



Влияние севофлурана на активацию нейтрофилов человека в моделях *ex vivo*

Д. О. СТАРОСТИН, А. Н. КУЗОВЛЕВ, О. А. ГРЕБЕНЧИКОВ, В. Т. ДОЛГИХ

НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии, Москва, РФ

РЕЗЮМЕ

Цель: изучить влияние различных концентраций севофлурана на активацию нейтрофилов человека в модели *ex vivo*.

Материалы и методы. Исследование проведено на клеточной культуре нейтрофилов венозной крови 5 здоровых мужчин. Активацию нейтрофилов под действием липополисахарида (ЛПС) и пептид хемотаксиса N-формил-метионин-лейцин-фенилаланин (fMLP) в качестве стимуляторов оценивали по уровню экспрессии CD11b и CD66b, IL-1 β , IL-6 и IL-8, уровню фосфорилирования гликоген-синтаза-киназы-3 β (GSK-3 β). Для оценки апоптоза использовали аннексин V и йодистый пропидий. Проводили экспозицию нейтрофилов с 0,5, 1 и 1,5 МАК севофлурана для оценки влияния препарата на их активацию.

Результаты. Инкубация нейтрофилов с ЛПС и fMLP статистически значимо повышала экспрессию данных молекул: при обработке ЛПС в дозе 200 нг/мл экспрессия CD11b и CD66b увеличилась в 2,3 и 2,2 раза ($p = 0,002$ и $p = 0,001$ соответственно), а при обработке fMLP в дозе 100 нМ – в 1,7 и 2,0 раза ($p = 0,025$ и $p = 0,03$ соответственно).

При инкубации нейтрофилов с такой же концентрацией ЛПС после экспозиции севофлурана в дозе 1,5 МАК уровень экспрессии CD11b и CD66b увеличился по сравнению с интактными нейтрофилами. Изменение экспрессии CD11b в данном эксперименте было статистически незначимым ($p = 0,055$), изменение экспрессии CD66b – статистически значимым ($p = 0,007$). Таким образом, экспозиция севофлурана в дозе 1,5 МАК снижает провоспалительную активацию нейтрофилов под действием ЛПС.

Заключение. Стимуляция нейтрофилов ЛПС сопровождалась дефосфорилированием GSK-3 β , а экспозиция с 1,5 МАК севофлурана – фосфорилированием. Таким образом, фосфорилирование GSK-3 β в нейтрофилах под действием севофлурана снижает экспрессию CD11b и CD66b.

Ключевые слова: воспаление, нейтрофилы, севофлуран

Для цитирования: Старостин Д. О., Кузовлев А. Н., Гребенчиков О. А., Долгих В. Т. Влияние севофлурана на активацию нейтрофилов человека в моделях *ex vivo* // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2022. – Т. 19, № 1. – С. 32-39. DOI: 10.21292/2078-5658-2022-19-1-32-39

Effect of Sevoflurane on Activation of Human Neutrophils in *Ex Vivo* Models

D. O. STAROSTIN, A. N. KUZOVLEV, O. A. GREBENCHIKOV, V. T. DOLGIKH

V. A. Negovsky National Research Institute of General Reanimatology, Federal Research Clinical Center of Reanimatology and Rehabilitation, Moscow, Russia

ABSTRACT

The objective is to study the effect of different concentrations of sevoflurane on activation of human neutrophils in an *ex vivo* model.

Subjects and Methods. The cell culture of venous blood neutrophils of 5 healthy men was used in this study. Neutrophil activation by lipopolysaccharide (LPS) and chemotaxis peptide N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine (fMLP) as stimulants, was assessed by the expression level of CD11b and CD66b, IL-1 β , IL-6 and IL-8, the level of phosphorylation of glycogen synthase β -kinase-3 β (GSK-3 β). Annexin V and propidium iodide were used to assess apoptosis. Neutrophils were exposed to 0.5, 1 and 1.5 MAC of sevoflurane to assess the effect of the drug on their activation.

Results. Incubation of neutrophils with LPS and fMLP statistically significantly increased the expression of these molecules: treatment with LPS at the dose of 200 ng/ml increased CD11b and CD66b expression by 2.3 and 2.2 times ($p = 0.002$ and $p = 0.001$, respectively), while treatment with fMLP at 100 nM increased expression by 1.7 and 2.0 times ($p = 0.025$ and $p = 0.03$, respectively).

When neutrophils were incubated with the same concentration of LPS after exposure to sevoflurane at a dose of 1.5 MAC, the level of CD11b and CD66b expression increased versus intact neutrophils. In this experiment, the change in CD11b expression was statistically insignificant ($p = 0.055$), the change in CD66b expression was statistically significant ($p = 0.007$). Thus, sevoflurane exposure at a dose of 1.5 MAC reduces proinflammatory activation of neutrophils induced by LPS.

Conclusion. Stimulation of neutrophils by LPS was accompanied by dephosphorylation of GSK-3 β , and exposure to 1.5 MAC of sevoflurane resulted in its phosphorylation. Thus, phosphorylation of GSK-3 β in neutrophils by sevoflurane reduces the expression of CD11b and CD66b.

Key words: inflammation, neutrophils, sevoflurane

For citations: Starostin D.O., Kuzovlev A.N., Grebenchikov O.A., Dolgikh V.T. Effect of sevoflurane on activation of human neutrophils in *ex vivo* models. *Messenger of Anesthesiology and Resuscitation*, 2022, Vol. 19, no. 1, P. 32-39. (In Russ.) DOI: 10.21292/2078-5658-2022-19-1-32-39

Для корреспонденции:

Старостин Даниил Олегович
E-mail: starostin_daniil@mail.ru

Correspondence:

Daniil O. Starostin
Email: starostin_daniil@mail.ru

Воспаление представляет собой типовой патологический процесс, направленный на защиту организма от инфекции [10]. Тем не менее у пациентов в критическом состоянии воспаление может быть также ключевым патогенетическим фактором повреждения тканей и прогрессирования мультиорганной дисфункции [2]. Нейтрофилы являются

одними из основных участников воспалительного процесса, в связи с чем их дисфункция может иметь большое значение в патогенезе критических состояний [18]. Так, в ряде исследований была продемонстрирована роль нейтрофилов в прогрессировании за счет дополнительного повреждения тканей при сепсисе [30], остром респираторном дистресс-син-

дроме [13], коагулопатиях [9, 12] и других патологических процессах и состояниях. Таким образом, терапия, направленная на нормализацию функции нейтрофилов, может быть целесообразной у таких пациентов. Ввиду важной роли нейтрофилов в регуляции воспаления при инфекционных и неинфекционных заболеваниях актуальным вопросом является поиск оптимальных методов определения активации нейтрофилов. В качестве маркеров активации нейтрофилов были предложены белки CD11b и CD66b [1]. Они представляют собой интегрины, которые быстро экспрессируются на цитоплазматической мембране нейтрофилов при их активации, что продемонстрировано в ряде исследований [20, 25, 27, 28]. Среди других маркеров активации нейтрофилов можно отметить фосфорилированную киназу гликогенсинтазы-3 β (фосфо-ГСК-3 β). ГСК-3 представляет собой сериновую протеазу, которая участвует в регуляции различных клеточных процессов, причем данный фермент регулирует не только синтез гликогена, но также продемонстрирована его роль в регуляции клеточного цикла (и деления клеток) и большом количестве различных сигнальных путей. Обе изоформы данного фермента – ГСК-3 α и ГСК-3 β – обнаружены в нейтрофилах, однако их функции в данных клетках недостаточно изучены. Тем не менее показано, что фосфорилирование обоих изоферментов является важным регуляторным механизмом нейтрофилов. Таким образом, количество фосфо-ГСК-3 β в нейтрофилах может отражать их активность [3, 7].

В настоящее время открыто большое количество нейтрофильных факторов, влияющих на возбудителей инфекции, компоненты иммунной системы, ткани организма. Предложен ряд терапевтических методов, воздействующих на те или иные звенья функционирования нейтрофилов: воздействие на образование нейтрофилов, их выход из костного мозга, рекрутинг и миграцию, хемотаксис, активацию [5, 29], а также на основные ферменты нейтрофилов. Тем не менее большая часть таргетных препаратов характеризуется теми или иными недостатками: недостаточная избирательность действия, нейтропения и иммуносупрессия ввиду избыточного подавления функции нейтрофилов [15, 26]. Некоторые препараты показали свою эффективность в лечении аутоиммунных заболеваний и злокачественных новообразований [5, 29], однако они не рекомендованы к применению у пациентов в критических состояниях с целью коррекции воспалительного процесса.

Севофлуран представляет собой ингаляционный анестетик, положительное влияние которого на функцию нейтрофилов в критических состояниях продемонстрировано в ряде экспериментов *in vitro* и *in vivo* [6, 17, 23]. Также показано снижение выраженности воспалительного процесса и оксидативного стресса у пациентов после оперативных вмешательств при использовании севофлурана в качестве средства для анестезии [11, 24]. Тем не ме-

нее в настоящее время отсутствуют исследования по применению севофлурана с целью коррекции воспалительного процесса у пациентов, находящихся в критическом состоянии. Потенциальная эффективность этого анестетика диктует необходимость таких исследований.

Цель исследования: изучить влияние различных концентраций севофлурана на активацию нейтрофилов человека в модели *ex vivo*.

Материалы и методы

Исследование проведено на клеточной культуре нейтрофилов, выделенных из венозной крови 5 здоровых мужчин в возрасте 25–34 лет. В гепаринизированной венозной крови осаждали эритроциты, а плазму наслаивали на фиколл (ПанЭко, Россия) с плотностью 1,077 г/мл и центрифугировали при 400 g 30 мин при комнатной температуре. Затем удаляли супернатант и все дальнейшие процедуры проводили на льду с использованием охлажденных растворов. Примесные эритроциты удаляли с помощью ресуспендирования осадка в 2 мл деионизированной стерильной воды в течение 45 с, а далее добавляли 2 мл 2-кратного PBS для восстановления тоничности, затем центрифугировали при 200 g в течение 10 мин при температуре +4°C. Осажденные нейтрофилы промывали PBS и ресуспендировали в культуральной среде (RPMI 1640 + 10% FBS) [14]. Затем выделенные нейтрофилы на 30 мин помещали в инкубатор, куда подавали воздушную смесь, содержащую различные концентрации севофлурана: 0,5 МАК (1 об. %), 1,0 МАК (2,0 об. %), 1,5 МАК (3,0 об. %).

После этого клетки помещали в увлажненный CO₂-инкубатор (37°C, 5% CO₂) на 30 мин, затем проводили дальнейшие манипуляции. После инкубации с активатором (LPS) нейтрофилы в концентрации 5 млн/мл лизировали в горячем буфере (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 10% глицерина; 50 mM ДТТ, 0,01% бромфенолового синего) в течение 4 мин при 94°C. Белки разделяли в 12%-ном полиакриламидном геле и переносили на PVDF-мембраны (Amersham, США). Далее 5%-ным БСА в буфере ТБСТ (25 mM Tris pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween20) блокировали сайты неспецифического связывания. Затем мембраны инкубировали в течение ночи при температуре 4°C с антителами в 5%-ном растворе БСА в ТБСТ (антитела против фосфо-p38 (T180/Y182), Cell Signaling, США). Со вторыми антителами (против мышиных иммуноглобулинов, конъюгированных с пероксидазой хрена и разведенных в 5%-ном растворе БСА/ТБСТ) мембраны инкубировали в течение 1 ч. Визуализацию проводили набором SuperSignal West Pico (ThermoFisher, США) с помощью геля-документирующей системы Bio-Rad ChemiDoc™ Touch.

Апоптоз нейтрофилов оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии. Нейтрофилы инкубировали с липополисахаридами (ЛПС) и fMLP

в течение 22 ч при 37°C в увлажненном CO₂-инкубаторе. Затем 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 CaCl₂, pH = 7,4). К каждой пробе добавляли 2,5 мкл аннексина V, конъюгированного с флюоресцентным красителем FITC (ThermoFisher, США), и оставляли на 25 мин при 37°C. Далее добавляли PI до конечной концентрации 10 мкг/мл, инкубировали еще 5 мин, после чего анализировали 50 тыс. клеток с помощью проточного цитофлуориметра Beckman Coulter CytoFLEX. Апоптотическими считали аннексин V-положительные и PI-отрицательные клетки.

Иммуноферментный анализ осуществляли с помощью реагентов для иммуноферментного определения концентрации анализируемых цитокинов в среде культивации нейтрофилов (Вектор-Бест, Россия) согласно протоколу производителя. Образцы сывороток крови, содержавшие осадок, 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. 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.

Оптическую плотность растворов в лунках стрипов измеряли на спектрофотометре вертикального сканирования «BioRad iMark» при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм. Для каждой пары лунок вычисляли среднее арифметическое значение оптической плотности, после чего в линейных координатах строили калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности от концентрации цитокина в калибровочных образцах (нг/мл). Далее по калибровочному графику определяли концентрацию цитокинов в контрольных и анализируемых образцах.

Для определения уровня активации нейтрофилов оценивали их дегрануляцию по увеличению на поверхности клеток молекул CD11b (компонент мембран специфических, желатинозных и четвертичных гранул) и CD66b (компонент мембран специфических гранул) с помощью проточной цитофлуориметрии. Образцы клеток инкубировали с LPS в течение 30 мин при 37°C, затем добавля-

ли 2,5 мкл антител к CD11b, конъюгированных с флюоресцентным красителем FITC (ThermoFisher, США), и 0,5 мкл антител к CD66b, конъюгированных с флюоресцентным красителем AlexaFluor647 (ThermoFisher, США), и 30 мин инкубировали на льду. Затем анализировали 50 тыс. клеток с помощью проточного цитофлуориметра Beckman Coulter CytoFLEX.

Для статистического анализа использовали программу Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.) и MedCalc 12.5.0.0 (MedCalc Software bvba). Результаты представлены медианой с межквартильным интервалом. Межгрупповые различия показателей оценивали при помощи теста для связанных выборок «W-критерий Вилкоксона» и принимали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты

При изучении провоспалительной активации нейтрофилов установлено, что уровни экспрессии CD11b и CD66b на поверхности интактных нейтрофилов составляли 3 898,0 [3 340,0–4 200,0] и 8 786,0 [8 112,0–10 100,0] условных единиц флюоресценции соответственно. Инкубация нейтрофилов с ЛПС и fMLP статистически значимо повышала экспрессию данных молекул:

- при обработке ЛПС в дозе 200 нг/мл экспрессия CD11b и CD66b увеличилась в 2,3 и 2,2 раза ($p = 0,002$ и $p = 0,001$ соответственно);
- при обработке fMLP в дозе 100 нМ экспрессия CD11b и CD66b увеличилась в 1,7 и 2,0 раза ($p = 0,025$ и $p = 0,03$ соответственно).

Эти результаты согласуются с данными литературы о повышении экспрессии CD11b и CD66b при активации нейтрофилов под воздействием различных факторов, инициирующих воспаление [19–21, 25, 27, 28].

При инкубации нейтрофилов с такой же концентрацией ЛПС после экспозиции севовфурана в дозе 0,5 МАК (1 об. %) и 1,0 МАК уровень экспрессии CD11b также значимо увеличился по сравнению с интактными нейтрофилами (табл. 1). Таким образом, экспозиция севовфурана в дозе 0,5–1,0 МАК в условиях *ex vivo* не влияла на провоспалительную активацию нейтрофилов.

При инкубации нейтрофилов с такой же концентрацией ЛПС после экспозиции севовфурана в дозе 1,5 МАК уровень экспрессии CD11b и CD66b увеличился по сравнению с интактными нейтрофилами. Изменение экспрессии CD11b в данном эксперименте было статистически незначимым ($p = 0,055$), изменение экспрессии CD66b – статистически значимым ($p = 0,007$). Таким образом, экспозиция севовфурана в дозе 1,5 МАК снижает провоспалительную активацию нейтрофилов под действием ЛПС.

Аналогичные данные получили при инкубации нейтрофилов с fMLP и экспозиции с севовфураном: применение севовфурана в дозе 0,5 и 1 МАК

Таблица 1. Влияние различных концентраций севофлурана на провоспалительную активацию CD11b и CD66b нейтрофилов, вызванную ЛПС и fMLP

Table 1. Effect of different concentrations of sevoflurane on proinflammatory activation of CD11b and CD66b neutrophils induced by LPS and fMLP

Серии исследования	Маркеры	ЛПС 200 нг/мл		fMLP 100 нМ	
Без севофлурана	CD11b	В 2,3 раза	$p = 0,002^*$	В 1,7 раза	$p = 0,025$
	CD66b	В 2,2 раза	$p = 0,001$	В 2,0 раза	$p = 0,03$
0,5 МАК	CD11b	В 2,3 раза	$p = 0,002$	В 1,7 раза	$p = 0,004$
	CD66b	В 1,8 раза	$p = 0,001$	В 1,75 раза	$p = 0,04$
1,0 МАК	CD11b	В 2,2 раза	$p = 0,008$	В 1,5 раза	$p = 0,03$
	CD66b	В 1,9 раза	$p = 0,01$	В 1,65 раза	$p = 0,04$
1,5 МАК	CD11b	В 1,3 раза	$p = 0,055$	В 1,2 раза	$p = 0,08$
	CD66b	В 1,5 раза	$p = 0,007$	В 1,4 раза	$p = 0,06$

Примечание: * – здесь и далее указано, во сколько раз увеличивается экспрессия маркеров CD11b и CD66b под действием ЛПС и fMLP и значение p , рассчитанное по критерию Вилкоксона, при сравнении интактных нейтрофилов и нейтрофилов, обработанных ЛПС/fMLP

не влияло на провоспалительную активацию нейтрофилов. Увеличение экспрессии CD11b и CD66b под действием fMLP было статистически значимым и 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 увеличился по сравнению с интактными нейтрофилами в 1,2 и 1,4 раза. Изменение экспрессии CD11b и CD66b в данном эксперименте было статистически незначимым. Таким образом, снижение провоспалительной активации нейтрофилов под воздействием севофлурана в концентрации 1,5 МАК отмечалось также при активации, вызванной fMLP в дозе 100 нМ.

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

Для изучения влияния севофлурана на уровень апоптоза и некроза нейтрофилов человека через 22 ч после их выделения использовали аннексин V и йодистый пропидий. Установили, 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] % ($p > 0,05$) для 0,5 МАК; 53 [51,5–54,7] % ($p > 0,05$) для 1,0 МАК и 57,3 [53,0–58,8] % ($p > 0,05$) для 1,5 МАК. Следовательно, севофлуран не влиял на уровень апоптоза нейтрофилов.

Большой интерес представляла оценка влияния севофлурана на изменение экспрессии провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-8 нейтрофилами под действием ЛПС и fMLP. В интактных нейтрофилах определялся уровень ИЛ-6 и ИЛ-8 (табл. 2). Экспозиция севофлурана 0,5 и 1,0 МАК на интактные нейтрофилы не повлияла на уровень экспрессии данных цитокинов. При экспозиции сево-

флурана 1,5 МАК отмечали тенденцию к снижению уровня экспрессии данных цитокинов интактными нейтрофилами (табл. 2), что заслуживает более углубленного изучения влияния севофлурана на экспрессию провоспалительных цитокинов интактными нейтрофилами. Возможно, при увеличении числа добровольцев можно получить статистически значимые различия при экспозиции севофлурана 1,5 МАК.

Добавление в среду инкубации ЛПС в дозе (200 нг/мл) статистически значимо увеличивало уровень провоспалительных цитокинов в нейтрофилах. Аналогично, добавление в среду инкубации fMLP в дозе 100 нМ также статистически значимо увеличивало уровень провоспалительных цитокинов в нейтрофилах.

Экспозиция 0,5 и 1,0 МАК севофлурана не влияла на изменение экспрессии цитокинов под воздействием ЛПС. При этом добавление в среду инкубации ЛПС в дозе 200 нг/мл к нейтрофилам, которые в течение 30 мин находились в инкубаторе с воздушной смесью, после экспозиции 1,5 МАК севофлурана значимо увеличивало уровень провоспалительного цитокина ИЛ-1 β в нейтрофилах и не влияло на уровень ИЛ-6 и ИЛ-8 (табл. 2).

В аналогичном эксперименте, проведенном с активацией нейтрофилов 100 нМ fMLP, экспозиция севофлурана 0,5–1 МАК также не препятствовала увеличению экспрессии провоспалительных цитокинов. При экспозиции 1,5 МАК севофлурана добавление в среду инкубации fMLP в дозе 100 нМ значимо увеличивало уровень экспрессии ИЛ-6 нейтрофилами, активированными ЛПС или fMLP и экспрессии ИЛ-8 нейтрофилами, активированными ЛПС.

Таким образом, экспозиция 1,5 МАК севофлурана препятствовала увеличению экспрессии провоспалительного цитокина ИЛ-6.

Заключительным этапом исследования стало изучение влияния экспозиции севофлурана на уровень фосфорилирования ГСК-3 β в нейтрофилах после

Таблица 2. Влияние различных концентраций севофлурана на экспрессию цитокинов нейтрофилами, активированными ЛПС и fMLP

Table 2. Effect of different concentrations of sevoflurane on cytokine expression by neutrophils activated by LPS and fMLP

Серии исследований	Интерлейкины	Интактные нейтрофилы	ЛПС 200 нг/мл	fMLP 100 нМ
Без севофлурана	ИЛ-1β*	0	25,8 [20,2–28,8] $p = 0,001$	21,4 [20,2–25,5] $p = 0,002$
	ИЛ-6	4,1 [2,3–5,5]**	128,1 [114,4–135,7] $p = 0,001$	101,4 [95,9–107,3] $p = 0,002$
	ИЛ-8	15,2 [12,3–17,2]	88,9 [87,0–98,5] $p = 0,0001$	86,8 [84,5–95,7] $p = 0,002$
0,5 МАК	ИЛ-1β	0	22,7 [12,6–20,5] $p = 0,001$	18,6 [17,3–19,7] $p < 0,05$
	ИЛ-6	4,1 [4,0–5,8] $p = 0,8***$	110,5 [100,7–112,9] $p = 0,001$	81,9 [80,7–90,4] $p < 0,05$
	ИЛ-8	12,1 [10,2–12,5] $p = 0,9$	62,9 [58,7–68,8] $p = 0,001$	67,7 [58,7–68,9] $p < 0,05$
1,0 МАК	ИЛ-1β	0	15,5 [12,7–18,7] $p < 0,05$	10,5 [8,7–13,7] $p < 0,05$
	ИЛ-6	4,9 [4,5–6,4] $p = 0,7$	25,4 [33,5–41,5] $p < 0,05$	31,0 [25,4–34,4] $p < 0,05$
	ИЛ-8	11,0 [10,9–11,9] $p = 0,9$	32,9 [21,8–42,5] $p < 0,05$	38,5 [32,9–42,1] $p < 0,05$
1,5 МАК	ИЛ-1β	0	10,5 [9,5–128,7] $p < 0,05$	10,5 [8,3–12,7] $p < 0,05$
	ИЛ-6	3,9 [3,4–4,4] $p = 0,07$	5,2 [4,7–6,4] $p > 0,05$	5,1 [3,8–7,0] $p > 0,05$
	ИЛ-8	11,9 [9,3–13,5] $p = 0,08$	14,8 [18,9–21,3] $p > 0,05$	30,5 [22,9–35,3] $p < 0,05$

Примечание: * – указаны концентрации в пг/мл; ** – медиана [межквартильный интервал]

воздействия ЛПС. Оказалось, что стимуляция ЛПС приводит к дефосфорилированию киназы GSK-3β в нейтрофилах, статистически значимо снижая уровень фосфорилированной формы по сравнению с базальным. Ингаляция 0,5 МАК севофлурана не влияла на уровень фосфорилирования GSK-3β в стимулированных нейтрофилах. При ингаляции 1,0 МАК севофлурана отмечали тенденцию к увеличению уровня фосфорилирования GSK-3β в стимулированных нейтрофилах. При этом ингаляция 1,5 МАК севофлурана статистически значимо увеличивала уровень фосфорилирования GSK-3β в стимулированных нейтрофилах (табл. 3).

Полученные результаты позволяют констатировать влияние севофлурана в дозе 1,5 МАК на фосфорилирование GSK-3β в нейтрофилах, стимулированных ЛПС.

Обсуждение

В данном исследовании продемонстрировано влияние севофлурана на активацию нейтрофилов человека при воспалении. Возможность подавления гипервоспаления севофлураном установлена в ряде экспериментальных исследований на животных [6, 17]. Тем не менее молекулярные меха-

низмы данного воздействия недостаточно изучены. Кроме того, результаты исследований по влиянию севофлурана на воспаление у человека остаются противоречивыми [4, 8, 16].

Выявленное нами снижение активации нейтрофилов под действием ЛПС 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 под действием севофлурана.

Кроме того, отмечено также снижение уровня секреции провоспалительных цитокинов нейтрофилами под воздействием севофлурана. Снижение уровня провоспалительных цитокинов под воздействием севофлурана также было выявлено в ряде экспериментальных исследований на модели сепсиса у животных [6, 23].

Данное исследование также подтверждает, что аналогичный эффект наблюдается при воздействии на нейтрофилы человека. При этом в данном исследовании не обнаружено влияния севофлурана на уровень апоптоза нейтрофилов человека. Тем не менее в исследовании S. Koutsogiannaki et al. показано, что воздействие севофлурана может ингибировать апоптоз нейтрофилов за счет нарушения взаимо-

Таблица 3. Влияние различных концентраций севофлурана на уровень фосфорилирования киназы GSK-3β в нейтрофилах, активированных ЛПС

Table 3. Effect of different concentrations of sevoflurane on the level of phosphorylation of GSK-3β kinase in LPS-activated neutrophils

Серии исследований	Уровень фосфорилированной GSK-3β, у. е. л.	Значение p^*
Интактные нейтрофилы	899 557 [821 555–931 223]	$p = 0,001$
Стимуляция ЛПС	494 700 [412 786–599 000]	$p = 0,001$
ЛПС + севофлуран 0,5 МАК	550 790 [398 344–678 444]	$p = 0,09$
ЛПС + севофлуран 1,0 МАК	671 105 [505 300–777 300]	$p = 0,06$
ЛПС + севофлуран 1,5 МАК	6 788 575 [687 556–890 121]	$p = 0,008$

Примечание: * – по сравнению с интактными нейтрофилами, уровень значимости $p < 0,05$

действия домена смерти Fas (FDD) и Fas-ассоциированным DD (FADD) [17]. Таким образом, вопрос возможности подавления апоптоза нейтрофилов севофлураном требует дальнейшего изучения, возможно, с увеличением числа добровольцев.

Актуальным вопросом является изучение механизмов подавления активации нейтрофилов под действием севофлурана. Предполагалось, что севофлуран дозозависимо модулирует воспалительную активацию нейтрофилов под действием бактериального агента ЛПС через фосфорилирование ГСК-3 β в нейтрофилах, поскольку значимость ГСК-3 β в регуляции функционирования нейтрофилов подтверждается рядом исследований [22].

Выполненное исследование позволило установить, что одним из возможных путей реализации противовоспалительных свойств севофлурана на нейтрофилы при воздействии ЛПС может быть фосфорилирование GSK-3 β в них, что приводит к снижению экспрессии на поверхности нейтрофилов маркеров дегрануляции CD11b и CD66b.

Полученные результаты показывают перспективы применения севофлурана для коррекции гиперергического воспаления при бактериальном сепсисе,

однако эти обнадеживающие данные требуют подтверждения в моделях *in vivo*.

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

Выводы

1. Севофлуран обладает выраженным противовоспалительным действием, обусловленным подавлением гиперактивации нейтрофилов, что в данном исследовании продемонстрировано на нейтрофилах человека.

2. Одним из возможных механизмов влияния севофлурана на функцию нейтрофилов является фосфорилирование GSK-3 β в них, что приводит к снижению экспрессии на поверхности нейтрофилов маркеров дегрануляции CD11b и CD66b.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

Conflict of Interests. The authors state that they have no conflict of interests.

ЛИТЕРАТУРА

- Гребенчиков О. А., Касаткина И. С., Каданцева К. К. и др. Влияние лития хлорида на активацию нейтрофилов под действием сыворотки пациентов с септическим шоком // *Общая реаниматология*. – 2020. – Т. 16, № 5. – С. 45–55. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2020-5-45-55>.
- Образцов И. В., Годков М. А., Кулабухов В. В. и др. Функциональная активность нейтрофилов при ожоговом сепсисе // *Общая реаниматология*. – 2017. – Т. 13, № 2. – С. 40–51. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2017-2-40-51>.
- Остроумова О. Д., Кочетков А. И., Павлеева Е. Е. и др. Лекарственно-индуцированные нейтропения и агранулоцитоз // *Безопасность и риск фармакотерапии*. – 2020. – Т. 8, № 3. – С. 109–122. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2020-8-3-109-122>.
- Alleva R. Lymphocyte DNA damage precedes DNA repair or cell death after orthopaedic surgery under general anaesthesia // *Mutagenesis*. – 2003. – Vol. 18, № 5. – P. 423–428. doi:10.1093/mutage/geg013.
- Bartaula-Brevik S., Lindstad Brattas M. K. et al. Splenic tyrosine kinase (SYK) inhibitors and their possible use in acute myeloid leukemia // *Expert. Opin. Investig. Drugs*. – 2018. – Vol. 27, № 4. – P. 377–387. doi:10.1080/13543784.2018.1459562.
- 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, № 11. – P. 764–775. doi:10.1097/EJA.0000000000000668.
- Borgquist J. D., Quinn M. T., Swain S. D. Adhesion to extracellular matrix proteins modulates bovine neutrophil responses to inflammatory mediators // *J. Leukoc. Biol.* – 2002. – Vol. 71, № 5. – P. 764–774.
- 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. Toxicol. Environ. Mutagen.* – 2011. – Vol. 726, № 2. – P. 251–254. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.09.007.
- Brill A., Fuchs T. A., Savchenko A. S. et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice: NETs promote deep vein thrombosis // *J. Thromb. Haemost.* – 2012. – Vol. 10, № 1. – P. 136–144. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04544.x.

REFERENCES

- Grebenchikov O.A., Kasatkina I.S., Kadantseva K.K. et al. The effect of lithium chloride on neutrophil activation on exposure to serum of patients with septic shock. *Obschaya Reanimatologiya*, 2020, vol. 16, no. 5, pp. 45–55. (In Russ.) <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2020-5-45-55>.
- Obraztsov I.V., Godkov M.A., Kulabukhov V.V. et al. Functional activity of neutrophils in burn sepsis. *Obschaya Reanimatologiya*, 2017, vol. 13, no. 2, pp. 40–51. (In Russ.) <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2017-2-40-51>.
- Ostroumova O.D., Kochetkov A.I., Pavleeva E.E. et al. Drug-induced neutropenia and agranulocytosis. *Bezopasnost i Risk Farmakoterapii*, 2020, vol. 8, no. 3, pp. 109–122. (In Russ.) <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2020-8-3-109-122>.
- Alleva R. Lymphocyte DNA damage precedes DNA repair or cell death after orthopaedic surgery under general anaesthesia. *Mutagenesis*, 2003, vol. 18, no. 5, pp. 423–428. doi:10.1093/mutage/geg013.
- Bartaula-Brevik S., Lindstad Brattas M.K. et al. Splenic tyrosine kinase (SYK) inhibitors and their possible use in acute myeloid leukemia. *Expert. Opin. Investig. Drugs*, 2018, vol. 27, no. 4, pp. 377–387. doi:10.1080/13543784.2018.1459562.
- 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, no. 11, pp. 764–775. doi:10.1097/EJA.0000000000000668.
- Borgquist J.D., Quinn M.T., Swain S.D. Adhesion to extracellular matrix proteins modulates bovine neutrophil responses to inflammatory mediators. *J. Leukoc. Biol.*, 2002, vol. 71, no. 5, pp. 764–774.
- 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. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 2011, vol. 726, no. 2, pp. 251–254. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.09.007.
- Brill A., Fuchs T.A., Savchenko A.S. et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice: NETs promote deep vein thrombosis. *J. Thromb. Haemost.*, 2012, vol. 10, no. 1, pp. 136–144. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04544.x.

10. Butterfield T. A., Best T. M., Merrick M. A. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair // *J. Athl. Train.* - 2006. - Vol. 41, № 4. - P. 457-465. PMID: 17273473PMCID: PMC1748424.
11. De Conno E., Steurer M. P., Wittlinger M. et al. Anesthetic-induced improvement of the inflammatory response to one-lung ventilation // *Anesthesiology*. - 2009. - Vol. 110, № 6. - P. 1316-1326. doi:10.1097/ALN.0b013e3181a10731.
12. Fuchs T. A., Brill A., Duerschmied D. et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2010. - Vol. 107, № 36. - P. 15880-15885. doi:10.1073/pnas.1005743107.
13. Grommes J., Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury // *Mol. Med.* - 2011. - Vol. 17, № 3-4. - P. 293-307. doi:10.2119/molmed.2010.00138.
14. Hayes J. K., Havaleshko D. M., Plachinta R. V. et al. Isoflurane pretreatment supports hemodynamics and leukocyte rolling velocities in rat mesentery during lipopolysaccharide-induced inflammation // *Anesth. Analg.* - 2004. - Vol. 98, № 4. - P. 999-1006. doi:10.1213/01.ANE.0000104584.91385.1D.
15. Jonsson H., Allen P., Peng S. L. Inflammatory arthritis requires Foxo3a to prevent Fas ligand-induced neutrophil apoptosis // *Nat. Med.* - 2005. - Vol. 11, № 6. - P. 666-671. doi:10.1038/nm1248.
16. Karabiyik L., Şardaş S., Polat U. et al. Comparison of genotoxicity of sevoflurane and isoflurane in human lymphocytes studied in vivo using the comet assay // *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* - 2001. - Vol. 492, № 1-2. - P. 99-107. doi:10.1016/S1383-5718(01)00159-0.
17. 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, № 11. - P. 12668-12679. doi:10.1096/fj.201901360R.
18. Mortaz E., Alipoor S. D., Adcock I. M. et al. Update on neutrophil function in severe inflammation // *Front. Immunol.* - 2018. - Vol. 9. - P. 2171. doi:10.3389/fimmu.2018.02171.
19. Moss R. B., Mistry S. J., Konstan M. W. et al. Safety and early treatment effects of the CXCR2 antagonist SB-656933 in patients with cystic fibrosis // *J. Cyst. Fibros.* - 2013. - Vol. 12, № 3. - P. 241-248. doi:10.1016/j.jcf.2012.08.016.
20. Nicholson G. C., Tennant R. C., Carpenter D. C. et al. A novel flow cytometric assay of human whole blood neutrophil and monocyte CD11b levels: Upregulation by chemokines is related to receptor expression, comparison with neutrophil shape change, and effects of a chemokine receptor (CXCR2) antagonist // *Pulm. Pharmacol. Ther.* - 2007. - Vol. 20, № 1. - P. 52-59. doi:10.1016/j.pupt.2005.11.009.
21. O'Byrne P. M., Metev H., Puu M. et al. Efficacy and safety of a CXCR2 antagonist, AZD5069, in patients with uncontrolled persistent asthma: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial // *Lancet. Respir. Med.* - 2016. - Vol. 4, № 10. - P. 797-806. doi:10.1016/S2213-2600(16)30227-2.
22. Park D. W., Jiang S., Liu Y. et al. GSK3 β -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, № 10. - P. 735-745. doi:10.1152/ajplung.00165.2014.
23. 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, № 1. - P. 87. doi:10.1186/1479-5876-11-87.
24. 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, № 1. - P. 65-74. doi:10.1097/ALN.0b013e3181214b9de.
25. Schmidt T., Brodesser A., Schnitzler N. et al. CD66b overexpression and loss of C5a receptors as surface markers for staphylococcus aureus-induced neutrophil dysfunction // *PLOS ONE*. - 2015. - Vol. 10, № 7. - P. e0132703. doi:10.1371/journal.pone.0132703.
26. Serhan C. N., Levy B. D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators // *J. Clin. Invest.* - 2018. - Vol. 128, № 7. - P. 2657-2669. doi:10.1172/JCI97943.
27. Siddiqi M., Garcia Z. C., Stein D. S. et al. Relationship between oxidative burst activity and CD11b expression in neutrophils and monocytes from healthy individuals: Effects of race and gender // *Cytometry*. - 2001. - Vol. 46, № 4. - P. 243-246. doi:10.1002/cyto.1134.
28. Therrien A., Chapuy L., Bsat M. et al. Recruitment of activated neutrophils correlates with disease severity in adult Crohn's disease: Activated neutrophils in Crohn's Disease // *Clin. Exp. Immunol.* - 2019. - Vol. 195, № 2. - P. 251-264. doi:10.1111/cei.13226.
29. Westhovens R., Taylor P. C., Alten R. et al. Filgotinib (GLPG0634/GS-6034), an oral JAK1 selective inhibitor, is effective in combination with methotrexate
10. Butterfield T.A., Best T.M., Merrick M.A. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. *J. Athl. Train.*, 2006, vol. 41, no. 4, pp. 457- 465. PMID: 17273473PMCID: PMC1748424.
11. De Conno E., Steurer M.P., Wittlinger M. et al. Anesthetic-induced improvement of the inflammatory response to one-lung ventilation. *Anesthesiology*, 2009, vol. 110, no. 6, pp. 1316-1326. doi:10.1097/ALN.0b013e3181a10731.
12. Fuchs T.A., Brill A., Duerschmied D. et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2010, vol. 107, no. 36, pp. 15880-15885. doi:10.1073/pnas.1005743107.
13. Grommes J., Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol. Med.*, 2011, vol. 17, no. 3- 4, pp. 293-307. doi:10.2119/molmed.2010.00138.
14. Hayes J.K., Havaleshko D.M., Plachinta R.V. et al. Isoflurane pretreatment supports hemodynamics and leukocyte rolling velocities in rat mesentery during lipopolysaccharide-induced inflammation. *Anesth. Analg.*, 2004, vol. 98, no. 4, pp. 999-1006. doi:10.1213/01.ANE.0000104584.91385.1D.
15. Jonsson H., Allen P., Peng S.L. Inflammatory arthritis requires Foxo3a to prevent Fas ligand-induced neutrophil apoptosis. *Nat. Med.*, 2005, vol. 11, no. 6, pp. 666-671. doi:10.1038/nm1248.
16. Karabiyik L., Şardaş S., Polat U. et al. Comparison of genotoxicity of sevoflurane and isoflurane in human lymphocytes studied in vivo using the comet assay. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 2001, vol. 492, no. 1- 2, pp. 99-107. doi:10.1016/S1383-5718(01)00159-0.
17. 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, no. 11, pp. 12668-12679. doi:10.1096/fj.201901360R.
18. Mortaz E., Alipoor S.D., Adcock I.M. et al. Update on neutrophil function in severe inflammation. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9, pp. 2171. doi:10.3389/fimmu.2018.02171.
19. Moss R.B., Mistry S.J., Konstan M.W. et al. Safety and early treatment effects of the CXCR2 antagonist SB-656933 in patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.*, 2013, vol. 12, no. 3, pp. 241-248. doi:10.1016/j.jcf.2012.08.016.
20. Nicholson G.C., Tennant R.C., Carpenter D.C. et al. A novel flow cytometric assay of human whole blood neutrophil and monocyte CD11b levels: Upregulation by chemokines is related to receptor expression, comparison with neutrophil shape change, and effects of a chemokine receptor (CXCR2) antagonist. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2007, vol. 20, no. 1, pp. 52-59. doi:10.1016/j.pupt.2005.11.009.
21. O'Byrne P.M., Metev H., Puu M. et al. Efficacy and safety of a CXCR2 antagonist, AZD5069, in patients with uncontrolled persistent asthma: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Respir. Med.*, 2016, vol. 4, no. 10, pp. 797-806. doi:10.1016/S2213-2600(16)30227-2.
22. Park D.W., Jiang S., Liu Y. et al. GSK3 β -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, no. 10, pp. 735-745. doi:10.1152/ajplung.00165.2014.
23. 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, no. 1, pp. 87. doi:10.1186/1479-5876-11-87.
24. 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, no. 1, pp. 65-74. doi:10.1097/ALN.0b013e3181214b9de.
25. Schmidt T., Brodesser A., Schnitzler N. et al. CD66b overexpression and loss of C5a receptors as surface markers for staphylococcus aureus-induced neutrophil dysfunction. *PLOS ONE*, 2015, vol. 10, no. 7, pp. e0132703. doi:10.1371/journal.pone.0132703.
26. Serhan C.N., Levy B.D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *J. Clin. Invest.*, 2018, vol. 128, no. 7, pp. 2657-2669. doi:10.1172/JCI97943.
27. Siddiqi M., Garcia Z.C., Stein D.S. et al. Relationship between oxidative burst activity and CD11b expression in neutrophils and monocytes from healthy individuals: Effects of race and gender. *Cytometry*, 2001, vol. 46, no. 4, pp. 243-246. doi:10.1002/cyto.1134.
28. Therrien A., Chapuy L., Bsat M. et al. Recruitment of activated neutrophils correlates with disease severity in adult Crohn's disease: Activated neutrophils in Crohn's Disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 2019, vol. 195, no. 2, pp. 251-264. doi:10.1111/cei.13226.
29. Westhovens R., Taylor P.C., Alten R. et al. Filgotinib (GLPG0634/GS-6034), an oral JAK1 selective inhibitor, is effective in combination with

- (MTX) in patients with active rheumatoid arthritis and insufficient response to MTX: results from a randomised, dose-finding study (DARWIN 1) // *Ann Rheum Dis.* – 2017. – Vol. 76, № 6. – P. 998–1008. doi:10.1136/annrheumdis-2016-210104.
30. Xu J., Zhang X., Pelayo R. et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis // *Nat. Med.* – 2009. – Vol. 15, № 11. – P. 1318–1321. doi:10.1038/nm.2053.
- methotrexate (MTX) in patients with active rheumatoid arthritis and insufficient response to MTX: results from a randomised, dose-finding study (DARWIN 1). *Ann. Rheum. Dis.*, 2017, vol. 76, no. 6, pp. 998–1008. doi:10.1136/annrheumdis-2016-210104.
30. Xu J., Zhang X., Pelayo R. et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat. Med.*, 2009, vol. 15, no. 11, pp. 1318–1321. doi:10.1038/nm.2053.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

*НИИ общей реаниматологии
им. В. А. Неговского ФНКЦ РР,
107031, Москва,
ул. Петровка д. 25, стр. 2.
Тел.: +7 (495) 694–27–08.*

Старостин Даниил Олегович
*ассистент кафедры анестезиологии и реаниматологии
Института высшего и дополнительного
профессионального образования.
E-mail: starostin_daniil@mail.ru*

Кузовлев Артем Николаевич
*доктор медицинских наук, доцент,
заместитель директора – руководитель.
E-mail: artem_kuzovlev@mail.ru*

Гребенчиков Олег Александрович
*доктор медицинских наук, главный научный сотрудник.
E-mail: oleg.grebenchikov@yandex.ru*

Долгих Владимир Терентьевич
*доктор медицинских наук, профессор, главный научный
сотрудник, заслуженный деятель науки РФ.
E-mail: prof_dolgih@mail.ru*

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

*V.A. Negovsky National Research Institute of General
Reanimatology, Federal Research Clinical Center of
Reanimatology and Rehabilitation,
25, Build. 2, Petrovka St., Moscow, 107031.
Phone: +7 (495) 694–27–08.*

Daniil O. Starostin
*Assistant of the Department of Anesthesiology and Intensive
Care of the Institute of Higher Education and Post Graduate
Training.
Email: starostin_daniil@mail.ru*

Artem N. Kuzovlev
*Doctor of Medical Sciences, Associate Professor,
Deputy Director.
Email: artem_kuzovlev@mail.ru*

Oleg A. Grebenchikov
*Doctor of Medical Sciences, Chief Researcher.
Email: oleg.grebenchikov@yandex.ru*

Vladimir T. Dolgikh
*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head Researcher,
Honored Researcher of Russia.
Email: prof_dolgih@mail.ru*