

Влияние ксенона на провоспалительную активацию и апоптоз нейтрофилов человека в условиях *ex vivo*

О.А. Гребенчиков¹, А.К. Шабанов^{1,2}, Л.Л. Николаев³, А.И. Шпичко¹ ✉, И.В. Братищев², Л.Ю. Марченко⁴, Ш.Ж. Хусаинов^{1,2}, Р.А. Черпаков¹, Н.П. Шпичко^{1,5}

Лаборатория органопротекции при критических состояниях

¹ ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии»

Российская Федерация, 107031, Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

² ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»

Российская Федерация, 129090, Москва, Б. Сухаревская пл., д. 3

³ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования»

Российская Федерация, 125993, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1

⁴ ФГБУН «Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук»

Российская Федерация, 123007, Москва, Хорошевское ш., 76А, стр. 4

⁵ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

Российская Федерация, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

✉ Контактная информация: Шпичко Андрей Иванович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории органопротекции при критических состояниях ФНКЦ РР. Email: shpichko.a@yandex.ru

АКТУАЛЬНОСТЬ

Синдром системного воспалительного ответа, лежащий в основе повреждающего действия факторов инфекционного и неинфекционного генеза, может стать причиной полиорганной недостаточности. Степень его выраженности определяется в том числе активацией нейтрофилов. В работе освещены новые механизмы противовоспалительного действия ингаляционного анестетика ксенона, опосредованные снижением способности нейтрофилов к провоспалительной реакции.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить влияние ксенона на активацию нейтрофилов человека в условиях *ex vivo*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведено изучение влияния ингаляции ксенона на снижение способности нейтрофилов к провоспалительной активации путем снижения экспрессии молекул адгезии *CD11b* и *CD66b* на поверхности нейтрофилов и на фосфорилирование провоспалительных киназ: *ERK1/2* и киназы – *p38* в нейтрофилах здоровых добровольцев.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Применение ксенона в дозе 30 об. % в течение 60 минут у здоровых добровольцев статистически значимо снижает способность нейтрофилов к провоспалительной активации. Добавление к среде инкубации нейтрофилов липополисахарида (ЛПС) вызывает их выраженную активацию, статистически значимо увеличивая фосфорилирование ключевых провоспалительных киназ нейтрофилов *ERK1/2* и киназы – *p38*. Ингаляция ксенона у добровольцев (30% в течение 60 минут) обладает выраженным противовоспалительным эффектом на нейтрофилы, стимулированные ЛПС, уменьшая их активацию путем ингибирования провоспалительной киназы *ERK1/2* и провоспалительной MAP-киназы *p38*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование, выполненное на выделенных нейтрофилах добровольцев, которым была проведена ингаляция ксенона, выявило противовоспалительные свойства инертного газа ксенона, что, на наш взгляд, может иметь прямое отношение к выявлению механизма его нейрорепротекторных свойств. Таким образом, имеющиеся на сегодняшний день результаты исследований позволяют предположить, что ксенон имеет выраженный плеiotропный механизм защиты головного мозга. Это и частичная блокада *NMDA*-рецепторов, и фосфорилирование фермента гликогенсинтазы-3 β , и ограничение воспалительной активации нейтрофилов.

ВЫВОДЫ

Ингаляция ксенона у добровольцев (30% в течение 60 минут) обладает выраженным противовоспалительным эффектом на нейтрофилы, стимулированные липополисахаридами, уменьшая их активацию путем ингибирования провоспалительной киназы *ERK1/2* и провоспалительной MAP-киназы *p38*, а также снижая экспрессию маркеров активации и дегрануляции *CD11b* и *CD66b* на поверхности нейтрофилов. Стимуляция липополисахаридами статистически значимо уменьшает спонтанный апоптоз нейтрофилов, в то время как ксенон увеличивает способность нейтрофилов к апоптозу, что, вероятно, будет способствовать разрешению воспаления.

Ключевые слова:

синдром системного воспалительного ответа (ССВО), ксенон, нейтрофилы

Ссылка для цитирования	Гребенчиков О.А., Шабанов А.К., Николаев Л.Л., Шпичко А.И., Братищев И.В., Марченко Л.Ю. и др. Влияние ксенона на провоспалительную активацию и апоптоз нейтрофилов человека в условиях <i>ex vivo</i> . Журнал им. Н.В. Склифосовского Неотложная медицинская помощь. 2021;10(3):511–520. https://doi.org/10.23934/2223-9022-2021-10-3-511-520
Конфликт интересов	Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов
Благодарность, финансирование	Исследование не имеет спонсорской поддержки

АПК — анестетическое прекондиционирование
 ЛПС — липополисахариды
 ССВО — синдром системного восстановительного ответа
 у.е.л. — условные единицы хемилюминесценции

у.е.ф. — условные единицы флуоресценции
 ICAM-1 — (*Inter Cellular Adhesion Molecule*)
 молекула клеточной адгезии, которая экспрессируется эндотелием

ВВЕДЕНИЕ

Синдром системного воспалительного ответа (ССВО) — это ответная реакция организма на повреждающие воздействия инфекционного (бактерии, вирусы) и неинфекционного (ожоги, тяжелая сочетанная травма, оперативные вмешательства большого объема) генеза [1, 2]. Степень выраженности ССВО определяется продукцией провоспалительных цитокинов, хемокинов, последующей активацией нейтрофилов и макрофагов, их проникновением через гистогематические барьеры и инфильтрацией лейкоцитами и цитокинами тканей органов-мишеней [3], что в случае гиперовоспалительного ответа может стать причиной развития полиорганной недостаточности, которая на сегодняшний день является основной причиной смертельных исходов в отделениях реанимации. Нейтрофилы играют важную роль в развитии, регуляции и разрешении воспаления. Иммунный ответ на инфекцию и повреждение тканей берет начало с секреции нейтрофилами и макрофагами провоспалительных и прогнатовоспалительных цитокинов и направлен на удаление повреждающего агента и восстановление гомеостаза [4, 5].

На сегодняшний день известно, что наиболее чувствительными маркерами активации и дегрануляции нейтрофилов являются белковые молекулы *CD11b* и *CD66b*, которые находятся во внутриклеточных гранулах [6, 7]. Воспалительные стимулы приводят к тому, что гранулы сливаются с цитоплазматической мембраной, а молекулы *CD11b* и *CD66b* экспрессируются на поверхности нейтрофилов (рис. 1). Этот процесс называется дегрануляцией. Известно, что *CD11b* взаимодействует с рецепторами молекул клеточной адгезии *ICAM-1* на эндотелии, тем самым обеспечивая адгезию нейтрофилов к эндотелиальным клеткам; этот момент является начальной стадией их дальнейшей миграции к очагу воспаления [8]. В то же время белковая молекула *CD66b* обеспечивает агрегацию нейтрофилов [6]. В клинической диагностике определение экспрессии молекул *CD11b* и *CD66b* на поверхности нейтрофилов используется достаточно давно, а также известно, что их уровень повышается при сепсисе и тяжелой сочетанной травме [7, 9].

Согласно современным представлениям, нейтрофилы — это достаточно короткоживущие лейкоциты: после выхода из костного мозга средний срок жизни нейтрофилов составляет 4–5 дней [10]. В течение этого времени нейтрофилы выходят из костного мозга, созревают и стареют. В условиях физиологической нормы старение нейтрофилов сопровождается увеличением экспрессии рецептора хемокинов *CXCR4*, что приводит к миграции нейтрофилов в костный мозг, печень и

другие органы, где они подвергаются апоптозу и фагоцитируются макрофагами [11]. Апоптоз — крайне важный и сложно регулируемый этап в жизненном цикле нейтрофилов, поскольку слишком быстрая и массовая смерть нейтрофилов приведет к нейтропении и подверженности организма инфекциям, а излишне долгая жизнь — наоборот, может вызвать хроническое воспаление [12]. Критические состояния, обусловленные ишемически-реперфузионными повреждениями и избыточным ССВО, являются стимулом для высвобождения медиаторов воспаления и мобилизации лейкоцитов. Важно отметить, что активированные человеческие нейтрофилы активно продуцируют глутамат и содержат более высокий уровень *NMDA*-рецепторов [13–15]. В недавнем исследовании было показано, что ингибирование *NMDA*-рецепторов нейтрофилов снижает аутокринное высвобождение глутамата и уровень окислительного стресса, опосредованного активацией нейтрофилов [16].

На сегодняшний день общепринято считать, что анестетические свойства ксенона обусловлены его способностью ингибировать *NMDA*-рецепторы [17, 18]. Результаты недавних исследований, которые показали, что активированные человеческие нейтрофилы активно продуцируют глутамат и содержат более высокий уровень *NMDA*-рецепторов, позволяют предположить, что ингаляционный анестетик ксенон, возможно, способен препятствовать избыточной активации нейтрофилов путем ингибирования их *NMDA*-рецепторов.

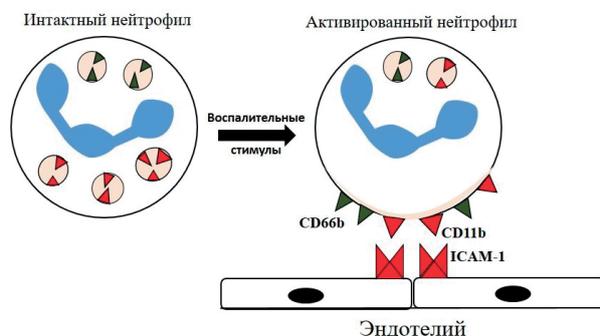


Рис. 1. Активация нейтрофилов и экспрессия ими молекул адгезии *CD11b* (красный треугольник) и *CD66b* (зеленый треугольник) под действием воспалительного стимула
 Примечание: *ICAM-1* — молекула клеточной адгезии, которая экспрессируется эндотелием

Fig. 1. Activation of neutrophils and their expression of adhesion molecules *CD11b* (red triangle) and *CD66b* (green triangle) under the action of an inflammatory stimulus

Note: *ICAM-1* is a cell adhesion molecule that is expressed by the endothelium

Таким образом, **цель данной работы** — исследование влияния ксенона на активацию нейтрофилов человека в условиях *ex vivo*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

После получения информированного согласия в исследовании было использовано 20 образцов сыворотки крови от 10 практически здоровых добровольцев (10 образцов сыворотки крови забирали у доноров до ингаляции ксенона и 10 образцов сыворотки крови забирали у этих же доноров после ингаляции ксенона).

Здоровым добровольцам, средний возраст которых составил 35,6 [28,7; 45,0] года, в условиях стационара был проведена ингаляция ксенона по закрытому контуру на наркозном аппарате «КСЕНА-010» (ООО «ПМТ», Россия) составом дыхательной газовой смеси, содержащий ксенон в концентрации 30 об.%, кислород в концентрации не более 40 об.%. Остальной компонент смеси — атмосферный азот. Мониторинг анестезии проводился по Гарвардскому стандарту. Длительность ингаляции ксенона у всех пациентов составила 60 минут. Течение анестезии во всех случаях было гладким, гемодинамика пациентов стабильная.

Нейтрофилы здоровых доноров после ингаляции газовой смесью, содержащей ксенон, продолжительностью 60 минут были выделены по следующей методике: использовали гепаринизированную венозную кровь, которую смешивали с раствором декстрана T-500 (*Pharmacosmos*, Дания) до конечной концентрации декстрана 1% и оставляли при комнатной температуре на 30 минут для осаждения эритроцитов. Верхний слой плазмы (обогащенный лейкоцитами и лишенный эритроцитов) наслаивали на Фиколл (ПанЭко, Россия) с плотностью 1,077 г/мл и центрифугировали при комнатной температуре при 300 g 30 минут в центрифуге с отключенным тормозом. Затем удаляли супернатант и все дальнейшие процедуры проводили на льду с использованием охлажденных растворов. Удаление эритроцитов проводили с помощью ресуспендирования осадка в 2 мл деионизированной стерильной воды в течение 45 секунд, а затем добавляли 2 мл 2-кратного PBS (*Phosphate buffered saline*, натрий-фосфатный буфер) для восстановления тоничности и центрифугировали при 200 g при температуре +4°C на протяжении 10 минут. Осажденные нейтрофилы промывали PBS и ресуспендировали в культуральной среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), 10% FBS с низким содержанием эндотоксинов).

Активацию (дегрануляцию) нейтрофилов измеряли с помощью антител, конъюгированных с флуоресцентными красителями CD11b-FITC и CD66b-AlexaFluor647 (*BD Biosciences*, США) согласно протоколу производителя.

С целью определения влияния ксенона на дегрануляцию нейтрофилов к концентрату клеток 4 млн/мл от здоровых доноров добавляли липополисахариды (ЛПС) в дозе 200 нг/мл и инкубировали 30 минут при температуре +37°C. Затем добавляли антитела и инкубировали 30 минут во льду, после чего измеряли уровень флуоресценции (условные единицы флуоресценции, у.е.ф.) на проточном цитофлуориметре *Beckman-Coulter FC 500*.

Апоптоз нейтрофилов. С целью определения апоптоза нейтрофилов от 6 здоровых доноров их инкубировали с ЛПС в дозе 200 нг/мл в течение 22 часов при

температуре +37°C в увлажненном CO₂-инкубаторе. Затем клетки центрифугировали при 400 g в течение 5 минут и ресуспендировали осадок в 70 мкл буфера (10 mM HEPES, 120 mM хлорида натрия, 2,5 mM хлорида кальция, pH=7,4). К каждой пробе добавляли 2,5 мкл аннексина V, конъюгированного с флуоресцентным красителем FITC (*ThermoFisher*, США) и оставляли на 25 минут при температуре +37°C. Далее добавляли иодид пропидия до конечной концентрации 5 мкг/мл, инкубировали еще 5 минут, после чего анализировали не менее 50 тысяч клеток с помощью проточного цитофлуориметра *Beckman Coulter CytoFLEX*. Апоптотическими считали аннексин V-положительные и пропидий иодид-отрицательные клетки.

Иммуноблоттинг. Электрофорез белков проводили в 12,5% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Образцы растворяли в буфере, содержащем 0,125 M Трис-HCl (pH 6,8), 4% додецилсульфата натрия (*Sigma Chemical Co.*, США), 20% глицерина, 0,005% бромфенола синего (*Sigma Chemical Co.*, США) и 10% 2β-меркаптоэтанола (*Merck*, Германия). Образцы кипятили 2 мин на водяной бане и вносили в лунки для геля. Для приготовления разделяющего геля использовали 30% смесь акриламида (*Sigma Chemical Co.*, США) и бис-акриламида (*Sigma Chemical Co.*, США) (37,5:1), которую разводили до 12,5% 1,5 M Трис-HCl буфером (pH=8,8) и водой до конечной концентрации Трис-HCl 375 mM. В смесь также добавляли додецилсульфат натрия до 0,1%, персульфат аммония (*Sigma Chemical Co.*, США) до 0,1% и ТЕМЕД (тетраметилэтилендиамин, *Acros*, Бельгия) до 0,1%. Для приготовления концентрирующего геля 30% смесь акриламида и бис-акриламида разводили до 5% 1 M Трис-HCl буфером (pH=6,8) и водой до конечной концентрации Трис-HCl 125 mM. В смесь также добавляли 0,1% додецилсульфата натрия, 0,1% персульфат аммония и 0,1% ТЕМЕД. В работе использовали стекла 8x10 см со спейсерами толщиной 1 мм. Для проведения электрофореза использовали Трис-глициновый электродный буфер, содержащий 25 mM Трис-HCl, 192 mM глицин, 0,1% додецилсульфата натрия, pH=8,3. Электрофорез проводили при постоянном токе силой 10 mA в режиме концентрирования и силой 15 mA — в режиме разделения. По окончании электрофореза переносили белки на PVDF-мембрану (*Amersham Pharmacia Biotech*, Великобритания). Перенос проводили полусухим методом в течение 2 часов при 200 mA, 20 V. Качество переноса оценивали окрашиванием части геля и окрашиванием мембраны 2% раствором *Ponceau* (*Sigma Chemical Co.*, США). Мембраны блокировали 12 часов при температуре +40°C в трис-буферной среде (*Sigma Chemical Co.*, США), содержащей 5% обезжиренного сухого молока. Затем мембраны промывали трис-буферной средой 3 раза по 10 минут и инкубировали 2 часа при комнатной температуре с первичными антителами (против GSK-3β или фосфорилированной формы GSK-3β) в разведении 1:1000 в трис-буферной среде в растворе, содержащем 0,5% бычьего сывороточного альбумина (*Calbiochem*) и 0,01% Tween-20 (*Sigma Chemical Co.*). Мембраны три раза по 15 минут промывали в TBS, содержащем 0,01% Tween-20 и инкубировали 1 час с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в разведении 1:10000 в трис-буферной среде, содержащем 0,01% Tween-20. После финальной отмывки от несвязанных антител полосы детектировали с помощью хемиллюминесцентного субстрата пероксидазы хрена *ECL*

(Enhanced chemiluminescence system, Amersham Pharmacia Biotech, Бельгия). Хемилюминесценция детектировалась на фотопленку Kodak Professional T-MAX P3200 TMZ 135-36 (Kodak, США). Изображения оцифровывали на сканере Epson Perfection V750 Pro (Seiko Epson Corp., Япония) и анализировали с помощью программы ImageJ.

Содержание фосфорилированной формы ERK1/2 и p-38 выражали в условных единицах хемилюминесценции (у.е.л.).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как видно из табл. 1, уровень экспрессии CD11b на поверхности интактных нейтрофилов (здоровые добровольцы) составил 3577,50 [3389,0–3889,0] условных единиц флуоресценции (у.е.ф.). Провоспалительная стимуляция выделенных нейтрофилов ЛПС в дозе 200 нг/мл статистически значимо в среднем в 4,5 раза — до 16 124,5 [15 035,0–17 343,0] у.е.ф. ($p=0,005$) увеличивает экспрессию CD11b на их поверхности.

Сразу после окончания ингаляции ксенона у здоровых добровольцев (30 об.% в течение 60 минут) были выделены нейтрофилы, у которых была выполнена провоспалительная стимуляция (ЛПС — 200 нг/мл). Результаты проведенных исследований показали, что стимуляция ЛПС статистически значимо увеличивает экспрессию CD11b на поверхности нейтрофилов в 1,8 раза — 6 475,0 [5 388,0–7 778,0] у.е.ф. ($p=0,005$).

Таким образом, ингаляция ксеноном в дозе 30 об.% в течение 60 минут статистически значимо в 2,5 раза ($p=0,005$) снижает способность нейтрофилов к провоспалительной активации.

Как видно из табл. 2, уровень экспрессии CD66b на поверхности интактных нейтрофилов (здоровые добровольцы) составил 10778,0 [10088,0–11555,0] у.е.ф. Провоспалительная стимуляция ЛПС в дозе 200 нг/мл в 2 раза, до 21 475,0 [18 115,0–24 156,0] у.е.ф. ($p=0,005$), увеличивает экспрессию CD66b на поверхности нейтрофилов.

После ингаляции ксенона 30 об.% в течение 60 минут стимуляции (ЛПС) в дозе 200 нг/мл статистически значимо увеличивает экспрессию CD66b на поверхности нейтрофилов в 1,3 раза ($p=0,028$) в сравнении с контролем.

Таким образом, ингаляция ксенона (30 об.% в течение 60 минут) статистически значимо более, чем в 1,5 раза ($p=0,013$) снижает экспрессию CD66b на поверхности нейтрофилов в сравнении с группой, где интактные нейтрофилы инкубировались с ЛПС (200 нг/мл).

В табл. 3 представлены результаты влияния ЛПС 200 нг/мл на уровень апоптоза нейтрофилов человека через 22 часа после выделения в сравниваемых группах, количественная оценка проведена с использованием аннексина V и йодистого пропидия на проточном цитофлуориметре. Результаты исследования показали, что спонтанный апоптоз нейтрофилов через 22 часа после выделения составляет 56,3%. Добавление в среду инкубации нейтрофилов ЛПС (200 нг/мл) статистически значимо уменьшает количество нейтро-

Таблица 1

Уровень экспрессии CD11b на поверхности нейтрофилов при воздействии ЛПС и их комбинации с ксеноном

Table 1

The level of expression of CD11b on the surface of neutrophils upon exposure to lipopolysaccharides and their combination with xenon

Группа	Экспрессия CD11b, у.е.ф., медиана [межквартильный интервал]	p, статистическая значимость относительно данных по интактным нейтрофилам (1-я строка)	p, статистическая значимость относительно данных по инкубации нейтрофилов с ЛПС (2-я строка)
Интактные нейтрофилы	3577,50 [3389,0–3889,0]		
Инкубация нейтрофилов с ЛПС (200 нг/мл)	16 124,5 [15 035,0–17 343,0]	0,005	
Ксенон + ЛПС 200 нг/мл	6475,0 [5388,0–7778,0]	0,005	0,005

Примечание: ЛПС — липополисахариды
Note: ЛПС — lipopolysaccharides

Таблица 2

Уровень экспрессии CD66b на поверхности нейтрофилов при воздействии ЛПС и их комбинации с ксеноном

Table 2

The level of expression of CD66b on the surface of neutrophils upon exposure to lipopolysaccharides and their combination with xenon

Группа	Экспрессия CD66b, у.е.ф., медиана [межквартильный интервал]	p, статистическая значимость относительно данных по интактным нейтрофилам (1-я строка)	p, статистическая значимость относительно данных по инкубации нейтрофилов с ЛПС (2-я строка)
Интактные нейтрофилы (контроль)	10778,0 [10088,0–11555,0]		
Инкубация нейтрофилов с ЛПС (200 нг/мл)	21 475,0 [18 115,0–24 156,0]	0,005	
Ксенон + ЛПС 200 нг/мл	14 030,0 [11 988,0–14 976,0]	0,028	0,013

Примечание: ЛПС — липополисахариды
Note: ЛПС — lipopolysaccharides

филов, которые подверглись спонтанному апоптозу на 60% до 22,6% ($p=0,028$).

Нейтрофилы, выделенные сразу после ингаляции ксенона (30 об.% в течение 60 минут), почти в 2 раза — до 41,35% статистически значимо увеличивают способность нейтрофилов к спонтанному апоптозу ($p=0,028$).

Результаты исследования показали, что добавление ЛПС в среду инкубации нейтрофилов статистически значимо уменьшает спонтанный апоптоз нейтрофилов и способствует формированию условий для поддержания воспаления, а применение ксенона увеличивает способность нейтрофилов к спонтанному апоптозу и, вероятно, будет способствовать разрешению воспаления.

На сегодняшний день известно, что активацию нейтрофилов регулирует так называемый MAP-киназный каскад, суть которого состоит в фосфорилировании ERK1/2-киназы и MAP-киназы p38, которые быстро активируются в ответ на провоспалительные сигналы [19]. В настоящем исследовании было изучено действие ЛПС в дозе 200 нг/мл и ксенона (30% в течение 60 минут) на фосфорилирование киназ: ERK1/2 и киназы — p38 в нейтрофилах здоровых добровольцев.

Результаты выполненного исследования показали, что киназа ERK1/2 в нейтрофилах быстро и статистически значимо активируется (фосфорилируется)

Таблица 3

Уровень апоптоза нейтрофилов в результате действия ЛПС и их комбинации с ксеноном

Table 3

The level of apoptosis of neutrophils as a result of the action of lipopolysaccharides and their combination with xenon

Показатели	Добровольцы						Медиана [межквартильный интервал]	p, статистическая значимость различий по отношению к данным по контролю (1-я строка)	p, статистическая значимость относительно нейтрофилов с ЛПС (2-я строка)
	1	2	3	4	5	6			
Интактные нейтрофилы (контроль)	55,8	59,0	54,9	55,3	56,8	57,1	56,3 [55,3–57,0]		
Инкубация нейтрофилов с ЛПС, 200 нг/мл	20,7	24,0	22,4	23,3	22,8	21,9	22,6 [21,9–23,3]	0,028	
Ксенон+ЛПС 200 нг/мл	38,4	41,5	42,3	40,7	41,2	42,1	41,35 [40,70–42,10]	0,028	0,028

Примечания: статистическая значимость межгрупповых различий $p=0,028$. ЛПС – липополисахариды
Notes: the statistical significance of the between-group differences is $p=0,028$. ЛПС – lipopolysaccharides

в ответ на стимуляцию ЛПС в 2 раза, до 1 098 976 [998 767–1 196 343] у.е.л. в сравнении с контролем 545 789 [515 878–587 977] у.е.л. ($p<0,05$), экспозиция ксенона статистически значимо в 3 раза, до 183 925 [155 937–225 521] у.е.л. ($p<0,05$), снижает фосфорилирование киназы – ERK1/2 в сравнении с контролем (инкубация с сывороткой добровольцев), провоспалительная стимуляция ЛПС после экспозиции ксенона статистически незначимо увеличивает фосфорилирование ERK1/2 в 1,4 раза в сравнении с контролем до 780 905 [652 554–897 348] у.е.л. ($p>0,05$). Данные представлены на рис. 2 и в табл. 4.

Исследование показало, что содержание киназы – p38 в интактных нейтрофилах составило 407 754 [400 343–476 699] у.е.л., а стимуляция интактных нейтрофилов ЛПС статистически значимо в 5 раз увеличивает фосфорилирование киназы – p38 до 2 025 323 [1 999 765–2 300 332] у.е.л. ($p<0,05$), ингаляция ксенона снижает фосфорилирование киназы – p38 в выделенных после анестезии нейтрофилах по сравнению с контролем ($p<0,05$). Провоспалительная стимуляция ЛПС после ксенона статистически значимо не увеличивает фосфорилирование – p38 ($p>0,05$). Данные представлены на рис. 3 и в табл. 5.

Таким образом, добавление ЛПС к среде инкубации нейтрофилов ЛПС вызывает их выраженную активацию, статистически значимо увеличивая фосфорилирование ключевых провоспалительных киназ нейтрофилов ERK1/2 и киназы – p38. Ингаляция ксенона у добровольцев (30% в течение 60 минут) обладает выраженным противовоспалительным эффектом на нейтрофилы, стимулированные ЛПС, уменьшая их активацию путем ингибирования провоспалительных киназ ERK1/2 и MAP-киназы p38.

ОБСУЖДЕНИЕ

Неразрешаемое воспаление, сопровождаемое гибелью множества клеток и развитием полиорганной недостаточности, несовершенные иммунные реакции и повышенная восприимчивость к инфекционным возбудителям являются основными причинами, лежащими в основе высокого риска смерти, характерного для критических состояний. Это обуславливает поиск новых подходов для патогенетического воздействия на данные причины. На сегодняшний день нет достаточно эффективных методов купирования гиперактивированного состояния иммунной системы. Поэтому одной из важнейших задач современной реаниматологии является поиск препаратов для профилактики и лечения ССВО с целью предотвращения последующих осложнений. Исследования последнего десятилетия выявили у ксенона помимо анестетических свойств

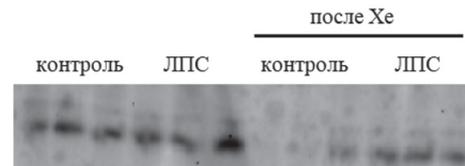


Рис. 2. Вестерн-иммуноблоттинг содержания фосфо – ERK1/2 в выделенных нейтрофилах после воздействия ЛПС в дозе 200 нг/мл и после ингаляции ксеноном у здоровых добровольцев (30 об.%) и воздействия ЛПС в дозе 200 нг/мл на нейтрофилы после ингаляции ксеноном (30%) (контроль – сыворотка здоровых добровольцев; ЛПС – липополисахарид; после Хе-экспозиции ксенона (30%) в течение 60 минут)

Fig. 2. Western blotting for phospho – ERK 1/2 content in isolated neutrophils after exposure to LPS at a dose of 200 ng/ml and after inhalation of xenon in healthy volunteers (30 vol.%) and exposure to LPS at a dose of 200 ng/ml on neutrophils after xenon inhalation (30%) (control – serum of healthy volunteers; LPS – lipopolysaccharide; after Xe-exposure (30%) for 60 minutes)

Таблица 4

Денситометрический анализ Вестерн-блотов на содержание в нейтрофилах киназы фосфо – ERK1/2 после воздействия ЛПС, экспозиции ксенона и воздействия ЛПС после экспозиции ксенона, Me [LQ–HQ]

Table 4

Densitometric analysis of Western blots for the content of phospho-ERK1/2 kinase in neutrophils after exposure to lipopolisaccharides, exposure to xenon and exposure to lipopolisaccharides after exposure to xenon, Me [LQ–HQ]

Группа	Содержание фосфорилированной киназы ERK1/2 (у.е.л.), медиана [межквартильный интервал]	%
Контроль (нейтрофилы при воздействии сыворотки добровольцев)	545 789 [515 878–587 977]	100
Нейтрофилы добровольцев после воздействия ЛПС (200 нг/мл)	1 098 976* [998 767–1 196 343]	203
Нейтрофилы добровольцев после ингаляции ксенона 30 об.%	183 925 [155 937–225 521]*	31
Нейтрофилы добровольцев после ингаляции ксенона 30 об.% и воздействия ЛПС (200 нг/мл)	780 905 [652 554–897 348]	139

Примечания: * – $p<0,05$ относительно контроля (воздействие сыворотки здоровых доноров). ЛПС – липополисахариды
Notes: * – $p<0,05$ relative to control (exposure to serum from healthy donors). ЛПС – lipopolisaccharides

еще и хорошие органопротекторные свойства [18, 20, 21].

Хорошо известно, что ингаляционные галогенсодержащие анестетики обладают не только способностью благоприятно влиять на кислородный баланс органов и тканей, но и обладают органопротектор-

ными свойствами [22]. Речь идет о специфическом воздействии ингаляционных анестетиков на жизненно важные органы, повышающем их устойчивость к ишемии, которое получило название анестетическое preconditionирование (АПК) [23, 24]. Обсуждаются в научной литературе и их противовоспалительные свойства [25]. В то же время молекулярные механизмы реализации органопротекторных свойств ксенона остаются неизученными и вполне оправданным представляется их поиск в модельных экспериментах *in vivo* и *in vitro*. Недавнее исследование *in vivo* показало, что возможным механизмом нейропротекторного действия ксенона является фосфорилирование фермента гликогенсинтазы-3 β в головном мозге экспериментальных животных, которое препятствует открытию митохондриальной поры, тормозя опосредованный гибелью митохондрий апоптоз нейронов и увеличивая в них уровень антиоксидантной защиты [26]. Важно отметить: ранее было показано, что ингаляционные галогенсодержащие анестетики также оказывают влияние на фосфорилирование киназы гликогенсинтазы-3 β , ключевой фермент противоишемической защиты клеток мозга [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование, выполненное на выделенных нейтрофилах добровольцев, которым была проведена ингаляция ксенона, выявило его противовоспалительные свойства, что, на наш взгляд, может иметь прямое отношение к выявлению механизма его нейропротекторных свойств. Хорошо известно, что очаг поражения головного мозга ишемического или травматического генеза характеризуется выраженной зоной перифокального воспаления и ограничение избыточного воспаления в этой зоне может иметь существенный нейропротекторный потенциал [28, 29]. Таким образом, имеющиеся на сегодняшний день результаты исследований позволяют предположить, что ксенон имеет выраженный плейотропный механизм защиты головного мозга. Это и частичная блокада *NMDA*-рецепторов, и фосфорилирование фермента гликогенсинтазы-3 β , и ограничение воспалительной активации нейтрофилов.

ВЫВОДЫ

1. Ингаляция ксенона у добровольцев (30% в течение 60 минут) обладает выраженным противовоспалительным эффектом на нейтрофилы. Так, экспозиция ксенона статистически значимо в 3 раза, до 183 925 у.е.л. ($p < 0,05$), снижает фосфорилирование киназы — ERK1/2 в сравнении с контролем — 545 789 у.е.л. (инкубация с сывороткой добровольцев), провоспалительная стимуляция ЛПС после экспозиции ксенона статистически незначимо увеличивает фосфорилирование ERK1/2 в 1,4 раза в сравнении с контролем до 780 905 [652 554–897 348] у.е.л. ($p > 0,05$). Ингаляция ксенона статистически значимо в 3 раза снижает фосфорилирование киназы — *p38* в выделенных после анестезии нейтрофилах по сравнению с контролем — с 407 754 у.е.л. до 133 925 ($p < 0,05$), а провоспалительная стимуляция нейтрофилов ЛПС после ингаляции ксенона статистически незначимо увеличивает фос-

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Balk RA. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): Where did it come from and is it still relevant today? *Virulence*. 2014;5(1):20–26. PMID: 24280933 <https://doi.org/10.4161/viru.27135>

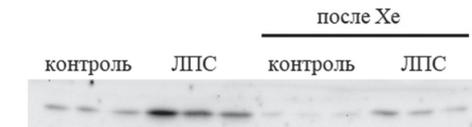


Рис. 3. Вестерн-иммуноблоттинг содержания в нейтрофилах киназы фосфо — *p38* после воздействия ЛПС в дозе 200 нг/мл и экспозиции ксенона (30%) на фоне воздействия ЛПС в дозе 200 нг/мл (контроль — сыворотка добровольцев; ЛПС — липополисахарид; после Хе-экспозиции ксенона (30%) в течение 60 минут)

Fig. 3. Western immunoblotting of the content of phospho-p38 kinase in neutrophils after exposure to LPS at a dose of 200 ng/ml and exposure to xenon (30%) against the background of exposure to LPS at a dose of 200 ng/ml (control — serum of volunteers; LPS — lipopolysaccharide; after Xe-exposure (30%) for 60 minutes)

Таблица 5

Денситометрический анализ Вестерн-блотов на содержание в нейтрофилах киназы фосфо-*p38* после воздействия ЛПС, ингаляции ксенона и воздействия ЛПС после ксенона, Me [LQ–HQ]

Table 5

Densitometric analysis of Western blots for the content of phospho-p38 kinase in neutrophils after exposure to lipopolysaccharides, inhalation of xenon and exposure to lipopolysaccharides after xenon, Me [LQ–HQ]

Группа	Содержание фосфорилированной киназы фосфо- <i>p38</i> (у.е.л.), медиана [межквартильный интервал]	%
Контроль (нейтрофилы при воздействии сыворотки добровольцев)	407 754 [400 343–476 699]	100
Нейтрофилы при воздействии ЛПС (200 нг/мл)	2 025 323* [1999 765–2 300 332]	496
Нейтрофилы после экспозиции ксенона 30 об.%	133 925 [121 954–171 452]*	33
Нейтрофилы после ингаляции ксенона 30 об.% и воздействия ЛПС (200 нг/мл)	477 898 [421 222–499 543]	117

Примечания: * — $p < 0,05$ относительно контроля (воздействие сыворотки здоровых доноров). ЛПС — липополисахариды
Notes: * — $p < 0,05$ relative to control (exposure to serum from healthy donors). ЛПС — lipopolysaccharides

форилирование киназы — *p38* ($p > 0,05$). Кроме того, на поверхности нейтрофилов отмечается снижение экспрессии маркеров активации и дегрануляции в 2,5 раза (группа инкубации с ЛПС 16 124,5 у.е.ф., группа ксенон+липополисахариды 6475,0 у.е.ф., $p = 0,005$) и *CD66b* более чем в 1,5 раза (группа инкубации с ЛПС 21 475,0 у.е.ф., группа ксенон+липополисахариды 14 030,0 у.е.ф., $p = 0,015$).

2. Стимуляция липополисахаридами сопровождается статистически значимым уменьшением спонтанного апоптоза нейтрофилов на 60% (с 56,3% до 22,6%, $p = 0,028$), в то время как использование ксенона (30 об.% в течение 60 минут) приводит к статистически значимому увеличению способности нейтрофилов к апоптозу в 2 раза ($p = 0,028$), что, вероятно, и может способствовать разрешению воспаления.

3. Alexander JJ, Jacob A, Cunningham P, Hensley L, Quigg RJ. TNF is a key mediator of septic encephalopathy acting through its receptor, TNF receptor-1. *Neurochem Int.* 2008;52(3):447–456. PMID: 17884256 <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.08.00>
4. Jaffer U, Wade RG, Gourlay T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth.* 2010;2(3):161–175. PMID: 23441054
5. Guisasaola MC, Alonso B, Bravo B, Vaquero J, Chana F. An overview of cytokines and heat shock response in polytraumatized patients. *Cell Stress Chaperones.* 2018;23(4):483–489. PMID: 29101529 <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0859-9>
6. Schmidt T, Zündorf J, Grüger T, Brandenburg K, Reiners AL, Zinserling J, et al. CD66b overexpression and homotypic aggregation of human peripheral blood neutrophils after activation by a gram-positive stimulus. *J Leukoc Biol.* 2012;91(5):791–802. PMID: 22319104 <https://doi.org/10.1189/jlb.0911483>
7. Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CG, et al. Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Int Care Med.* 2000;26(7):883–892. PMID: 10990102 <https://doi.org/10.1007/s001340051277>
8. Parkos CA, Colgan SP, Madara JL. Interactions of neutrophils with epithelial cells: lessons from the intestine. *J Am Soc Nephrol.* 1994;5(2):138–152. PMID: 7993993 <https://doi.org/10.1681/ASN.V52138>
9. Mortaz E, Zadian SS, Shahir M, Folkerts G, Garssen J, Mumby S, et al. Does Neutrophil Phenotype Predict the Survival of Trauma Patients? *Front Immunol.* 2019;10:2122. PMID: 31552051 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02122>
10. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, et al. In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 2010;116(4):625–627. PMID: 20410504 <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-259028>
11. Yuyun X, Fan Y, Weiping W, Qing Y, Bingwei S. Metabolomic analysis of spontaneous neutrophil apoptosis reveals the potential involvement of glutathione depletion. *Innate Immun.* 2021;27(1):31–40. PMID: 32910715 <https://doi.org/10.1177/1753425920951985>
12. Bartels M, Murphy K, Rieter E, Bruin M. Understanding chronic neutropenia: life is short. *Br J Haematol.* 2016;172(2):157–169. PMID: 26456767 <https://doi.org/10.1111/bjh.13798>
13. Collard CD, Park KA, Montalto MC, Alapati S, Buras JA, Stahl GL, Colgan SP. Neutrophil-derived glutamate regulates vascular endothelial barrier function. *J Biol Chem.* 2002;277(17):14801–14811. PMID: 11847215 <https://doi.org/10.1074/jbc.M110557200>
14. Kotz KT, Xiao W, Miller-Graziano C, Qian WJ, Russom A, Warner EA, et al. Clinical microfluidics for neutrophil genomics and proteomics. *Nat Med.* 2010;16(9):1042–1047. PMID: 20802500 <https://doi.org/10.1038/nm.2205>
15. Dorsett CR, McGuire JL, DePasquale EA, Gardner AE, Floyd CL, McCullumsmith RE. Glutamate Neurotransmission in Rodent Models of Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 2017;34(2):263–272. PMID: 27256113 <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4373>
16. Del Arroyo AG, Hadjihambi A, Sanchez J, Turovsky E, Kasymov V, Cain D, et al. NMDA receptor modulation of glutamate release in activated neutrophils. *EBioMedicine.* 2019;47:457–469. PMID: 31401196 <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.004>
17. de Sousa SL, Dickinson R, Lieb WR, Franks NP. Contrasting synaptic actions of the inhalational general anesthetics isoflurane and xenon. *Anesthesiology.* 2000;92(4):1055–1066. PMID: 10754626 <https://doi.org/10.1097/0000542-200004000-00024>
18. Гребенчиков О.А., Молчанов И.В., Шпичко А.И., Евсеев А.К., Шабанов А.К., Хусаинов Ш.Ж., и др. Нейропротективные свойства ксенона по данным экспериментальных исследований. *Журнал им. Н.В. Склифосовского Неотложная медицинская помощь.* 2020;9(1):85–95. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2020-9-1-85-95>
19. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature.* 2010;464(7285):104–107. PMID: 20203610 <https://doi.org/10.1038/nature08780>
20. Campos-Pires R, Hirnet T, Valeo F, Ong BE, Radyushkin K, Aldhoun J, et al. Xenon improves long-term cognitive function, reduces neuronal loss and chronic neuroinflammation, and improves survival after traumatic brain injury in mice. *Br J Anaesth.* 2019;123(1):60–73. PMID: 31122738 <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.02.032>
21. Шпичко А.И., Гребенчиков О.А., Молчанов И.В., Шабанов А.К., Шпичко Н.П., Каданцева К.К. Кардиопротективные свойства ксенона. *Журнал им. Н.В. Склифосовского Неотложная медицинская помощь.* 2020;9(2):264–272. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2020-9-2-264-272>
22. Лихванцев В.В., Скрипкин Ю.В., Гребенчиков О.А., Шапошников Б.А., Мироненко А.В. Механизмы действия и основные эффекты галогенсодержащих анестетиков. *Вестник интенсивной терапии.* 2013;(3):44–51.
23. Мороз В.В., Лихванцев В.В., Гребенчиков О.А. Современные тенденции в развитии анестезиологии. *Общая реаниматология.* 2012;8(4):118–122.
24. Мороз В.В., Борисов К.Ю., Гребенчиков О.А., Левиков Д.И., Шайбакова В.Л., Черпаков Р.А., и др. Анестетическое прекондиционирование миокарда и некоторые биохимические маркеры сердечной и коронарной недостаточности после операций аортокоронарного шунтирования. *Общая реаниматология.* 2013;9(5):29–35.
25. Гребенчиков О.А., Скрипкин Ю.В., Герасименко О.Н., Каданцева К.К., Бачинский А.Л., Берикашвили Л.Б., Лихванцев В.В. Неанестетические эффекты современных галогенсодержащих анестетиков. *Патология кровообращения и кардиохирургия.* 2020;24(2):26–45. <http://dx.doi.org/10.21688/1681-3472-2020-2-26-45>
26. Кузовлев А.Н., Шпичко А.И., Рыжков И.А., Гребенчиков О.А., Шабанов А.К., Хусаинов Ш.Ж., и др. Влияние ксенона на фосфорилирование киназы гликогенсинтазы-3β и антиоксидантные ферменты в мозге крыс. *Журнал им. Н.В. Склифосовского Неотложная медицинская помощь.* 2020;9(4):564–572. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2020-9-4-564-572>
27. Гребенчиков О.А., Аврущенко М.Ш., Борисов К.Ю., Ильин Ю.В., Лихванцев В.В. Нейропротекторные эффекты севофлурана на модели тотальной ишемии-реперфузии. *Клиническая патофизиология.* 2014;(2):57–64.
28. Пирадов М.А., Крылов В.В., Белкин А.А., Петриков С.С. Инсульты. В кн.: Гельфанд Б.Р., Заболотских И.Б. (ред.) *Интенсивная терапия. Национальное руководство.* Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2017. Гл. 2. с. 288–309.
29. Шабанов А.К., Картавенко В.И., Петриков С.С., Марутян З.Г., Разумный П.А., Черненькая Т.В., и др. Тяжелая сочетанная черепно-мозговая травма: особенности клинического течения и исходы. *Журнал им. Н.В. Склифосовского Неотложная медицинская помощь.* 2017;6(4):324–330. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2017-6-4-324-330>

REFERENCES

1. Balk RA. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): Where did it come from and is it still relevant today? *Virulence.* 2014;5(1):20–26. PMID: 24280933 <https://doi.org/10.4161/viru.27135>
2. Cheng Z, Abrams ST, Toh J, Wang SS, Wang Z, Yu Q, et al. The Critical Roles and Mechanisms of Immune Cell Death in Sepsis. *Front Immunol.* 2020;11:1918. PMID: 32983116 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01918>
3. Alexander JJ, Jacob A, Cunningham P, Hensley L, Quigg RJ. TNF is a key mediator of septic encephalopathy acting through its receptor, TNF receptor-1. *Neurochem Int.* 2008;52(3):447–456. PMID: 17884256 <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.08.00>
4. Jaffer U, Wade RG, Gourlay T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth.* 2010;2(3):161–175. PMID: 23441054
5. Guisasaola MC, Alonso B, Bravo B, Vaquero J, Chana F. An overview of cytokines and heat shock response in polytraumatized patients. *Cell Stress Chaperones.* 2018;23(4):483–489. PMID: 29101529 <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0859-9>
6. Schmidt T, Zündorf J, Grüger T, Brandenburg K, Reiners AL, Zinserling J, et al. CD66b overexpression and homotypic aggregation of human peripheral blood neutrophils after activation by a gram-positive stimulus. *J Leukoc Biol.* 2012;91(5):791–802. PMID: 22319104 <https://doi.org/10.1189/jlb.0911483>
7. Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CG, et al. Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Int Care Med.* 2000;26(7):883–892. PMID: 10990102 <https://doi.org/10.1007/s001340051277>
8. Parkos CA, Colgan SP, Madara JL. Interactions of neutrophils with epithelial cells: lessons from the intestine. *J Am Soc Nephrol.* 1994;5(2):138–152. PMID: 7993993 <https://doi.org/10.1681/ASN.V52138>
9. Mortaz E, Zadian SS, Shahir M, Folkerts G, Garssen J, Mumby S, et al. Does Neutrophil Phenotype Predict the Survival of Trauma Patients? *Front Immunol.* 2019;10:2122. PMID: 31552051 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02122>
10. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, et al. In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 2010;116(4):625–627. PMID: 20410504 <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-259028>
11. Yuyun X, Fan Y, Weiping W, Qing Y, Bingwei S. Metabolomic analysis of spontaneous neutrophil apoptosis reveals the potential involvement of glutathione depletion. *Innate Immun.* 2021;27(1):31–40. PMID: 32910715 <https://doi.org/10.1177/1753425920951985>
12. Bartels M, Murphy K, Rieter E, Bruin M. Understanding chronic neutropenia: life is short. *Br J Haematol.* 2016;172(2):157–169. PMID: 26456767 <https://doi.org/10.1111/bjh.13798>

13. Collard CD, Park KA, Montalto MC, Alapati S, Buras JA, Stahl GL, Colgan SP. Neutrophil-derived glutamate regulates vascular endothelial barrier function. *J Biol Chem.* 2002;277(17):14801–14811. PMID: 11847215 <https://doi.org/10.1074/jbc.M110557200>
14. Kotz KT, Xiao W, Miller-Graziano C, Qian WJ, Russom A, Warner EA, et al. Clinical microfluidics for neutrophil genomics and proteomics. *Nat Med.* 2010;16(9):1042–1047. PMID: 20802500 <https://doi.org/10.1038/nm.2205>
15. Dorsett CR, McGuire JL, DePasquale EA, Gardner AE, Floyd CL, McCullumsmith RE. Glutamate Neurotransmission in Rodent Models of Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 2017;34(2):263–272. PMID: 27256113 <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4373>
16. Del Arroyo AG, Hadjihambi A, Sanchez J, Turovsky E, Kasymov V, Cain D, et al. NMDA receptor modulation of glutamate release in activated neutrophils. *EBioMedicine.* 2019;47:457–469. PMID: 31401196 <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.004>
17. de Sousa SL, Dickinson R, Lieb WR, Franks NP. Contrasting synaptic actions of the inhalational general anesthetics isoflurane and xenon. *Anesthesiology.* 2000;92(4):1055–1066. PMID: 10754626 <https://doi.org/10.1097/0000542-200004000-00024>
18. Grebenchikov OA, Molchanov IV, Shpichko AI, Yevseyev AK, Shabanov AK, Khusainov SZh, et al. Neuroprotective Properties of Xenon According to Experimental Studies. *Russian Sklifosovsky Journal Emergency Medical Care.* 2020;9(1):85–95. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2020-9-1-85-95>
19. Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature.* 2010;464(7285):104–107. PMID: 20203610 <https://doi.org/10.1038/nature08780>
20. Campos-Pires R, Hirnet T, Valeo F, Ong BE, Radyushkin K, Aldhoun J, et al. Xenon improves long-term cognitive function, reduces neuronal loss and chronic neuroinflammation, and improves survival after traumatic brain injury in mice. *Br J Anaesth.* 2019;123(1):60–73. PMID: 31122738 <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.02.032>
21. Shpichko AI, Grebenchikov OA, Molchanov IV, Shabanov AK, Shpichko NP, Kadantseva KK. Cardioprotective Properties of Xenon. *Russian Sklifosovsky Journal Emergency Medical Care.* 2020;9(2):264–272. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2020-9-2-264-272>
22. Likhvantsev VV, Skripkin YuV, Grebenchikov OA, Shaposhnikov BA, Mironenko AV. Mekhanizmy deystviya i osnovnye efekty galogensoderzhashchikh anestetikov. *Vestnik intensivnoy terapii.* 2013;(3):44–51. (in Russ.).
23. Moroz VV, Likhvantsev VV, Grebenchikov OA. Current Trends in the Development of Anesthesiology. *General Reanimatology.* 2012;8(4):118. (in Russ.) <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2012-4-118>
24. Moroz VV, Borisov KYu, Grebenchikov OA, Levikov DI, Shaibakova VL, Cherpakov RA, et al. Anesthetic-Induced Myocardial Preconditioning and Some Biochemical Markers for Cardiac and Coronary Failures after Aortocoronary Bypass Surgery. *General Reanimatology.* 2013;9(5):29. (In Russ.) <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2013-5-29>
25. Grebenchikov OA, Skripkin YuV, Gerasimenko ON, Kadantseva KK, Bachinskiy AL, Berikashvili LB, et al. Non-anaesthetic effects of modern halogen-containing anaesthetics. *Circulation Pathology and Cardiac Surgery.* 2020;24(2):26–45. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.21688/1681-3472-2020-2-26-45>
26. Kuzovlev AN, Shpichko AI, Ryzhkov IA, Grebenchikov OA, Shabanov AK, Khusainov SZh, et al. Effect of Xenon on the Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase β and Antioxidant Enzymes in Rat Brain. *Russian Sklifosovsky Journal Emergency Medical Care.* 2020;9(4):564–572. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2020-9-4-564-572>
27. Grebenchikov OA, Avrushchenko MSh, Borisov KYu, Il'yin YuV, Likhvantsev VV. Neuroprotective effects of sevoflurane on the total ischemia-reperfusion model. *Clinical Pathophysiology.* 2014;(2):57–64. (in Russ.).
28. Piradov MA, Krylov VV, Belkin AA, Petrikov SS. Insul'ty. In: Gel'fand BR, Zabolotskikh IB (eds). *Intensivnaya terapiya.* Moscow: GEOTAR-Media Publ.; 2017. Ch. 2. pp. 288–309. (in Russ.).
29. Shabanov AK, Kartavenko VI, Petrikov SS, Marutyan ZG, Rozumny PA, Chernenkaya TV, et al. Severe Multisystem Craniocerebral Injury: Features of The Clinical Course and Outcomes. *Russian Sklifosovsky Journal Emergency Medical Care.* 2017;6(4):324–330. (in Russ.) <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2017-6-4-324-330>

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Гребенчиков Олег Александрович

доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории органопротекции при критических состояниях ФГБНУ ФНKC PP;

<http://orcid.org/0000-0001-9045-6017>, oleg.grebenchikov@yandex.ru;

20%: концепция статьи, редактирование первичного материала, окончательное утверждение текста

Шабанов Аслан Курбанович

доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии при критических состояниях ФГБНУ ФНKC PP, заместитель главного врача по анестезиологии и реаниматологии ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;

<https://orcid.org/0000-0002-3417-2682>, aslan_s@mail.ru;

15%: редактирование первичного материала

Николаев Лев Леонидович

доцент кафедры анестезиологии и реаниматологии ФГБОУ ДПО РМАНПО, <https://orcid.org/0000-0001-7533-7618>, lnikolaev@gmail.com;

10%: сбор первичного материала

Шпичко Андрей Иванович

кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории органопротекции при критических состояниях ФГБНУ ФНKC PP;

<https://orcid.org/0000-0002-4652-3259>, shpichko.a@yandex.ru;

10%: редактирование первичного материала, окончательное утверждение текста, подготовка текста к печати

Братищев Игорь Викторович

врач анестезиолог-реаниматолог, преподаватель учебного отдела ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;

<https://orcid.org/0000-0002-1050-1867>, bratishchev@mail.ru;

9%: сбор материала, редактирование текста

Марченко Лилия Юрьевна

младший научный сотрудник ГНЦ РФ – ИМБП РАН;

<https://orcid.org/0000-0001-9925-1413>, golubajavoda@mail.ru;

9%: сбор первичного материала

Хусаинов Шамиль Жафярович

врач анестезиолог-реаниматолог ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», аспирант ФГБНУ ФНKC PP;

<https://orcid.org/0000-0002-3177-8929>, shamilkhusainov1989@gmail.com;

9%: сбор материала, редактирование текста

Черпаков Ростислав Александрович

научный сотрудник лаборатории органопротекции при критических состояниях ФГБНУ ФНKC PP;

<https://orcid.org/0000-0002-0514-2177>, zealot333@mail.ru;

9%: сбор материала, редактирование текста

Шпичко Надежда Павловна

научный сотрудник лаборатории двигательной реабилитации, восстановления глотания и речи
ФГБНУ ФНКЦ РР, ассистент кафедры анестезиологии, реаниматологии и интенсивной терапии
ФГАОУВО РУДН;

<https://orcid.org/0000-0003-3289-6107>, shpichkonp@yandex.ru;

9%: редактирование первичного материала

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Effect of Xenon on Proinflammatory Activation and Apoptosis of Human Neutrophils Under Ex Vivo Conditions

O.A. Grebenchikov¹, A.K. Shabanov^{1,2}, L.L. Nikolayev³, A.I. Shpichko¹ ✉, I.V. Bratishchev², L.Yu. Marchenko⁴, Sh.Zh. Khusainov^{1,2}, R.A. Cherpakov¹, N.P. Shpichko^{1,5}

Laboratory for Organ Protection in Critical Conditions

¹ Federal Scientific and Clinical Center of Resuscitation and Rehabilitation
25 building 2 Petrovka St., Moscow 107031, Russian Federation

² N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Department

3 B. Sukharevskaya Sq., Moscow 129090, Russian Federation

³ Russian Medical Academy of Continuing Professional Education

2/1, building 1 Barrikadnaya St., Moscow 125993, Russian Federation

⁴ State Scientific Center of the Russian Federation Institute of Biomedical Issues of the Russian Academy of Sciences

76A, p. 4 Horoshevskoe Sh., Moscow 123007, Russian Federation

⁵ Peoples' Friendship University of Russia

6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russian Federation

✉ **Contacts:** Andrey I. Shpichko, Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher of the Laboratory for Organ Protection in Critical Conditions of Federal Scientific and Clinical Center of Resuscitation and Rehabilitation. Email: shpichko.a@yandex.ru

BACKGROUND The syndrome of systemic inflammatory response, which underlies the damaging effect of factors of infectious and non-infectious genesis, may cause multiple organ failure. The degree of its severity is determined, among other things, by the activation of neutrophils. The paper highlights new mechanisms of the anti-inflammatory action of the inhalation anesthetic xenon, mediated by a decrease in the ability of neutrophils to pro-inflammatory response.

AIM OF STUDY To evaluate the effect of xenon on the activation of human neutrophils under ex vivo conditions.

MATERIAL AND METHODS We studied the effect of xenon inhalation on reduction of the ability of neutrophils to be activated proinflammatory by reduced expression of adhesion molecules CD11b and CD66b on the surface of neutrophils and on the phosphorylation of proinflammatory kinases: ERK 1/2 and kinase – p38 in neutrophils of healthy volunteers.

RESULTS The use of xenon at a dose of 30 vol. % within 60 minutes in healthy volunteers statistically significantly reduces the ability of neutrophils to pro-inflammatory activation. The addition of lipopolysaccharide (LPS) to the incubation medium of neutrophils causes their pronounced activation, statistically significantly increasing the phosphorylation of key proinflammatory neutrophil kinases ERK1/2 and kinase p38. Inhalation of xenon in volunteers (30% within 60 minutes) has a pronounced anti-inflammatory effect on LPS-stimulated neutrophils, decreasing their activation by inhibiting pro-inflammatory kinase ERK1/2 and pro-inflammatory MAP kinase p38.

CONCLUSION The actual study, performed on isolated neutrophils from volunteers who underwent xenon inhalation, revealed the anti-inflammatory properties of the inert gas xenon, which, in our opinion, may have a direct relationship to the identification of the mechanism of its neuroprotective properties. Thus, the research results available today suggest that xenon has a pronounced pleiotropic mechanism of brain protection. This is a partial blockade of NMDA receptors, and phosphorylation of the enzyme glycogen synthase-3 β , and limitation of the inflammatory activation of neutrophils.

FINDINGS Inhalation of xenon in volunteers (30% within 60 minutes) has a pronounced anti-inflammatory effect on neutrophils stimulated by lipopolysaccharides, decreasing their activation by inhibiting proinflammatory ERK 1/2 kinase and proinflammatory MAP kinase p38, as well as reducing the expression of markers of activation and degranulation CD11b and CD66b on the surface of neutrophils. Stimulation by lipopolysaccharides statistically significantly reduces spontaneous apoptosis of neutrophils, while xenon increases the ability of neutrophils to apoptosis, which is likely to contribute to the resolution of inflammation.

Keywords: systemic inflammatory response syndrome (SIRS), xenon, neutrophils

For citation Grebenchikov OA, Shabanov AK, Nikolayev LL, Shpichko AI, Bratishchev IV, Marchenko LYU, et al. Effect of Xenon on Proinflammatory Activation and Apoptosis of Human Neutrophils Under Ex Vivo Conditions. *Russian Sklifosovsky Journal of Emergency Medical Care*. 2021;10(3):511–520. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2021-10-3-511-520> (in Russ.)

Conflict of interest Authors declare lack of the conflicts of interests

Acknowledgments, sponsorship The study has no sponsorship

Affiliations

Oleg A. Grebenchikov	Doctor of Medical Sciences, Chief Researcher of the Laboratory for Organ Protection in Critical Conditions, Federal Scientific and Clinical Center of Resuscitation and Rehabilitation; http://orcid.org/0000-0001-9045-6017 , oleg.grebenchikov@yandex.ru ; 20%: concept of the article, editing of the primary material, final approval of the text
Aslan K. Shabanov	Doctor of Medical Sciences, Chief Researcher of the Laboratory of Clinical Pathophysiology In Critical Conditions Federal Scientific and Clinical Center of Resuscitation and Rehabilitation, Deputy Chief Physicians for Anesthesiology and Resuscitation, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Department; https://orcid.org/0000-0002-3417-2682 , aslan_s@mail.ru ; 15%: editing the primary material
Lev L. Nikolayev	Associate Professor of the Department of Anesthesiology and Resuscitation, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education; https://orcid.org/0000-0001-7533-7618 , llnikolaev@gmail.com ; 10%: collection of primary material
Andrey I. Shpichko	Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher of the Laboratory for Organ Protection in Critical Conditions, Federal Scientific and Clinical Center of Resuscitation and Rehabilitation; https://orcid.org/0000-0002-4652-3259 , shpichko.a@yandex.ru ; 10%: editing of the primary material, final approval of the text, preparation of the text for printing

- Igor V. Bratishchev Anesthesiologist-resuscitator, Lecturer of the Educational Department of N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Department;
<https://orcid.org/0000-0002-1050-1867>, bratishchev@mail.ru;
9%: collecting material, text editing
- Lilia Yu. Marchenko Junior Researcher of the State Scientific Center of the Russian Federation Institute of Biomedical Issues of the Russian Academy of Sciences;
<https://orcid.org/0000-0001-9925-1413>, golu bajavoda@mail.ru;
9%: collection of primary material
- Shamil Zh. Khusainov Anesthesiologist-resuscitator, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Department, postgraduate student of Federal Scientific and Clinical Center of Resuscitation and Rehabilitation;
<https://orcid.org/0000-0002-3177-8929>, shamilkhusa_inov1989@gmail.com;
9%: collecting material, text editing
- Rostislav A. Cherpakov Researcher of the Laboratory for Organ Protection in Critical Conditions, Federal Scientific and Clinical Center of Resuscitation and Rehabilitation;
<https://orcid.org/0000-0002-0514-2177>, zealot333@mail.ru;
9%: collecting material, text editing
- Nadezhda P. Shpichko Researcher at the Laboratory of Motor Rehabilitation, Swallowing and Speech Recovery, Federal Scientific and Clinical Center of Resuscitation and Rehabilitation, Assistant of the Department of Anesthesiology, Resuscitation and Intensive Therapy, Peoples' Friendship University of Russia;
<https://orcid.org/0000-0003-3289-6107>, shpichkonp@yandex.ru;
9%: editing of primary material

Received on 19.03.2021
Review completed on 26.04.2021
Accepted on 29.06.2021

Поступила в редакцию 19.03.2021
Рецензирование завершено 26.04.2021
Принята к печати 29.06.2021