (9,3–13,5)	14,8 (18,9–21,3)	30,5 (22,9–35,3)*

Примечание:\* – p < 0,05; \*\* – p < 0,001 по отношению к интактным нейтрофилам.

Заключительным этапом исследования стало изучение влияния экспозиции севофлурана на уровень фосфорилирования GSK-3 $\beta$  в нейтрофилах после воз-

действия LPS. Стимуляция LPS приводит к дефосфорилированию киназы 3 бета (GSK-3 $\beta$ ) в нейтрофилах, статистически значимо снижая уровень фосфорили-

рованной формы по сравнению с базальным. Ингаляция 0,5 МАК севофлурана не влияла на уровень фосфорилирования GSK-3 $\beta$  в стимулированных нейтрофилах. При ингаляции 1,0 МАК севофлурана отмечали тенденцию к увеличению уровня фосфорилирования GSK-3 $\beta$  в стимулированных нейтрофилах. При этом

ингаляция 1,5 МАК севофлурана статистически значимо увеличивала уровень фосфорилирования GSK-3 $\beta$  в стимулированных нейтрофилах (табл. 3). Полученные результаты позволяют констатировать влияние севофлурана в дозе 1,5 МАК на фосфорилирование GSK-3 $\beta$  в нейтрофилах, стимулированных LPS.

Таблица 3

**Влияние различных концентраций севофлурана на уровень фосфорилирования киназы гликогенсинтазинкиназа – 3 $\beta$  в нейтрофилах, активированных липополисахаридом**

Серии исследований	Уровень фосфорилированной гликогенсинтазинкиназа – 3 $\beta$ , у. е. л.
Интактные нейтрофилы	899 557 (821 555–931 223)
Стимуляция липополисахарида	494 700 (412 786–599 000)*
липополисахарид + Севофлуран 0,5 минимальной альвеолярной концентрации	550 790 (398 344–678 444)
липополисахарид + Севофлуран 1,0 минимальной альвеолярной концентрации	671 105 (505 300–777 300)
липополисахарид + Севофлуран 1,5 минимальной альвеолярной концентрации	6788 575 (687 556–890 121)*

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по сравнению с интактными нейтрофилами.

Возможность подавления гипервоспаления севофлураном установлена в эксперименте на животных [7–8], однако молекулярные механизмы данного воздействия недостаточно изучены. Результаты исследований по влиянию севофлурана на воспаление у человека остаются противоречивыми [12]. Выявленное нами снижение активации нейтрофилов под действием LPS и fMLP, выразившееся в уровне экспрессии CD11b и CD66b, при экспозиции севофлураном в дозе 1,5 МАК подтверждает возможность подавления избыточной активации нейтрофилов человека при воспалении севофлураном.

Отмечено снижение секреции противовоспалительных цитокинов нейтрофилами под воздействием севофлурана и в ряде экспериментальных исследований на модели сепсиса у животных [7–9]. Наше исследование подтверждает, что аналогичный эффект наблюдается при воздействии и на нейтрофилы человека. При этом в данном исследовании не было выявлено влияния севофлурана на уровень апоптоза нейтрофилов человека. Тем не менее в исследовании S. Koutsogiannaki и соавт. [12] было показано, что воздействие севофлурана может ингибировать апоптоз нейтрофилов за счет нарушения взаимодействия домена смерти Fas (FDD) с Fas-ассоциированным DD (FADD). Таким образом, вопрос о возможности подавления апоптоза нейтрофилов севофлураном требует дальнейшего изучения, возможно, с увеличением числа добровольцев.

Актуальным вопросом является изучение механизмов подавления активации нейтрофилов под воздействием севофлурана. Предполагалось, что севофлуран дозозависимо модулирует воспалительную активацию нейтрофилов под действием бактериального агента LPS через фосфорилирование GSK-3 $\beta$  в нейтрофилах, поскольку значимость GSK-3 $\beta$  в регуляции функционирования нейтрофилов подтверждается рядом исследований [13]. Нами установлено, что одним из воз-

можных путей реализации противовоспалительных свойств севофлурана на нейтрофилы при воздействии LPS может быть действительно фосфорилирование GSK-3 $\beta$  в них, что приводит к снижению экспрессии на поверхности нейтрофилов маркеров дегрануляции CD11b и CD66b.

Полученные результаты раскрывают молекулярные механизмы реализации противовоспалительных эффектов севофлурана и предполагают перспективы его применения для лечения гиперактивного воспаления как при инфекционном, так и при асептическом воспалении, однако полученные данные требуют подтверждения в рандомизированных клинических исследованиях для изучения органопротекторных и противовоспалительных свойств.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследовании продемонстрировано влияние севофлурана на активацию нейтрофилов человека при воспалении. Севофлуран обладает выраженным противовоспалительным действием, обусловленным подавлением гиперактивации нейтрофилов, что было продемонстрировано на нейтрофилах человека. Одним из возможных механизмов влияния севофлурана на функцию нейтрофилов является усиление фосфорилирования GSK-3 $\beta$  в них, что снижает экспрессию на поверхности нейтрофилов маркеров дегрануляции CD11b и CD66b. Полученные результаты показывают перспективу применения севофлурана для коррекции гиперергического воспаления при бактериальном сепсисе, однако эти обнадеживающие данные требуют подтверждения в исследованиях *in vivo*.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**СПИСОК ИСТОЧНИКОВ**

1. Долгих В. Т., Корпачева О. В., Ершов А. В. Патопфизиология. В 2 т. Т. 2. Частная патопфизиология. М. : Урайт, 2020. 351 с.
2. Пасечник А. В., Фролов В. А., Моисеева Е. Г., Илларионова Т. С., Мангасаров А. Г., Хоменко А. А., Гасс М. В., Фатхи Н. Ф. Анализ воспалительного процесса в параметрах функции нейтрофилов // Вестник РУДН. Сер.: Медицина. 2001. № 3. С. 33–36.
3. Балабекова М. К. Состояние иммунного статуса интактных крыс с асептическим воспалением: экспериментальное исследование // Вестник КазНМУ. 2010. № 5. С. 278–281.
4. Образцов И. В., Годков М. А., Кулабухов В. В., Владимирова Г. А., Измайлов Д. Ю., Проскурина Е. В. Функциональная активность нейтрофилов при ожоговом сепсисе // Общая реаниматология. 2017. Т. 13, № 2. С. 40–51. DOI 10.15360/1813-9779-2017-2-40-51.
5. Гребенчиков О. А., Касаткина И. С., Каданцева К. К., Мешков М. А., Баева А. А. Влияние лития хлорида на активацию нейтрофилов под действием сыворотки пациентов с септическим шоком // Общая реаниматология. 2020. Т. 16, № 5. С. 45–55. DOI 10.15360/1813-9779-2020-5-45-55.
6. Serhan C. N., Levy B. D. Resolvins in Inflammation: Emergence of the Pro-Resolving Superfamily of Mediators // J Clin Invest. 2018. Vol. 128, Is. 7. P. 2657–2669. DOI 10.1172/JCI97943.
7. Beck-Schimmer B., Baumann L., Restin T. et al. Sevoflurane Attenuates Systemic Inflammation Compared with Propofol, but Does not Modulate Neuro-Inflammation: A Laboratory Rat Study // Eur J Anaesthesiol. 2017. Vol. 34, Is. 11. P. 764–775. DOI 10.1097/EJA.0000000000000668.
8. Koutsogiannaki S., Hou L., Babazada H. et al. The Volatile Anesthetic Sevoflurane Reduces Neutrophil Apoptosis via Fas Death Domain–Fas-Associated Death Domain Interaction // FASEB J. 2019. Vol. 33, Is. 11. P. 12668–12679. DOI 10.1096/fj.201901360R.
9. Rodríguez-González R., Baluja A., Veiras Del Río S. et al. Effects of Sevoflurane Postconditioning on Cell Death, Inflammation and TLR Expression in Human Endothelial Cells Exposed to LPS // J Transl Med. 2013. Vol. 11, Is. 1. P. 87. DOI 10.1186/1479-5876-11-87.
10. Schilling T., Kozian A., Senturk M. et al. Effects of Volatile and Intravenous Anesthesia on the Alveolar and Systemic Inflammatory Response in Thoracic Surgical Patients // Anesthesiology. 2011. Vol. 115, Is. 1. P. 65–74. DOI 10.1097/ALN.0b013e318214b9de.
11. Hayes J. K., Havaleshko D. M., Plachinta R. V., Rich G. F. Isoflurane Pretreatment Supports Hemodynamics and Leukocyte Rolling Velocities in Rat Mesentery during Lipopolysaccharide-Induced Inflammation // Anesth Analg. 2004. Vol. 98, Is. 4. P. 999–1006. DOI 10.1213/01.ANE.0000104584.91385.1D.
12. Braz M. G., Braz L. G., Barbosa B. S. et al. DNA Damage in Patients who Underwent Minimally Invasive Surgery under Inhalation or Intravenous Anesthesia // Mutat Res. 2011. Vol. 726, Is. 2. P. 251–254. DOI 10.1016/j.mrgentox.2011.09.00.
13. Park D. W., Jiang S., Liu Y. et al. GSK3β-Dependent Inhibition of AMPK Potentiates Activation of Neutrophils and Macrophages and Enhances Severity of Acute Lung Injury // Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2014. Vol. 307, Is. 10. P. 735–745. DOI 10.1152/ajplung.00165.2014.

**REFERENCES**

1. Dolgikh V. T., Korpacheva O. V., Ershov A. V. Patofiziologija. In 2 vols. Vol. 2. Chastnaia patofiziologija. Moscow : Iurait, 2020. 351 p. (In Russian).
2. Pasechnik A. V., Frolov V. A., Moiseeva E. G., Illarionova T. S., Mangasarov A. G., Khomenko A. A., Gass M. V., Fatkhi N. F. Analysis of Inflammatory Process in Parameters of Function of Neutrophils // RUDN Journal of Medicine. 2001. No. 3. P. 33–36. (In Russian).
3. Balabekova M. K. Sostoianie immunogo statusa intaknykh krys s asepticheskim vospaleniem: eksperimentalnoe issledovanie // Vestnik KazNMU. 2010. No. 5. P. 278–281. (In Russian).
4. Obraztsov I. V., Godkov M. A., Kulabukhov V. V., Vladimirova G. A., Izmailov D. Yu., Proskurina E. V. Functional Activity of Neutrophils in Burn Sepsis // General Reanimatology. 2017. Vol. 13, No. 2. P. 40–51. DOI 10.15360/1813-9779-2017-2-40-51. (In Russian).
5. Grebenchikov O. A., Kasatkina I. S., Kadantseva K. K., Meshkov M. A., Bayeva A. A. The Effect of Lithium Chloride on Neutrophil Activation on Exposure to Serum of Patients with Septic Shock // General Reanimatology. 2020. Vol. 16, No. 5. P. 45–55. DOI 10.15360/1813-9779-2020-5-45-55. (In Russian).
6. Serhan C. N., Levy B. D. Resolvins in Inflammation: Emergence of the Pro-Resolving Superfamily of Mediators // J Clin Invest. 2018. Vol. 128, Is. 7. P. 2657–2669. DOI 10.1172/JCI97943.
7. Beck-Schimmer B., Baumann L., Restin T. et al. Sevoflurane Attenuates Systemic Inflammation Compared with Propofol, but Does not Modulate Neuro-Inflammation: A Laboratory Rat Study // Eur J Anaesthesiol. 2017. Vol. 34, Is. 11. P. 764–775. DOI 10.1097/EJA.0000000000000668.
8. Koutsogiannaki S., Hou L., Babazada H. et al. The Volatile Anesthetic Sevoflurane Reduces Neutrophil Apoptosis via Fas Death Domain–Fas-Associated Death Domain Interaction // FASEB J. 2019. Vol. 33, Is. 11. P. 12668–12679. DOI 10.1096/fj.201901360R.
9. Rodríguez-González R., Baluja A., Veiras Del Río S. et al. Effects of Sevoflurane Postconditioning on Cell Death, Inflammation and TLR Expression in Human Endothelial Cells Exposed to LPS // J Transl Med. 2013. Vol. 11, Is. 1. P. 87. DOI 10.1186/1479-5876-11-87.
10. Schilling T., Kozian A., Senturk M. et al. Effects of Volatile and Intravenous Anesthesia on the Alveolar and Systemic Inflammatory Response in Thoracic Surgical Patients // Anesthesiology. 2011. Vol. 115, Is. 1. P. 65–74. DOI 10.1097/ALN.0b013e318214b9de.
11. Hayes J. K., Havaleshko D. M., Plachinta R. V., Rich G. F. Isoflurane Pretreatment Supports Hemodynamics and Leukocyte Rolling Velocities in Rat Mesentery during Lipopolysaccharide-Induced Inflammation // Anesth Analg. 2004. Vol. 98, Is. 4. P. 999–1006. DOI 10.1213/01.ANE.0000104584.91385.1D.
12. Braz M. G., Braz L. G., Barbosa B. S. et al. DNA Damage in Patients who Underwent Minimally Invasive Surgery under Inhalation or Intravenous Anesthesia // Mutat Res. 2011. Vol. 726, Is. 2. P. 251–254. DOI 10.1016/j.mrgentox.2011.09.00.
13. Park D. W., Jiang S., Liu Y. et al. GSK3β-Dependent Inhibition of AMPK Potentiates Activation of Neutrophils and Macrophages and Enhances Severity of Acute Lung Injury // Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2014. Vol. 307, Is. 10. P. 735–745. DOI 10.1152/ajplung.00165.2014.

**ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ**

**Д. О. Старостин** – ассистент.

**В. Т. Долгих** – заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор.

**А. Н. Кузовлев** – доктор медицинских наук, доцент.

**О. А. Гребенчиков** – доктор медицинских наук.

**INFORMATION ABOUT THE AUTHORS**

**D. O. Starostin** – Assistant Professor.

**V. T. Dolgikh** – Honored Worker of Science of the Russian Federation, Doctor of Sciences (Medicine), Professor.

**A. N. Kuzovlev** – Doctor of Sciences (Medicine), Associate Professor.

**O. A. Grebenchikov** – Doctor of Sciences (Medicine).