

## Синтетический аналог лей-энкефалина предотвращает развитие эндотелиальной дисфункции *in vitro*

О. А. Гребенчиков<sup>1,4</sup>, А. М. Овезов<sup>1</sup>, Ю. В. Скрипкин<sup>1</sup>, Т. С. Забелина<sup>1</sup>,  
О. Н. Улиткина<sup>1</sup>, А. В. Луговой<sup>1</sup>, А. С. Приходько<sup>2,3</sup>, А. Ю. Рыжков<sup>2,4</sup>, Р. А. Зиновкин<sup>2,3,5</sup>

<sup>1</sup> Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского,  
Россия, 129110, г. Москва, ул. Щепкина, д.61/2,

<sup>2</sup> НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
Россия, 119992, г. Москва, ул. Ленинские Горы, д.1 стр.40

<sup>3</sup> НИИ Митоинженерии, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
Россия, 119992, г. Москва, ул. Ленинские Горы, дом 1 стр. 73А

<sup>4</sup> Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии,  
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, 25, стр. 2

<sup>5</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России,  
Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

## Synthetic Analogue of Leu-Enkephalin Prevents Endothelial Dysfunction *in vitro*

Oleg A. Grebenchikov<sup>1,4</sup>, Alexey M. Ovezov<sup>1</sup>, Yuri V. Skripkin<sup>1</sup>, Tatiana S. Zabelina<sup>1</sup>,  
Olga N. Ulitkina<sup>1</sup>, Alexander V. Lugovoy<sup>1</sup>, Anastasiya S. Prikhodko<sup>2,3</sup>,  
Alexander Yu. Ryzhkov<sup>2,4</sup>, Roman A. Zinovkin<sup>2,3,5</sup>

<sup>1</sup> M. F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute  
61/2 Shchepkin Str., 129110 Moscow, Russia

<sup>2</sup> A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,  
1 Leninskie Gori Str., Build. 40, Moscow 119234, Russia

<sup>3</sup> Institute of Mitoengineering, Lomonosov Moscow State University,  
1 Leninskie Gori Str., Build. 73A, Moscow 119992, Russia

<sup>4</sup> Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation,  
25 Petrovka Str., Build. 2, 107031 Moscow, Russia

<sup>5</sup> I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia,  
8 Trubetskaya Str., Build. 2, 119991 Moscow, Russia

**Цель исследования** – изучить эффективность действия синтетического стабилизированного аналога лей-энкефалина в качестве средства, предотвращающего повреждение монослоя эндотелиальных клеток *in vitro* под действием сывороток пациентов с септическим шоком.

**Материалы и методы.** Эксперименты выполнены на монослое эндотелиальных клеток EaHy.926. Изучали влияние синтетического аналога лей-энкефалина *in vitro* на развитие повреждения клеток под действием сывороток пациентов (5 больных с септическим шоком). Состояние межклеточных контактов эндотелия оценивали методами иммунофлуоресцентной микроскопии и иммуноблотинга с антителами к белку адгезивных контактов – VE-кадгерину и белку плотных контактов – клаудину. Жизнеспособность клеток определяли с помощью окраски йодистым пропидием.

**Результаты.** Препрекондиционирование синтетическим аналогом лей-энкефалина (10, 50 и 100 мкг/мл) клеток эндотелия *in vitro* приводило к предотвращению деструкции плотных и адгезивных контактов, а также частично предотвращало гибель эндотелиоцитов.

**Заключение.** Препрекондиционирование синтетическим аналогом лей-энкефалина частично предотвращает гибель эндотелиоцитов, вызванную воздействием сыворотки септических больных *in vitro*. Эти данные диктуют необходимость проведения клинических испытаний эффективности применения синтетического аналога лей-энкефалина с целью профилактики сепсис-ассоциированной эндотелиальной дисфункции.

**Ключевые слова:** лей-энкефалин; проницаемость эндотелия; синдром системного воспалительного ответа; септический шок; Даларгин

**The purpose of the study** was to determine the efficacy of a synthetic leu-enkephalin stabilized analogue to prevent damage of endothelial cells monolayer *in vitro* caused by serum samples from septic shock patients.

**Materials and methods.** The experiments were performed using the EaHy.926 endothelial cells monolayer. We studied the *in vitro* effect of synthetic leu-enkephalin analogue on the cell damage caused by serum samples from

Адрес для корреспонденции:

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

Correspondence to:

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

five septic shock patients. The status of endothelial intercellular junctions was estimated by immunofluorescence microscopy and western blot with antibodies against adherens junction protein, VE-cadherin, and against the tight junctions protein, claudin. Cell viability was determined by staining with propidium iodide.

**Results.** Preconditioning with a synthetic leu-enkephalin analogue (10, 50 and 100 µg/ml) of endothelial cells *in vitro* prevented the destruction of both tight and adherens junction and partially prevented endothelial cell death.

**Conclusion.** Preconditioning with a synthetic leu-enkephalin analogue partially prevents endothelial cell damage caused by exposure to septic patients' sera *in vitro*. These data ensure the need for clinical trials on the effectiveness of a synthetic leu-enkephalin analogue for prevention of sepsis-associated endothelial dysfunction in clinics.

**Keywords:** *synthetic leu-enkephalin stabilized analogue; endothelial permeability; systemic inflammatory response syndrome; septic shock; Dalargin*

DOI:10.15360/1813-9779-2018-2-60-68

## Введение

Эндотелий представлен одним слоем специализированных клеток, выстилающих внутреннюю поверхность кровеносных и лимфатических сосудов. Помимо барьерной, эндотелий выполняет ряд других физиологических функций: поддержание онкотического давления, участие в свертывании крови, ангиогенезе и проч. При развитии некоторых патологических процессов, эндотелиальная дисфункция становится их важной составляющей и во многом определяет тяжесть течения атеросклероза, сепсиса, ишемических и реперфузионных повреждений, тяжелой сочетанной травмы, а также синдрома системной воспалительной реакции (ССВР), в том числе, и в раннем послеоперационном периоде [1]. Транскапиллярная утечка жидкости, возникающая вследствие нарушения барьерной функции эндотелия или гибели клеток, приводит к возникновению интерстициального отека, что, на уровне организма, манифестирует полиорганной недостаточностью — состоянием, представляющем серьезную угрозу жизни больного ССВР [2]. Важной составляющей ССВР является эндотелиальная дисфункция — ключевой феномен критических состояний, сопровождающийся увеличением проникновения провоспалительных цитокинов через гистогематические барьеры и приводящий к нарушению целостности последних, с последующей инфильтрацией тканей лейкоцитами и цитокинами [3]. Барьерная функция эндотелия закономерно нарушается при септическом шоке, что способствует развитию неблагоприятных клинических исходов [4]. Предупреждение, лечение и минимизация последствий ССВР является одной из основных задач анестезиологов-реаниматологов.

Наличие противовоспалительной активности (т. е. способности тормозить развитие ССВР) и, как следствие, способность предотвращать развитие эндотелиальной дисфункции, является положительным побочным эффектом немало числа известных препаратов [5]. Однако, их эффективность в обсуждаемом плане не велика и, с учетом важности проблемы ССВР, представляется чрезвычайно важным поиск новых препаратов, способных тормозить развитие эндотелиальной дисфункции.

## Introduction

Endothelium is represented by a single layer of specialized cells lining the inner surface of the blood and lymph vessels. In addition to the barrier function, the endothelium has several other physiological functions: the maintenance of the oncotic pressure, contributions to blood coagulation, angiogenesis, etc. In the case of development of pathological processes, endothelial dysfunction becomes a significant object of pathological alterations and largely determines the severity of atherosclerosis, sepsis, ischemia/reperfusion injury, severe concomitant injury and systemic inflammatory response syndrome (SIRS) including that in the early postoperative period [1]. Transcapillary fluid leakage caused by barrier dysfunction of the endothelium or cell death leads to interstitial edema, which at the body level is manifested by multiple organ failure, a life-threatening condition of the patient [2]. SIRS, which includes as an important component the endothelial dysfunction, is a key phenomenon of critical illness accompanied by increased infiltration of pro-inflammatory cytokines through histohematogenous barriers. SIRS leads to impairment of the integrity of the latter, with the subsequent tissue infiltration by leukocytes and enhanced production of cytokines [3]. The barrier function of the endothelium is impaired naturally in septic shock, which contributes to adverse clinical outcomes [4]. Prevention, treatment and mitigation of consequences of SIRS are the urgent tasks in the intensive care.

The presence of the anti-inflammatory activity (i.e. the ability to inhibit the development of SIRS) and, as a result, the ability to prevent the development of endothelial dysfunction is a positive side effect of many drugs [5]. However, their effectiveness in the discussed field is not high, taking into account the significance of the SIRS problems; therefore the search of new drugs which can inhibit the development of endothelial dysfunction is essential.

More than 30 years ago, a synthetic stable analogue of leu-enkephalin with delta- and mu-opioid activity, Dalargin, which is a peptide with an amino acid sequence of Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg has been suggested for the clinical practice [6].

The synthetic leu-enkephalin analogue (Dalargin) has been approved for the clinical use for

Более 30-ти лет назад в клинику был внедрен синтетический стабилизированный аналог лей-энкефалина с дельта- и мю-опиоидной активностью — Даларгин, который представляет собой пептид с аминокислотной последовательностью Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg. [6]

Синтетический аналог лей-энкефалина (Даларгин) разрешен к клиническому применению для лечения язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и желудка в период обострения; острого панкреатита; острого некротического панкреатита в составе комплексной терапии [7].

В ранних исследованиях было показано наличие у препарата кардиопротекторных свойств при операциях с ИК [8], однако, неизученность механизмов его действия и непостоянство эффекта, помешали Даларгину в то время занять достойное место в арсенале анестезиолога.

После открытия феномена опиоидного preconditionирования [9] возникло предположение, что органопротекторные эффекты Даларгина реализуются теми же биохимическими путями [10], и если эта гипотеза найдет свое подтверждение, то у клиницистов появится средство для лечения или предотвращения осложнений, прежде всего органной недостаточности, связанной с эндотелиальной дисфункцией, в том числе, при сепсисе и септическом шоке.

Цель настоящего исследования — изучить эффективность действия синтетического стабилизированного аналога лей-энкефалина в качестве средства, предотвращающего повреждение монослоя эндотелиальных клеток *in vitro* под действием сывороток пациентов с септическим шоком.

## Материал и методы

Сыворотки забирали у больных с развившимся септическим шоком, которые были отобраны в соответствии с критериями «Сепсис-3» [11]: 5 человек, средний возраст 45 [29–55] лет, а также у здоровых доноров, подписавших информированное согласие: 5 человек, средний возраст 35 [28–45] лет.

**Флуоресцентная микроскопия.** Эндотелиальные клетки Ea.hy926 растили в среде DMEM (Gibco, USA) с 10% телячьей эмбриональной сывороткой — FBS (HyClone, USA) до монослоя. Затем клетки инкубировали в течение 3-х часов при 37°C с 5%-ной телячьей эмбриональной сывороткой (контроль), с сывороткой здорового человека, а также с сывороткой пациента с сепсисом без Даларгина и в его присутствии в конечных концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкг/мл. Даларгин добавляли за 1 час до смены сывороток. После инкубации клетки промывали теплым раствором DMEM без сыворотки, а затем фиксировали 2%-ным раствором параформа и пермеабилizовывали 1%-ным раствором Triton X-100. Фиксированные клетки окрашивали первичными антителами к VE-кадгерину (BD Biosciences, USA), а затем инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем Oregon Green 488 (Life Technologies, USA), а также с фаллоидином, меченным TRITC (Sigma, USA) и

the treatment of duodenal and stomach ulcer during exacerbation; acute pancreatitis and acute necrotizing pancreatitis as a part of the combined therapy [7].

Early studies have shown the cardioprotective properties of Dalargin during surgery requiring a cardiopulmonary bypass (CPB) [8]. However, unclarified mechanisms of the drug action and variable clinical effects prevented Dalargin at that time from taking an appropriate niche in the anesthesiology.

After the discovery of a phenomenon of opioid preconditioning [9], it has been suggested that the effects of Dalargin are implemented by the same biochemical pathways [10] and if this hypothesis is confirmed, clinicians would have a medicine for the treatment or prevention of complications, including organ failure associated with endothelial dysfunction and sepsis/septic shock.

The purpose of this study was an *in vitro* investigation of the effectiveness of Dalargin for preventing the damage of endothelial cells monolayer by proinflammatory cytokines circulating in the serum of septic shock patients.

## Materials and Methods

Patients with developed septic shock were selected in accordance with the «Sepsis-3» criteria [11]: 5 patients, the average age is 45 [29–55] years.

Healthy donors (5 subjects) who signed the informed consent; the average age is 35 [28–45].

**Fluorescence microscopy.** Ea.hy926 endothelial cells were grown to a monolayer in the DMEM medium (Gibco, USA) with 10% fetal bovine serum, FBS (HyClone, USA). The cells were then incubated for 3 hours at 37°C with 5% FBS (reference group), with healthy human serum, and with the serum of a septic patient without Dalargin and with Dalargin at a final concentrations of 1, 10, 50 and 100 µg/ml. Dalargin was added 1 hour before changing the serum. After incubation, the cells were washed with a warm DMEM solution without serum, then fixed with a 2% paraformaldehyde solution and permeabilized with a 1% Triton X-100 solution. Fixed cells were stained with primary antibodies against VE-cadherin (BD Biosciences, USA) and then incubated with secondary antibodies conjugated with a fluorescent stain Oregon Green 488 (Life Technologies, USA), phalloidin-TRITC conjugate (Sigma, USA) and Hoechst dye 33342 (Life Technologies, USA). The processing of the images acquired with a fluorescence microscope, as well as their quantitative analysis, was performed using ImageJ 1.44p and MetaVue 4.6 software to compute the relative area of intercellular spaces as a percentage of the total area in endothelial cells.

**Western blotting.** The Ea.hy926 endothelial cells were grown and incubated as described above. After incubation, the cells were lysed in a hot buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.01% bromophenol blue) at 94°C for 4 min. The proteins were separated by a 12% polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to PVDF membranes. Antibodies against VE-cadherin and claudin (BD Biosciences, USA), as well as secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (BD Biosciences, USA) were used. The visualization

красителем Hoechst 33342 (Life Technologies, USA). Обработку изображений, полученных на флуоресцентном микроскопе, а также их количественный анализ проводили с помощью программ ImageJ 1.44r и MetaVue 4.6 с определением относительной площади межклеточных промежутков в % от общей площади в эндотелиальных клетках.

**Вестерн-блоттинг.** Эндотелиальные клетки Ea.hy926 растили и инкубировали так же, как описано выше. После инкубации клетки лизировали в горячем буфере (62,5 mM Трис-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 10% глицерин; 50 mM ДТТ, 0,01% бромфенолового синего) при температуре 94°C, в течение 4 мин. Белки разделяли в 12% полиакриламидном геле и переносили на PVDF-мембраны. Были использованы антитела к VE-кадгерину и клаудину (BD Biosciences, USA), а также вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (BD Biosciences, USA). Визуализацию проводили набором SuperSignal West Pico (Thermo Scientific, USA). Для денситометрического анализа и определения относительного содержания VE-кадгерина (%) в межклеточных контактах эндотелиальных клеток использовали программу Image Lab (BioRad, USA).

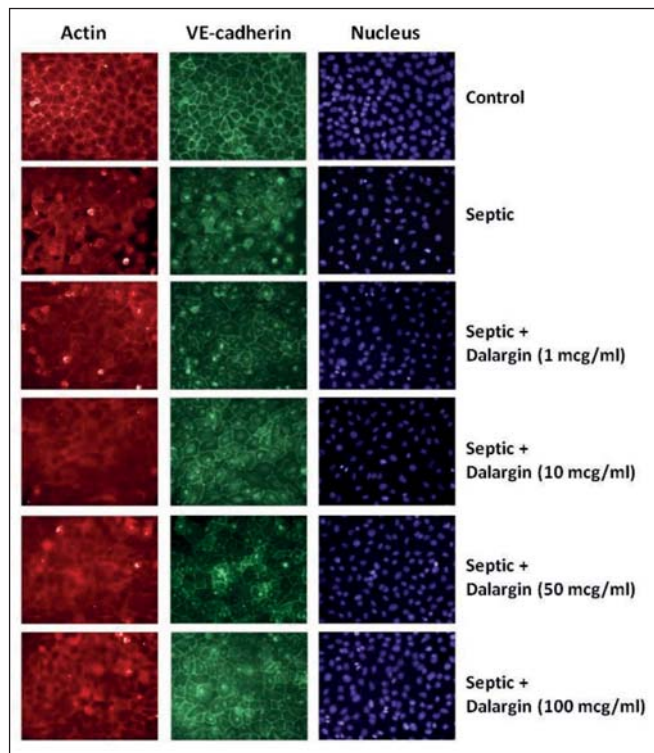
**Изучение влияния сывороток пациентов с септическим шоком на апоптоз эндотелиальных клеток.** Эндотелиальные клетки Ea.hy926 растили до монослоя. Затем клетки инкубировали в течение 12 часов при 37°C с 5%-ной телячьей эмбриональной сывороткой (контроль), с сывороткой здорового человека, а также с сывороткой пациента с сепсисом без Даларгина и в его присутствии в концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкг/мл. После инкубации клетки снимали раствором трипсин-Версена, фиксировали 70%-ным этанолом и окрашивали йодистым пропидием. Клетки, содержащие фрагментированную геномную ДНК анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии, как описано ранее [12].

**Статистический анализ.** Данные представили в виде медианы с межквартильным интервалом. Статистическую значимость различий показателей оценивали с помощью *U*-теста Манна-Уитни. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Инкубация монослоя эндотелиальных клеток сывороткой пациентов с септическим шоком приводила к потере белка адгезионных контактов VE-кадгерина. Септическая сыворотка также изменяла форму клеток: они теряли правильную многоугольную форму, вытягивались, между ними образовывались промежутки, поскольку «разбирались» еще и пучки периферических актиновых микрофиламентов (рис. 1).

Такие изменения характерны для эндотелиальной дисфункции, сопровождающейся нарушением межклеточных контактов. Подобные эффекты не наблюдали при инкубации с 5%-ной телячьей эмбриональной сывороткой (контроль) или 5%-ной сывороткой здоровых добровольцев. Таким образом, данный эксперимент может рассматриваться как модель эндотелиальной дисфункции при сепсисе *in vitro*.



**Рис. 1.** Иммунофлуоресцентная микроскопия эндотелиальных клеток Ea.hy926.

**Fig. 1.** Immunofluorescence microscopy of endothelial cells Ea.hy926.

**Note.** Cells were incubated with different concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) of Dalargin and treated with 5% serum from the septic patient L. (27 years old, severe sepsis). Cells were stained with antibodies against actin microfilaments (Actin) or intercellular contact molecule (VE-cadherin); nuclei were stained with DAPI.

**Примечание.** Клетки инкубировали с различными концентрациями Даларгина (указаны в мкг/мл) и обработали 5%-ной сывороткой септического больного Л. (27 лет, тяжелый сепсис). Actin – окраска клеток на актиновые микрофиламенты; VE-cadherin – окраска на белок межклеточных контактов VE-кадгерин; Nucleus – окраска ядер клеток.

was performed by SuperSignal West Pico (Thermo Scientific, USA). Image Lab software was used (BioRad, USA) for the densitometry analysis and determining the relative content of VE-cadherin (%) in the intercellular contacts of endothelial cells.

**Study of the effect of sera of patients with septic shock on endothelial cell apoptosis.** Ea.hy926 endothelial cells were grown to form a monolayer. The cells were then incubated for 12 hours at 37°C with 5% FBS (reference group), with control human serum, and with the serum of a septic patient without Dalargin and with Dalargin at concentrations of 1, 10, 50 and 100  $\mu\text{g/ml}$ . After incubation, the cells were removed using trypsin-EDTA solution, fixed with 70% ethanol and stained with propidium iodide. Cells containing fragmented genomic DNA were analyzed by flow cytometry as described previously [12].

**Statistical analysis.** Since the distributions of variables differed from a normal distribution, the non-parametric criteria were employed to reveal the difference between groups. The data are presented as a median and 25%–75% interquartile intervals. The statistical significance was estimated using Mann-Whitney test. The difference was considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

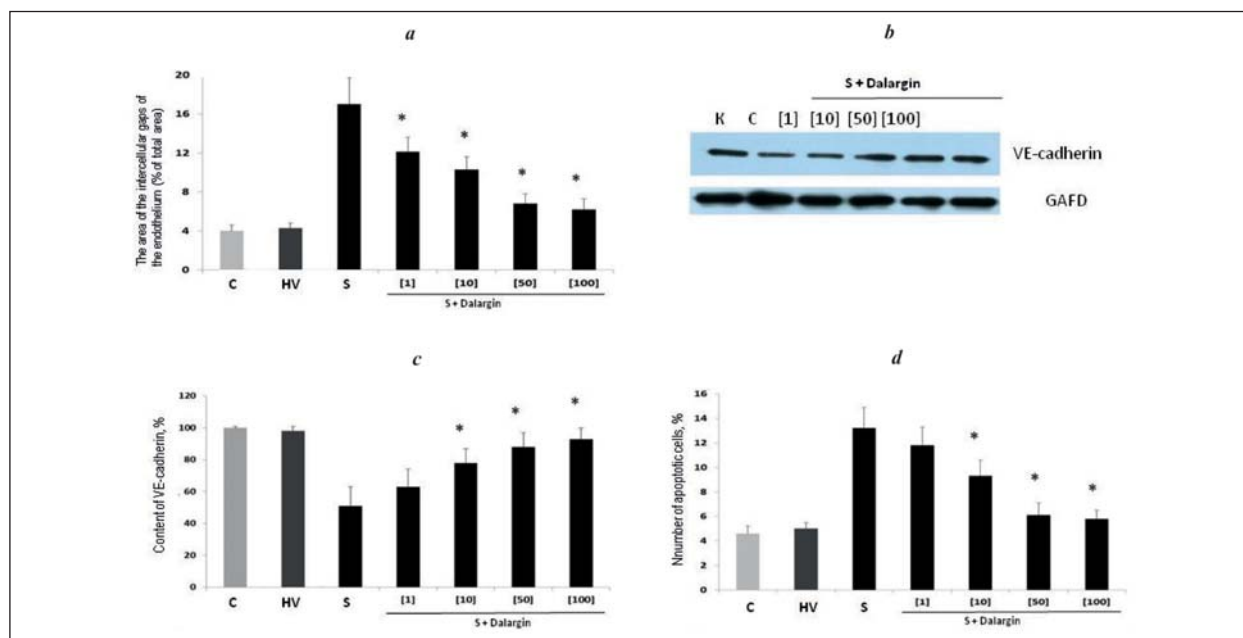


Рис. 2. Влияние Даларгина на повреждение монослоя эндотелиальных клеток под действием 5%-х сывороток пациентов с сепсисом.

Fig. 2. Effect of Dalargin on a serum-induced damage to the monolayer of endothelial cells.

Note. *a* – formation of intercellular spaces, immunofluorescence microscopy; *b* – splitting of the VE-cadherin-mediated adhesion contacts, immunoblot-analysis; *c* – cleavage of the dense contact protein Claudine, immunoblot analysis; *d* – relative level of apoptosis, propidium iodide staining. The results are presented as the mean (%)  $\pm$  standard deviation,  $n=5$ ; \* –  $P<0.05$  compared to effect of serum of patients with sepsis. C – control serum (FBS); HV – healthy volunteer serum; S – serum of a septic patient.

Примечание. *a* – образование межклеточных промежутков, данные иммунофлуоресцентной микроскопии; *b* – расщепление белка адгезивных контактов VE-кадгерина, данные иммуноблот-анализа; *c* – расщепление белка плотных контактов клаудина, данные иммуноблот-анализа; *d* – относительный уровень апоптоза, данные по окраске йодистым пропидием. Результаты представлены в виде среднего значения (%)  $\pm$  стандартное отклонение,  $n=5$ ; \* –  $p<0,05$  относительно сыворотки пациентов с сепсисом; C – контрольная сыворотка FBS; HV – сыворотка здорового добровольца; S – сыворотка септического больного; GAFD – ГАФД.

Для изучения возможного ангиопротекторного эффекта Даларгина в рамках предложенной модели использовали следующие концентрации активного вещества: 1, 10, 50 и 100 мкг/мл.

По данным иммунофлуоресцентной микроскопии, инкубация с Даларгином в низких концентрациях (1 и 10 мкг/мл) незначительно предотвращает «разборку» актина и VE-кадгерина в межклеточных контактах. Прединкубация с Даларгином в более высоких концентрациях (50 и 100 мкг/мл) практически полностью защищала эндотелиальный монослой от разрушения межклеточных контактов под действием сыворотки пациентов с септическим шоком (рис. 2, *a*). Численный анализ данных флуоресцентной микроскопии представлен в таблице.

Для количественной оценки содержания белков межклеточных контактов (клаудина и VE-кадгерина) использовали Вестерн-блоттинг. Инкубация с 5%-ной сывороткой пациента с сепсисом примерно в половину уменьшала количество VE-кадгерина в клеточных лизатах (рис. 2, *b*). Инкубация с Даларгином дозозависимо защищала этот белок от расщепления под действием септической сыворотки (рис. 2, *c*).

Инкубация с 5%-ными сыворотками пациентов с септическим шоком приводила к значитель-

## Results and Discussion

Incubation of a monolayer of endothelial cells with serum of septic shock patients resulted in the loss of an adherens junction protein, VE-cadherin. The septic serum also changed the shape of the cells: they lost the correct polygonal shape, stretched out, formed gaps between them whereas peripheral actin microfilament bundles were also disassembled (Fig. 1).

These changes are typical for endothelial dysfunction accompanied by destruction of intercellular junctions. These effects were not observed when the cells were pre-incubated with 5% FBS (reference group) or 5% serum of healthy volunteers. Thus, this experimental system can be considered as an *in vitro* model of endothelial dysfunction in sepsis.

To study the possible angioprotective effect of Dalargin within the framework of the proposed model, we used the following concentrations of the active substance: 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

A quantitative analysis of the immunofluorescence microscopy data is presented in Table. As shown in Table, incubation with Dalargin at low concentrations (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) insignificantly prevented the disassembly of actin and VE-cadherin within the area of intercellular junctions. Pre-incubation with Dalargin at higher concentrations (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$

**Протективное действие Даларгина при воздействии сыворотки пациентов с септическим шоком на культуру эндотелия Ea.hy926.****Protective effect of Dalargin on endothelial cells Ea.hy926 treated with serum of septic shock patients.**

Group	Area of intercellular gaps in endothelium. (% to total area)	P value vs. «Sept» group	Content of VE-cadherin. %	P value vs. «Sept» group	Apoptosis level (% of a total count of endothelial cells)	P value vs. «Sept» group
Reference group	4.11 [3.52–4.40]		100 [99.1–100]		5.29	
Control	4.3 [3.82–4.78]		97.1 [95.88–100]		4.48	
Sept.	17.03 [14.83–19.11]		49 [42.25–61.25]		12.96	
Sept + Dalargin 1 µg/ml	11.72 [11.03–13.45]	0.016	61 [54.78–73.03]	0.15	10.42	0.0952
Sept + Dalargin 10 µg/ml	10.27 [9.02–11.60]	0.008	77 [70.98–85.78]	0.008	8.66	0.0079
Sept + Dalargin 50 µg/ml	6.59 [5.96–7.80]	0.008	90.2 [80.05–94.23]	0.008	7.13	0.0079
Sept+Dalargin 100 µg/ml	6.17 [5.27–7.16]	0.008	96 [86.33–97.23]	0.008	6.35	0.0079

**Note.** For tabl., fig. 1: Control – sera from healthy volunteers donated blood; Sept – serum of septic shock patients.

**Примечание.** Group – группа; Reference – контроль. Для табл. 1, рис. 1: Control – сыворотка здоровых волонтеров; Sept. – сыворотка пациентов с септическим шоком; Dalargin – Даларгин. Для табл. и рис. 2: Area of intercellular gaps in endothelium, (% to total area) – площадь межклеточных промежутков эндотелия, % от общей площади; Content of VE-cadherin – содержание VE-кадгерина; – количество апоптотических клеток, % от общего количества эндотелиальных клеток. P value vs. «Sept» group – значимость разницы по отношению к группе «Септ».

ному увеличению количества апоптотических клеток (рис. 2, *d*). Даларгин в концентрации 1 мкг/мл незначительно уменьшал количество апоптотических клеток, а при концентрациях 10, 50 и 100 мкг/мл наблюдали значимое снижение количества апоптотических клеток (табл.).

Клетки линии Ea.hy 926 обладают основными фенотипическими и функциональными характеристиками эндотелиальных клеток сосудов человека [13], поэтому они были выбраны нами в качестве модели для исследования эндотелиальной дисфункции.

Ранее было установлено, что различные провоспалительные цитокины, например, TNF- $\alpha$  (Tumour Necrosis Factor  $\alpha$ ) вызывают расщепление VE-кадгерина – эндотелиального белка адгезионных контактов [14]. Также, при действии подобных провоспалительных агентов, происходит деградация белков плотных контактов, в том числе, клаудина. Эндотелиальные межклеточные контакты выполняют важнейшую роль в поддержании целостности сосудов. Повышение проницаемости эндотелия под действием провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , интерлейкины-1, -8, -12.) происходит за счет реакций фосфорилирования и убиквитинирования основных белковых компонентов адгезивных межклеточных контактов (VE-кадгерина, окклюдина, клаудина) [15].

Протеолиз этих важнейших белков межклеточных контактов вызывает образование промежутков между клетками, что приводит к увеличению проницаемости и нарушению барьерной функции эндотелия. В крайних случаях может развиться эндотелиальная дисфункция, которая в настоящее время считается одним из основных факторов развития полиорганной недостаточности при сепсисе и септическом шоке [16].

Также в рамках выбранной модели изучали влияние сывороток пациентов с септическим шоком

and 100 µg/ml) almost completely protected the endothelial monolayer from the destruction of intercellular junctions induced by sera from patients with sepsis (Fig. 2, *a*).

Western blotting was used to quantify the protein content of intercellular junctions proteins, claudin and VE-cadherin. Incubation with a 5% serum of a septic patient resulted in a 50% reduction of VE-cadherin content in the cell lysates (Fig. 2, *b*). Incubation with Dalargin protected this protein from disintegration under the effect of the septic serum in a dose-dependent manner (Fig. 2, *c*).

Incubation with 5% serum of a septic shock patient resulted in a significant increase in the number of apoptotic cells (Fig. 2, *d*). Dalargin at a concentration of 1 µg/ml slightly reduced the number of apoptotic cells. Statistically significant decrease in the number of apoptotic cells was observed at Dalargin concentrations of 10 µg/ml, 50 µg/ml and 100 µg/ml (Table).

Cells of the Ea.hy926 line possess main phenotypic and functional features of human endothelial vascular cells [13], therefore they were chosen as an endothelium model to study endothelial dysfunction in sepsis.

It was established earlier that various pro-inflammatory cytokines, e.g. TNF- $\alpha$  (Tumour Necrosis Factor  $\alpha$ ), induce the disintegration of the VE-cadherin, the protein of vascular endothelial adherens junction [14]. Besides, the action of such pro-inflammatory agents caused the degradation of proteins of tight junctions including claudine. Endothelial intercellular junctions significantly contribute to maintaining the vascular integrity. Enhanced permeability of the endothelium caused by pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , Interleukins-1, -8, -12) is due to increased phosphorylation and ubiquitination of the essential protein components of intercellular adherens junctions (VE-cadherin, occludin, claudin) [15].

на апоптоз эндотелиальных клеток. Известно, что в норме *in vivo* эндотелий практически не подвергается апоптозу. Однако есть данные, что при сепсисе увеличивается количество апоптотических эндотелиальных клеток [17]. В моделях *in vitro* многие провоспалительные агенты, такие, как LPS (Lipopolysaccharide), TNF- $\alpha$ , IL-1, увеличивают апоптоз различных линий эндотелиальных клеток [18, 19].

Ранее считали, что опиоидные рецепторы находятся исключительно в нервной ткани, и только совсем недавно они были обнаружены и в других тканях, в том числе на поверхности эндотелиальных клеток [20, 21]. Было доказано, что морфин действует на  $\mu$ -опиоидные рецепторы эндотелиальных клеток, что приводит к активации синтеза NO и вазодилатации [22]. Даларгин является неселективным агонистом  $\mu$ - и  $\delta$ -опиоидных рецепторов, причем, преимущественно периферического действия [23]. В настоящей работе удалось показать, что Даларгин способен предотвращать апоптоз, а также деградацию актина и VE-кадгерина в межклеточных контактах эндотелиоцитов линии Ea.hy 926, вызванную действием сывороток септических больных. Эти данные полностью согласуются с ранее полученными результатами о протективном антиапоптотическом действии Даларгина на эндотелиальные клетки, обработанные антиэндотелиальными антителами и sensibilizированными лимфоцитами [24]. Косвенно перспективность использования Даларгина с целью предотвращения эндотелиальной дисфункции подтверждает недавняя работа А. Донцова [25], в которой было показано, что включение в терапию Даларгина у больных ишемической болезнью сердца сопровождалось достоверным снижением активности параметров оксидативного стресса и повышением антиоксидантных свойств крови. Возможно Даларгин также индуцирует защитные антиоксидантные механизмы в эндотелии при различных патологических состояниях. Известно, что антиоксиданты способны предотвращать апоптоз эндотелиальных клеток [26] и препятствовать развитию эндотелиальной дисфункции.

На сегодняшний день механизмы действия Даларгина на эндотелиальные клетки остаются неизученными. В этой связи, нам представляется важным продолжить исследования молекулярных механизмов его защитных свойств на эндотелий. Изучение биологических процессов, связанных с действием отдельных веществ на эндотелий требует использования методов и *in vitro*, и *in vivo*. Полученные в настоящей работе данные требуют также проверки в моделях с использованием животных. При этом не исключено, что концентрации Даларгина, используемые в настоящей работе, могут значительно отличаться от действующих концентраций *in vivo*.

**Ограничения исследования.** Относительно небольшое количество образцов сывороток,

The proteolysis of these critical proteins of the cellular junctions leads to the intercellular gaps formation, leading to increased permeability and impaired barrier function of the endothelium. In extreme cases an endothelial dysfunction may develop, which is currently considered one of the main factors in the development of multiple organ failure in sepsis including septic shock [16].

In addition, within the frames of our model, we studied the effect of serum samples of patients with septic shock on apoptosis of endothelial cells. It is known that *in vivo* normal endothelium does not undergo apoptosis. However, there is evidence that sepsis increases the quantity of apoptotic endothelial cells [17]. In *in vitro* many proinflammatory agents such as LPS (bacterial lipopolysaccharide), TNF- $\alpha$ , IL-1 enhance apoptosis in various lines of endothelial cells [18, 19].

Earlier, opioid receptors were considered as those as found exclusively in nervous tissue. Only recently they were discovered in other tissues, including the endothelial cells in which the opioid receptors are exposed on the cell surface [20, 21]. It has been proven that morphine affects  $\mu$ -opioid receptors of endothelial cells that leads to activation of NO synthesis and vasodilation [22]. Dalargin is a non-selective agonist of  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors, with a mainly peripheral action [23]. In the present study, we were able to show that Dalargin could prevent apoptosis and degradation of actin and VE-cadherin in intercellular junctions of line Ea.hy 926 endothelial cell induced by the serum of septic patients. These data are fully consistent with previously obtained findings demonstrating the protective antiapoptotic action of Dalargin on endothelial cells treated with anti-endothelial antibodies and sensitized lymphocytes [24]. Indirectly, the perspectives for the use of Dalargin to prevent endothelial dysfunction have been supported by a recent study by A. Dontsov [25], in which the inclusion of Dalargin in the treatment of patients with coronary artery disease has been accompanied by a significant decrease in the activity of oxidative stress parameters and increase of antioxidant blood properties. Dalargin may also induce the endothelial protective antioxidant mechanisms in various pathological conditions. It is known that antioxidants can prevent apoptosis in endothelial cells [26] and prevent the development of endothelial dysfunction.

The mechanisms of action of Dalargin on endothelial cells have not been studied to date. In this context, it seems important to continue the study of the molecular mechanisms of its protective properties on the endothelium. It is important to note that the study of the biological processes associated with the effect of certain substances on the endothelium requires the use of *in vitro* methods. Therefore, the data obtained in the present study also require the validation in animal models. We can also assume

использованных в работе, не позволяет сделать вывод о том, что все пациенты с сепсисом подвержены эндотелиальной дисфункции. В работе отсутствуют данные о содержании цитокинов в сыворотках пациентов с септическим шоком.

## Заключение

Прекодиционирование Даларгином дозозависимо частично предотвращает гибель эндотелиоцитов, вызванную воздействием сыворотки септических больных, *in vitro* на клетки эндотелия человека. Даларгин также дозозависимо предотвращает деградацию актина и VE-кадгерина в межклеточных контактах эндотелиальных клеток линии Ea.hy 926 под действием сыворотки пациентов с септическим шоком, что свидетельствует о протекторном эффекте препарата на эндотелий, но не выявляет, посредством какого механизма он осуществляется. Такое защитное действие может обеспечивать сохранение функционального сосудистого барьера при опасных для жизни критических состояниях. Подтверждение вышеизложенного в моделях *in vivo* и раскрытие молекулярных механизмов защиты эндотелия, позволит инициировать клиническое испытание Даларгина (IV фаза) для доказательства его органопротекторных свойств.

## Литература

1. Félétou M., Vanhoutte P. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006; 291 (3): H985-H1002. DOI: 10.1152/ajpheart.00292.2006. PMID: 16632549
2. Hirase T., Node K. Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2012; 302 (3): H499-H505. DOI: 10.1152/ajpheart.00325.2011. PMID: 22081698
3. Hughes C.G., Patel M.B., Pandharipande P.P. Pathophysiology of acute brain dysfunction: what's the cause of all this confusion? *Curr. Opin. Crit. Care.* 2012; 18 (5): 518-526. DOI: 10.1097/MCC.0b013e328357effa. PMID: 22941208
4. Opal S., van der Poll T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J. Intern. Med.* 2014; 277 (3): 277-293. DOI: 10.1111/joim.12331. PMID: 25418337
5. Pearson T.A., Mensah G.A., Alexander R.W. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association. *Circulation.* 2003; 107 (3): 499-511. DOI: 10.1161/01.CIR.0000052939.59093.45. PMID: 12551878
6. Титов М.А., Виноградов В.А., Беспалова Ж.Д. Даларгин – пептидный препарат с цитопротективным действием. *Бюл. ВКНЦ АМН СССР.* 1985; 2: 72-76.
7. Инструкция по медицинскому применению препарата Даларгин. [https://www.vidal.ru/drugs/dalargin\\_17150](https://www.vidal.ru/drugs/dalargin_17150)
8. Лихванцев В.В., Смирнова В.И., Кузнецов А.Ю., Перетрухин А.И., Какурин Ф.Ф., Гринько А.Н. Сравнительные аспекты применения даларгина в комплексе анестезиологической защиты при хирургической коррекции врожденных пороков сердца. *Анестезиология и реаниматология.* 1992; 4: 23-28. PMID: 8239021
9. Schultz J.E., Hsu A.K., Gross G.J. Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by delta1 – but not mu- or kappa-opioid receptors. *Circulation.* 1998; 97 (13): 1282-1289. PMID: 9570199
10. Лихванцев В.В., Гребенчиков О.А., Шапошников А.А., Борисов К.Ю., Черпаков Р.А., Шульгина Н.М. Фармакологическое прекодиционирование: роль опиоидных пептидов. *Общая реаниматология.* 2012; 8 (3): 51-55. DOI: 10.15360/1813-9779-2012-3-51
11. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W. The Third International Consensus definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016; 315 (8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287. PMID: 26903338
12. Demyanenko I.A., Popova E.N., Zakharova V.V., Ilyinskaya O.P., Vasilieva T.V., Romashchenko V.P., Fedorov A.V., Manskikh V.N., Skulachev M.V., Zinovkin R.A., Pletjushkina O.Y., Skulachev V.P., Chernyak B.V. Mitochon-

that the concentration of Dalargin used in this study may significantly differ from the actual *in vivo* concentrations.

**Study limitations.** Limited number of serum samples used in the study restricts the probability that all septic patients are exposed to endothelial dysfunction. There was also no cytokine concentration determined of the septic shock patients' serum in accordance with the cytokines content.

## Conclusion

The preconditioning with Dalargin partially prevented the destruction of endothelial cells caused by exposure of the septic patients serum *in vitro* in a dose-dependent manner. Dalargin also prevented the degradation of actin and VE-cadherin in intercellular junction of endothelial cells of Ea.hy 926 line in a dose-dependent manner caused by sera from septic shock patients. Data suggest that the protective activity of Dalargin can preserve the functional vascular barrier in life-threatening critical conditions and ensure the validation *in vivo* studies. Continuation of studies and clarification of molecular mechanisms of endothelial protection by Dalargin might ensure the clinical trial of Dalargin (phase IV) to confirm the organ protection by the drug.

## References

1. Félétou M., Vanhoutte P. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006; 291 (3): H985-H1002. DOI: 10.1152/ajpheart.00292.2006. PMID: 16632549
2. Hirase T., Node K. Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2012; 302 (3): H499-H505. DOI: 10.1152/ajpheart.00325.2011. PMID: 22081698
3. Hughes C.G., Patel M.B., Pandharipande P.P. Pathophysiology of acute brain dysfunction: what's the cause of all this confusion? *Curr. Opin. Crit. Care.* 2012; 18 (5): 518-526. DOI: 10.1097/MCC.0b013e328357effa. PMID: 22941208
4. Opal S., van der Poll T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J. Intern. Med.* 2014; 277 (3): 277-293. DOI: 10.1111/joim.12331. PMID: 25418337
5. Pearson T.A., Mensah G.A., Alexander R.W. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association. *Circulation.* 2003; 107 (3): 499-511. DOI: 10.1161/01.CIR.0000052939.59093.45. PMID: 12551878
6. Титов М.А., Виноградов В.А., Беспалова Ж.Д. Даларгин – пептидный препарат с цитопротективным действием. *Byulleten VKNtS AMN SSSR.* 1985; 2: 72-76. [In Russ.]
7. Instructions for the medical use of the dalargin. [https://www.vidal.ru/drugs/dalargin\\_17150](https://www.vidal.ru/drugs/dalargin_17150) [In Russ.]
8. Likhvantsev V.V., Smirnova V.I., Kuznetsov A.Yu., Peretrukhin A.I., Kakurin F.F., Grinko A.N. Comparative aspects of the use of dalargin in comprehensive anesthesiologic protection during the surgical correction of congenital heart disease. *Anesteziology i Reanimatologiya.* 1992; 4: 23-28. PMID: 8239021. [In Russ.]
9. Schultz J.E., Hsu A.K., Gross G.J. Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by delta1 – but not mu- or kappa-opioid receptors. *Circulation.* 1998; 97 (13): 1282-1289. PMID: 9570199
10. Likhvantsev V.V., Grebenchikov O.A., Shaposhnikov A.A., Borisov K.Yu., Cherpakov R.A., Shulgina N.M. Pharmacological preconditioning: role of opioid peptides. *Obshchaya Reanimatologiy = General Reanimatologiy.* 2012; 8 (3): 51-55. DOI: 10.15360/1813-9779-2012-3-51. [In Russ., In Engl.]
11. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W. The Third International Consensus definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016; 315 (8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287. PMID: 26903338
12. Demyanenko I.A., Popova E.N., Zakharova V.V., Ilyinskaya O.P., Vasilieva T.V., Romashchenko V.P., Fedorov A.V., Manskikh V.N., Skulachev M.V., Zinovkin R.A., Pletjushkina O.Y., Skulachev V.P., Chernyak B.V. Mitochon-



- dria-targeted antioxidant SkQ1 improves impaired dermal wound healing in old mice. *Aging (Albany NY)* 2015; 7 (7): 475-485. DOI: 10.18632/aging.100772. PMID: 26187706
13. Winn R.K., Harlan J.M. The role of endothelial cell apoptosis in inflammatory and immune diseases. *J. Thromb. Haemostasis*. 2005; 3 (8): 1815-1824. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01378.x. PMID: 16102048
  14. Bannerman D.D., Sathyaamoorthy M., Goldblum S.E. Bacterial lipopolysaccharide disrupts endothelial monolayer integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (52): 35371-35380. DOI: 10.1074/jbc.273.52.35371. PMID: 9857080
  15. Галкин И.И., Плетюшкина О.Ю., Зиновкин Р.А., Захарова В.В., Бирюков И.С., Черняк Б.В., Попова Е.Н. Митохондриально-направленные антиоксиданты предотвращают апоптоз эндотелиальных клеток, вызванный фактором некроза опухоли. *Биохимия*. 2014; 79 (2): 169-177. DOI: 10.1134/S0006297914020059. PMID: 24794727
  16. Edgell C.J., McDonald C.C., Graham J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1983; 80 (12): 3734-3737. DOI: 10.1073/pnas.80.12.3734. PMID: 6407019
  17. Ромащенко В.П., Зиновкин Р.А., Галкин И.И., Захарова В.В., Пантелеева А.А., Токарчук А.В., Лямзаев К.Г., Плетюшкина О.Ю., Черняк Б.В., Попова Е.Н. Низкие концентрации разобщителей окислительного фосфорилирования предотвращают воспалительную активацию эндотелиальных клеток, вызванную фактором некроза опухоли. *Биохимия*. 2015; 80 (5): 723-734. DOI: 10.1134/S0006297915050144. PMID: 26071781
  18. Vandembroucke E., Mehta D., Minshall R., Malik A.B. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann. NY Acad. Sci.* 2008; 1123: 134-145. DOI: 10.1196/annals1420.016. PMID: 18375586
  19. Polat G., Ugan R.A., Cadirci E., Halici Z. Sepsis and septic shock: current treatment strategies and new approaches. *Eurasian J. Med.* 2017; 49 (1): 53-58. DOI: 10.5152/eurasianjmed2017.17062. PMID: 28416934
  20. Bunzow J.R., Saez C., Mortrud M., Bouvier C., Williams J.T., Low M., Grandy D.K. Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta, or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett.* 1994; 347 (2-3): 284-288. DOI: 10.1016/0014-5793(94)00561-3. PMID: 8034019
  21. Arendt R.M., Schmoedel M., Wilbert-Lampen U., Plasse A., Heucke L., Werdan K. Bidirectional effects of endogenous opioid peptides on endothelin release rates in porcine aortic endothelial cell culture: mediation by delta opioid receptor and opioid receptor antagonist-insensitive mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995; 272 (1): 1-7. PMID: 7815321
  22. Stefano G.B., Hartman A., Bilfinger T.V., Magazine H.I., Liu Y., Casares F., Goligorsky M.S. Presence of the mu3 opiate receptor in endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilation. *J. Biol. Chem.* 1995; 270 (51): 30290-30293. PMID: 8530450
  23. Коробов Н.В. Даларгин — опиоидный пептид периферического действия. *Фармакология и токсикология*. 1988; 51 (4): 35-38. PMID: 3191970
  24. Липатов И.С., Тежигов Ю.В., Бобряшова Э.В., Пурьгин П.П., Потاپова И.А., Зарубин Ю.П., Якимова Н.А. Иммуные механизмы повреждения эндотелия у беременных и иммунобиологические эффекты синтетического аналога лей-энкефалина — даларгина: клинико-экспериментальное исследование. *Вестник СамГУ*. 1999; 2 (12): 150-156.
  25. Донцов А.В. Антиоксидантный эффект даларгина у пациентов с ишемической болезнью сердца и метаболическим синдромом. *Эксперим. клин. фармакология*. 2015; 78 (7): 3-6. PMID: 26591199.
  26. Abello P.A., Fidler S.A., Bulkley G.B., Buchman T.G. Antioxidants modulate induction of programmed endothelial cell death (apoptosis) by endotoxin. *Arch. Surg.* 1994; 129 (2): 134-140. DOI: 10.1001/archsurg.1994.01420260030003. PMID: 8304825
  27. dria-targeted antioxidant SkQ1 improves impaired dermal wound healing in old mice. *Aging (Albany NY)* 2015; 7 (7): 475-485. DOI: 10.18632/aging.100772. PMID: 26187706
  13. Winn R.K., Harlan J.M. The role of endothelial cell apoptosis in inflammatory and immune diseases. *J. Thromb. Haemostasis*. 2005; 3 (8): 1815-1824. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01378.x. PMID: 16102048
  14. Bannerman D.D., Sathyaamoorthy M., Goldblum S.E. Bacterial lipopolysaccharide disrupts endothelial monolayer integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (52): 35371-35380. DOI: 10.1074/jbc.273.52.35371. PMID: 9857080
  15. Galkin I.I., Pletyushkina O.Yu., Zinovkin R.A., Zakharova V.V., Biryukov I.S., Chernyak B.V., Popova E.N. Mitochondria-targeted antioxidants prevent TNF-induced endothelial cell damage. *Biochemistry (Mosc)*. 2014; 79 (2): 124-130. DOI: 10.1134/S0006297914020059. PMID: 24794727. [In Russ., In Engl.]
  16. Edgell C.J., McDonald C.C., Graham J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1983; 80 (12): 3734-3737. DOI: 10.1073/pnas.80.12.3734. PMID: 6407019
  17. Romaschenko V.P., Zinovkin R.A., Galkin I.I., Zakharova V.V., Panteleyeva A.A., Tokarchuk A.V., Lyamzaev K.G., Pletyushkina O.Yu., Chernyak B.V., Popova E.N. Low concentrations of uncouplers of oxidative phosphorylation prevent inflammatory activation of endothelial cells by Tumor Necrosis Factor. *Biochemistry (Mosc)*. 2015; 80 (5): 610-619. DOI: 10.1134/S0006297915050144. PMID: 26071781. [In Russ., In Engl.]
  18. Vandembroucke E., Mehta D., Minshall R., Malik A.B. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann. NY Acad. Sci.* 2008; 1123: 134-145. DOI: 10.1196/annals1420.016. PMID: 18375586
  19. Polat G., Ugan R.A., Cadirci E., Halici Z. Sepsis and septic shock: current treatment strategies and new approaches. *Eurasian J. Med.* 2017; 49 (1): 53-58. DOI: 10.5152/eurasianjmed2017.17062. PMID: 28416934
  20. Bunzow J.R., Saez C., Mortrud M., Bouvier C., Williams J.T., Low M., Grandy D.K. Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta, or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett.* 1994; 347 (2-3): 284-288. DOI: 10.1016/0014-5793(94)00561-3. PMID: 8034019
  21. Arendt R.M., Schmoedel M., Wilbert-Lampen U., Plasse A., Heucke L., Werdan K. Bidirectional effects of endogenous opioid peptides on endothelin release rates in porcine aortic endothelial cell culture: mediation by delta opioid receptor and opioid receptor antagonist-insensitive mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995; 272 (1): 1-7. PMID: 7815321
  22. Stefano G.B., Hartman A., Bilfinger T.V., Magazine H.I., Liu Y., Casares F., Goligorsky M.S. Presence of the mu3 opiate receptor in endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilation. *J. Biol. Chem.* 1995; 270 (51): 30290-30293. PMID: 8530450
  23. Korobov N.V. Dalargin is an opioid peptide of peripheral action. *Farmakologiya i Toksikologiya*. 1988; 51 (4): 35-38. PMID: 3191970. [In Russ.]
  24. Lipatov I.S., Tezhikov Yu.V., Bobryashova E.V., Purygin P.P., Potapova I.A., Zarubin Yu.P., Yakimova N.A. The immune mechanisms of the damage of the endothelium of the pregnant and immunobiological effects of the synthetic analogue of leu-enkephalin — dalargin: clinical-experimental research. *Vestnik Samarskogo MGU*. 1999; 2 (12): 150-156. [In Russ.]
  25. Dontsov A.V. The antioxidant effect of dalargin in patients with coronary heart disease and metabolic syndrome. *Ekspierimentalnaya i Klinicheskaya Farmakologiya*. 2015; 78 (7): 3-6. PMID: 26591199. [In Russ.]
  26. Abello P.A., Fidler S.A., Bulkley G.B., Buchman T.G. Antioxidants modulate induction of programmed endothelial cell death (apoptosis) by endotoxin. *Arch. Surg.* 1994; 129 (2): 134-140. DOI: 10.1001/archsurg.1994.01420260030003. PMID: 8304825

Поступила 01.07.17

Received 01.07.17

**Диссертации на соискание ученой степени доктора наук без опубликования основных научных результатов в ведущих журналах и изданиях, перечень которых утвержден Высшей аттестационной комиссией, будут отклонены в связи с нарушением п. 10 Положения о порядке присуждения ученых степеней.**

Перечень журналов ВАК, издаваемых в Российской Федерации по специальности 14.01.20 «Анестезиология и реаниматология», в которых рекомендуется публикация основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата медицинских наук:

- *Анестезиология и реаниматология;*
- *Общая реаниматология.*