



Оригинальная статья

Синтетический аналог лей-энкефалина предотвращает активацию нейтрофилов под действием бактериальных компонентов

Гребенчиков О.А.^{1,2} • Шабанов А.К.^{2,3} • Косов А.А.¹ • Скрипкин Ю.В.¹ • Яворовский А.Г.⁴ • Лихванцев В.В.¹

Гребенчиков Олег Александрович – д-р мед. наук, вед. науч. сотр. отделения реаниматологии¹; заведующий лабораторией органопротекции при критических состояниях, Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А. Неговского²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9045-6017>
✉ 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация.
Тел.: +7 (495) 631 74 82.
E-mail: oleg.grebenchikov@yandex.ru

Шабанов Аслан Курбанович – д-р мед. наук, гл. науч. сотр. лаборатории клинической патофизиологии критических состояний, Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А. Неговского²; ст. науч. сотр. отделения реанимации и интенсивной терапии для экстренных больных³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3417-2682>. E-mail: aslan_s@mail.ru

Косов Артем Александрович – мл. науч. сотр. хирургического отделения трансплантологии и диализа¹.
E-mail: artem-kosov@bk.ru

Скрипкин Юрий Вольдемарович – канд. мед. наук, заведующий отделением реанимации и интенсивной терапии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6747-2833>. E-mail: 4skripkin@mail.ru

Яворовский Андрей Георгиевич – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой анестезиологии-реанимации⁴. E-mail: yavor@bk.ru

Лихванцев Валерий Владимирович – д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения реанимации и интенсивной терапии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5442-6950>.
E-mail: lik0704@gmail.com

Актуальность. Активация нейтрофилов – обязательный этап и чувствительный маркер системного воспалительного ответа. С развитием этого состояния сопряжено возникновение полиорганной недостаточности – основного показателя для пребывания пациентов в отделении реанимации. Поиск препаратов, способных предотвратить развитие системного воспалительного ответа и снизить летальность, остается актуальной задачей анестезиологии-реаниматологии. **Цель** – изучить противовоспалительное действие синтетического аналога лей-энкефалина (препарат даларгин) на нейтрофилах человека *in vitro*. **Материал и методы.** Исследование проводилось на выделенных из крови 5 здоровых доноров нейтрофилах, часть из которых активировали с помощью 10 мкМ формил-Мет-Лей-Про (fMLP) и 100 нг/мл липополисахарида (ЛПС) и затем оценивали их активность с помощью флуоресцентных антител к маркерам дегрануляции CD11b и CD66b. Интактные и активированные нейтрофилы обрабатывали раствором даларгина в концентрациях 50 и 100 мкг/мл. **Результаты.** Даларгин в концентрации 100 мкг/мл в 5,5 раза ($p=0,008$) снижает уровень экспрессии молекул CD11b на поверхности интактных нейтрофилов, а ЛПС в дозе 100 нг/мл, напротив, увеличивает экспрессию тех же молекул на 46% ($p=0,08$). Добавление даларгина в концентрации

50 мкг/мл к нейтрофилам, активированным ЛПС, уменьшает экспрессию молекул CD11b ($p=0,016$). Добавление даларгина в концентрациях 50 мкг/мл к активированным fMLP нейтрофилам значительно ($p=0,008$) уменьшает экспрессию молекул CD11b и возвращает ее практически к уровню контроля. Даларгина, добавленный в концентрации 100 мкг/мл к нейтрофилам, активированным fMLP в дозе 10 мкМ, уменьшает экспрессию CD11b на их поверхности до уровня ниже контроля на 23% ($p=0,08$). **Заключение.** Даларгин в исследованных концентрациях оказывает противовоспалительное действие как на интактные, так и на преактивированные бактериальными компонентами нейтрофилы, ингибируя процесс активации и дегрануляции дозозависимым образом.

Ключевые слова: воспаление, лейкоциты, маркеры дегрануляции, даларгин

Для цитирования: Гребенчиков ОА, Шабанов АК, Косов АА, Скрипкин ЮВ, Яворовский АГ, Лихванцев ВВ. Синтетический аналог лей-энкефалина предотвращает активацию нейтрофилов под действием бактериальных компонентов. Альманах клинической медицины. 2019;47. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-026.

Поступила 20.12.2018; принята к публикации 05.06.2019; опубликована xx.06.2019

¹ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

² ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии»; 107031, г. Москва, ул. Петровка, 25/2, Российская Федерация

³ ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»; 129090, г. Москва, Б. Сухаревская пл., 3/21, Российская Федерация

⁴ ФGAOU ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2, Российская Федерация

Синдром системного воспалительного ответа – состояние, возникающее в ответ на различные повреждающие воздействия как инфекционного (бактериальные возбудители) так и неинфекционного (травмы, ожоги, оперативные вмешательства большого объема) генеза [1] и проявляющееся в гиперпродукции провоспалительных цитокинов, их проникновении через гистогематические барьеры с последующей инфильтрацией лейкоцитами и цитокинами тканей органов-мишеней [2, 3]. Последнее приводит к развитию полиорганной недостаточности, которая становится основной причиной гибели пациентов в палате интенсивной терапии.

Важнейшую роль в развитии, регуляции и разрешении воспаления играют нейтрофилы, клетки врожденного иммунитета. Иммунный ответ на повреждение тканей или инфекцию начинается с секреции нейтрофилами провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, что направлено на удаление повреждающего агента и восстановление гомеостаза [4].

Чувствительными маркерами системного воспалительного ответа признаны молекулы CD11b и CD66b, находящиеся во внутриклеточных гранулах нейтрофилов. При действии воспалительных стимулов гранулы сливаются с цитоплазматической мембраной, а молекулы CD11b и CD66b экспонируются на поверхности клеток (рис. 1) – этот процесс называется дегрануляцией. CD11b взаимодействует с рецепторами ICAM-1 (англ. Inter-Cellular Adhesion Molecule) на эндотелиальных клетках, тем самым обеспечивая адгезию нейтрофилов и последующую их миграцию через эндотелиальный барьер к очагу воспаления [5],

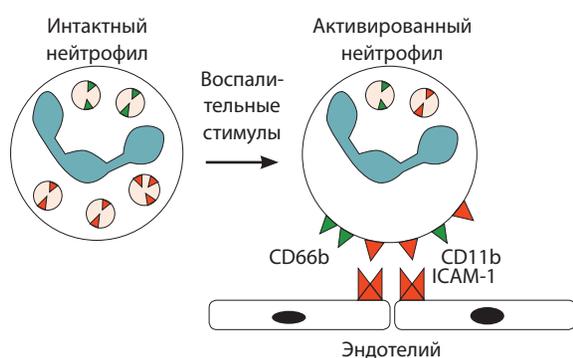


Рис. 1. Активация нейтрофилов и экспрессия ими молекул адгезии CD11b (красный треугольник) и CD66b (зеленый треугольник) под действием воспалительного стимула; ICAM-1 (англ. Inter-Cellular Adhesion Molecule) – молекула клеточной адгезии, которая экспрессируется эндотелием

тогда как CD66b связан с агрегацией нейтрофилов [6].

Молекулы CD11b и CD66b широко используются в клинической диагностике, поскольку их уровень значительно повышен у пациентов с различными видами бактериальных инфекций [7], при ревматоидном артрите [8], диабетической ангиопатии [9] и других заболеваниях. Увеличение CD11b применяют в диагностике неонатальных инфекций [10] и сепсиса, так как имеются многочисленные данные о том, что экспрессия CD11b и CD66b значительно увеличивается при сепсисе и синдроме системного воспалительного ответа [11].

Однако при определенных условиях возникает избыточный иммунный ответ. Он сопровождается гиперактивацией нейтрофилов и других клеток иммунной системы, нарушением их миграции, избыточным количеством провоспалительных цитокинов в крови – так называемой цитокиновой бурей, последующим «иммунным параличом», что и приводит к увеличению числа осложнений у пациентов и повышению летальности [12]. В этом отношении кардиохирургия не исключение: в раннем послеоперационном периоде системный воспалительный ответ (в том числе сепсис) регистрируется у 2,5–20% больных [13]. Несмотря на впечатляющие достижения нашей специальности, следует признать: достаточно эффективных методов лечения этого состояния не существует. Именно поэтому одной из важнейших задач современной реаниматологии остается поиск препаратов для профилактики и лечения синдрома системного воспалительного ответа или предотвращения последующих осложнений.

В наших предыдущих работах был описан органопротекторный эффект отечественного синтетического аналога лей-энкефалина – препарата даларгин, обладающего дельта-опиоидной активностью [14, 15]. Тогда мы не смогли объяснить механизм реализации данного феномена. Сегодня по аналогии с механизмом, описанным для морфина [16], вполне оправданным представляется предположение, что даларгин способен модулировать воспалительный ответ организма как на инфекционные, так и неинфекционные повреждающие агенты. Целью настоящего исследования была проверка данной гипотезы.

Материал и методы

В ходе исследования планировалось изучить противовоспалительное действие синтетического аналога лей-энкефалина (препарат



Даларгин-Эллара, ООО «Эллара», г. Покров, Россия) на активированные компонентами бактерий нейтрофилы человека. Материал для исследования получен на базе ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского; лабораторная часть исследования выполнена в лаборатории молекулярной биологии НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова в июне–августе 2015 г.

Выделение нейтрофилов. Гепаринизированную венозную кровь 5 здоровых доноров смешивали с раствором декстрана Т-500 (“Pharmacocosmos”, 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 (НПП «ПанЭко», Россия) с плотностью 1,077 г/мл и центрифугировали 30 минут при комнатной температуре при 300 g в центрифуге с отключенным тормозом. Затем удаляли супернатант и все дальнейшие процедуры проводили на льду и с использованием охлажденных растворов. Удаление примесных эритроцитов проводили с помощью ресуспендирования осадка в 2 мл деионизированной стерильной воды в течение 45 с, а затем добавляли 2 мл двукратного PBS для восстановления тоничности. Центрифугировали 10 минут при 200 g, +4 °С. Осажденные нейтрофилы промывали PBS и ресуспендировали в культуральной среде (RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) + 10% FBS с низким содержанием эндотоксина).

Активация нейтрофилов. Активацию (дегрануляцию) нейтрофилов измеряли с помощью антител, конъюгированных с флуоресцентными красителями (CD11b-FITC и CD66b-AlexaFluor647 (“BD Biosciences”, США)) согласно протоколу производителя. Для определения активации нейтрофилов использованы антитела к молекулам CD11b (β_2 -интегрин) и CD66b. В качестве индукторов воспаления применены липополисахарид (ЛПС), основной компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий, а также пептид формил-Мет-Лей-Про (fMLP), который бактерии используют при биосинтезе белка.

К нейтрофилам в концентрации 4 млн/мл добавляли 10 мкМ fMLP и даларгин в концентрациях 50 и 100 мкг/мл и инкубировали 30 минут при 37 °С. 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.

К нейтрофилам в концентрации 4 млн/мл добавляли 100 нг/мл ЛПС и даларгин в концентрациях 50 и 100 мкг/мл и инкубировали 30 минут при 37 °С. Затем добавляли антитела и инкубировали 30 минут во льду, после чего измеряли уровень флуоресценции (у.е.ф.) на проточном цитофлуориметре Beckman-Coulter FC 500.

Этическая экспертиза. Протокол исследования одобрен на заседании локального этического комитета ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (протокол № 4 от 14.04.2015). Протоколом предусмотрено получение информированного согласия добровольцев на исследование крови.

Статистический анализ. Для расчетов использовали программы Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.) и MedCalc 12.5.0.0 (MedCalc Software bvba). Средние значения представлены медианой с межквартильным интервалом. Межгрупповые различия показателей оценивались при помощи U-критерия Манна – Уитни и принимались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты

Как видно из табл. 1, уровень экспрессии CD11b на поверхности интактных нейтрофилов составляет 1672,8 [1641,4–1688,0] у.е.ф. Даларгин в концентрации 100 мкг/мл в 5,5 раза ($p = 0,008$) снижает уровень экспрессии молекул CD11b на поверхности интактных нейтрофилов, а ЛПС в дозе 100 нг/мл, напротив, увеличивает

Таблица 1. Уровень экспрессии CD11b (условные единицы флуоресценции) на поверхности нейтрофилов при различных воздействиях

Группа (n=5)	Уровень экспрессии CD11b, у.е.ф. (медиана [Q1–Q3])	Значимость различия, p
Контроль	1672,8 [1641,4–1688]	
Даларгин 50 мкг/мл	470,4 [460,1–525,8]	0,841*
Даларгин 100 мкг/мл	304,8 [293,9–324,1]	0,008*
ЛПС	2397,0 [2387,9–2502,8]	0,008*
ЛПС + даларгин 50 мкг/мл	1666,7 [1622,6–1674,2]	0,016*
ЛПС + даларгин 100 мкг/мл	1012,4 [960,2–1104,1]	0,008*
fMLP	2501,0 [2151,0–2979,3]	0,008*
fMLP + даларгин 50 мкг/мл	1765,0 [1686,2–1902,7]	0,008*
fMLP + даларгин 100 мкг/мл	1293,7 [1272,1–1304,8]	0,008*

ЛПС – липополисахарид, у.е.ф. – условные единицы флуоресценции, fMLP – пептид хемотактический fMet-Leu-Phe

* по отношению к контролю; † по отношению к ЛПС; ‡ по отношению к fMLP



Рис. 2. Даларгин понижает экспрессию маркера дегрануляции CD11b в интактных и преактивированных липополисахаридом (ЛПС) и пептидом хемотактическим fMet-Leu-Phe (fMLP) нейтрофилах человека. Данные представлены уровнем флуоресценции относительно контроля

экспрессию тех же молекул на 46% ($p=0,08$). Добавление даларгина в концентрации 50 мкг/мл к нейтрофилам, активированным ЛПС, уменьшает экспрессию молекул CD11b ($p=0,016$), практически возвращая уровень их экспрессии к контрольному.

Добавление даларгина в концентрациях 100 мкг/мл к активированным ЛПС нейтрофилам уменьшает экспрессию CD11b на 39% ниже уровня контроля ($p=0,08$).

Пептид fMLP, добавленный в дозе 10 мкМ к интактным нейтрофилам, значительно – на 53% ($p=0,08$) – увеличивает экспрессию молекул CD11b на поверхности нейтрофилов по отношению к контролю.

Добавление даларгина в концентрациях 50 мкг/мл к активированным fMLP нейтрофилам значительно ($p=0,008$) уменьшает экспрессию молекул CD11b и возвращает их экспрессию практически к уровню контроля.

Таблица 2. Уровень экспрессии CD66b (условные единицы флуоресценции) на поверхности нейтрофилов при различных воздействиях

Группа (n = 5)	Уровень экспрессии CD66b, у.е.ф. (медиана [Q1–Q3])	Значимость различия, p
Контроль	70420,3 [69973,8–72442,1]	
Даларгин 50 мкг/мл	57543,7 [57540,8–61969,9]	0,016*
Даларгин 100 мкг/мл	52542,2 [52146–53172,5]	0,008*
ЛПС	108469,8 [105091,3–119445,3]	0,008*
ЛПС + даларгин 50 мкг/мл	70673,5 [68602,7–82840,8]	0,008†
ЛПС + даларгин 100 мкг/мл	47981,8 [41774,4–50830,7]	0,008†
fMLP	145804,8 [137011,2–147231,3]	0,008*
fMLP + даларгин 50 мкг/мл	96475,8 [83999,2–99279,7]	0,008†
fMLP + даларгин 100 мкг/мл	86323,4 [85545,7–88886,5]	0,008†

ЛПС – липополисахарид, у.е.ф. – условные единицы флуоресценции, fMLP – пептид хемотактический fMet-Leu-Phe

* по отношению к контролю; † по отношению к ЛПС; ‡ по отношению к fMLP

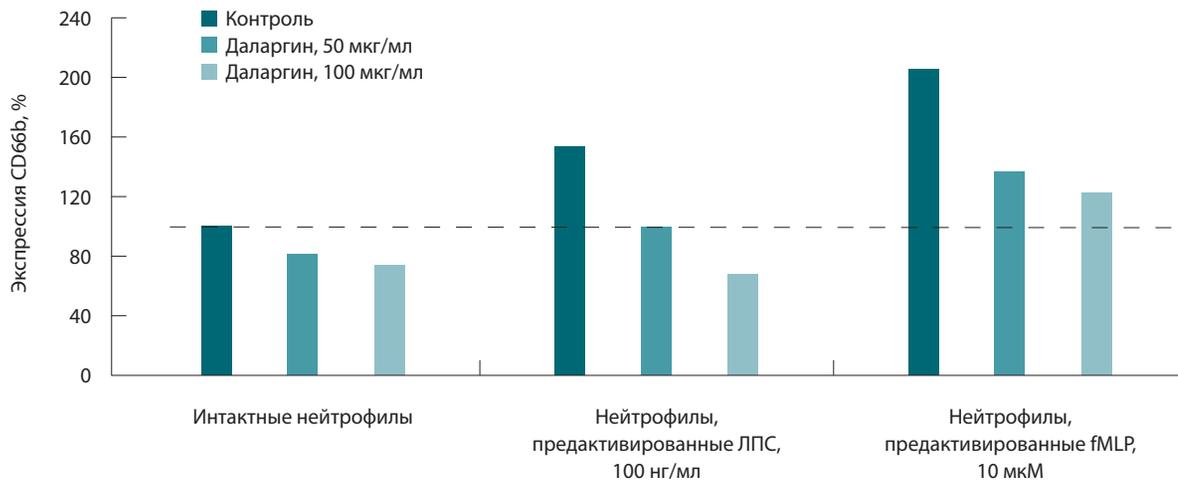


Рис. 3. Даларгин понижает экспрессию маркера дегрануляции CD66b в интактных и преактивированных липополисахаридом (ЛПС) и пептидом хемотаксическим fMet-Leu-Phe (fMLP) нейтрофилах человека. Данные представлены уровнем флуоресценции относительно контроля

Даларгин в концентрации 100 мкг/мл, добавленный к нейтрофилам, активированным fMLP в дозе 10 мкМ, снижает экспрессию CD11b на их поверхности до уровня ниже контроля на 23% ($p=0,08$) (рис. 2).

Как видно из табл. 2, даларгин в концентрации 50 мкг/мл значимо – на 15% ($p=0,016$) – снижает уровень экспрессии молекул CD66b на поверхности интактных нейтрофилов по отношению к контролю. Даларгин в концентрации 100 мкг/мл значимо – на 25% ($p=0,008$) – снижает уровень экспрессии молекул CD66b в интактных нейтрофилах по отношению к контролю.

ЛПС, добавленный в дозе 100 нг/мл, значимо – на 54% ($p=0,08$) – увеличивает экспрессию молекул CD11b на поверхности нейтрофилов в сравнении с контролем.

Добавление даларгина в концентрации 50 мкг/мл к активированным ЛПС нейтрофилам значимо ($p=0,008$) уменьшает уровень экспрессии молекул CD66b на их поверхности и возвращает его практически к уровню контроля. Добавление даларгина в концентрациях 100 мкг/мл к активированным ЛПС нейтрофилам уменьшает экспрессию CD66b на 33% ниже уровня контроля ($p=0,08$).

Пептид fMLP, добавленный в дозе 10 мкМ к интактным нейтрофилам, значимо – на 103% ($p=0,08$) – увеличивает экспрессию молекул CD66b на поверхности нейтрофилов по отношению к контролю.

Добавление даларгина в концентрациях 50 мкг/мл к активированным fMLP нейтрофилам

уменьшает на 70% ($p=0,008$) экспрессию молекул CD66b по отношению к уровню активации. Добавление даларгина в концентрациях 100 мкг/мл к активированным fMLP нейтрофилам уменьшает на 80% ($p=0,008$) экспрессию молекул CD66b при сравнении с уровнем активации (рис. 3).

Обсуждение

В настоящее время ЛПС и fMLP широко используются для провокации системного воспалительного ответа в эксперименте [17]. Полученные нами результаты подтверждают эффективность данных методик.

В описанных экспериментах даларгин снижает уровень активации нейтрофилов, оказывая противовоспалительный эффект как на интактные клетки, так и на предварительно активированные компонентами бактерий (ЛПС, fMLP) нейтрофилы. Ранее нами было показано, что синтетический аналог лей-энкефалина может предотвращать развитие эндотелиальной дисфункции в модели сепсиса *in vitro* [18]. Возможно, второе (предотвращение эндотелиальной дисфункции) является следствием первого (ингибирование даларгином процесса активации нейтрофилов). Однако это только первый шаг в процессе познания механизмов противовоспалительного действия даларгина.

Детальный механизм действия препарата все еще представляется малоизученным и требует дальнейших исследований. Известно, что даларгин является агонистом опиоидных рецепторов,



а нейтрофилы в норме практически не экспрессируют данные рецепторы. Но как показали I.D. Welters и соавт. [19], под действием провоспалительных агентов (например, фактора некроза опухоли α) экспрессия всех типов опиоидных рецепторов увеличивается практически в 10 раз. Следовательно, действие даларгина на активированные нейтрофилы вполне может быть опосредовано опиоидными рецепторами нейтрофилов. Но не только ими. Легко проникать внутрь клетки и даже накапливаться в митохондриях могут и другие похожие по структуре пептиды с флуоресцентной меткой [20, 21]. Кроме того, мы предполагаем, что даларгин может влиять на фосфорилирование GSK- α/β , которая, в свою очередь, играет огромную роль в жизнедеятельности лейкоцитов: регулирует их миграцию, дегрануляцию и продолжительность жизни.

Таким образом, даларгин представляется нам перспективным препаратом для лечения синдрома системного воспалительного ответа, но механизмы его действия на эндотелиальные клетки и клетки иммунной системы остаются малоизученными.

Ограничение исследования

Изучение биологических процессов, связанных с действием отдельных веществ на нейтрофилы,

предполагает использование подходов *in vitro*, однако полученные результаты нуждаются в проверке на животных моделях и (в случае успеха) у пациентов.

Использованная нами концентрация даларгина недостижима при переносе исследования в область *in vivo*. Полученные результаты обнадеживают, вместе с тем следует продолжить эксперименты и изучить эффективность тех доз даларгина, которые могут быть получены *in vivo*.

Остаются неизученными и молекулярные механизмы противовоспалительного действия даларгина на нейтрофилы. Для решения этого вопроса требуются дальнейшие исследования.

Заключение

Даларгин оказывает противовоспалительное действие как на интактные, так и на преактивированные бактериальными компонентами нейтрофилы, уменьшая их активацию и дегрануляцию дозозависимым образом. Подтверждение вышеизложенного в моделях *in vivo* и раскрытие молекулярных механизмов действия даларгина на клетки врожденного иммунитета, возможно, позволят инициировать клиническое испытание даларгина для изучения его предполагаемых органопротекторных свойств. ©

Дополнительная информация

Финансирование

Работа выполнена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц на основе договора о безвозмездном научном сотрудничестве между ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского и НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

О.А. Гребенчиков – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материалов, анализ полученных данных, написание текста. А.К. Шабанов, А.А. Косов и А.Г. Яворовский – анализ экспериментальных результатов исследования, написание текста, редактирование рукописи. Ю.В. Скрипкин – анализ экспериментальных результатов исследования, статистическая обработка данных, написание текста, редактирование рукописи. В.В. Лихванцев – анализ экспериментальных результатов исследования, концепция и дизайн статьи, редактирование текста, утверждение итогового варианта текста рукописи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Литература

1. Balk RA. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): where did it come from and is it still relevant today? *Virulence*. 2014;5(1):20–6. doi: 10.4161/viru.27135.
2. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007;55(5):453–62. doi: 10.1002/glia.20467.
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):447–56. doi: 10.1016/j.neuint.2007.08.006.
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):161–75.
5. Parkos CA, Colgan SP, Madara JL. Interactions of neutrophils with epithelial cells: lessons from the intestine. *J Am Soc Nephrol*. 1994;5(2):138–52.
6. Schmidt T, Zündorf J, Grüger T, Brandenburg K, Reiners AL, Zinserling J, Schnitzler N. 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. doi: 10.1189/jlb.0911483.
7. Lilius EM, Nuutila J. Bacterial infections, DNA virus infections, and RNA virus infections manifest differently in neutrophil receptor expression. *Scientific*



- ficWorldJournal. 2012;2012:527347. doi: 10.1100/2012/527347.
8. Lioté F, Boval-Boizard B, Weill D, Kuntz D, Wautier JL. Blood monocyte activation in rheumatoid arthritis: increased monocyte adhesiveness, integrin expression, and cytokine release. *Clin Exp Immunol.* 1996;106(1):13–9. doi: 10.1046/j.1365-2249.1996.d01-820.x.
 9. Mastej K, Adamiec R. Neutrophil surface expression of CD11b and CD62L in diabetic microangiopathy. *Acta Diabetol.* 2008;45(3):183–90. doi: 10.1007/s00592-008-0040-0.
 10. Weirich E, Rabin RL, Maldonado Y, Benitz W, Modler S, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Neutrophil CD11b expression as a diagnostic marker for early-onset neonatal infection. *J Pediatr.* 1998;132(3 Pt 1):445–51. doi: 10.1016/S0022-3476(98)70018-6.
 11. Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CG, Tervaert JW. Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med.* 2000;26(7):883–92.
 12. Boomer JS, Green JM, Hotchkiss RS. The changing immune system in sepsis: is individualized immuno-modulatory therapy the answer? *Virulence.* 2014;5(1):45–56. doi: 10.4161/viru.26516.
 13. Ball L, Costantino F, Pelosi P. Postoperative complications of patients undergoing cardiac surgery. *Curr Opin Crit Care.* 2016;22(4):386–92. doi: 10.1097/MCC.0000000000000319.
 14. Лихванцев ВВ, Гребенчиков ОА, Борисов КЮ, Шайбакова ВЛ, Шапошников АА, Черпаков РА, Шмелева ЕВ. Механизмы фармакологического preconditionирования мозга и сравнительная эффективность препаратов – ингибиторов гликоген-синтазы-киназы – 3 бета прямого и непрямого действия (экспериментальное исследование). *Общая реаниматология.* 2012;8(6):37. doi: 10.15360/1813-9779-2012-6-37.
 15. Лихванцев ВВ, Гребенчиков ОА, Шапошников АА, Борисов КЮ, Черпаков РА, Шульгина НМ. Фармакологическое preconditionирование: роль опиоидных пептидов. *Общая реаниматология.* 2012;8(3):51. doi: 10.15360/1813-9779-2012-3-51.
 16. Schultz JJ, Hsu AK, Gross GJ. Ischemic preconditioning and morphine-induced cardioprotection involve the delta (delta)-opioid receptor in the intact rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29(8):2187–95. doi: 10.1006/jmcc.1997.0454.
 17. Vorobjeva N, Prikhodko A, Galkin I, Pletjushkina O, Zinovkin R, Sud'ina G, Chernyak B, Pinegin B. Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils in vitro. *Eur J Cell Biol.* 2017;96(3):254–65. doi: 10.1016/j.ejcb.2017.03.003.
 18. Гребенчиков ОА, Овезов АМ, Скрипкин ЮВ, Забелина ТС, Улиткина ОН, Луговой АВ, Приходько АС, Рыжков АЮ, Зиновкин РА. Синтетический аналог лей-энкефалина предотвращает развитие эндотелиальной дисфункции in vitro. *Общая реаниматология.* 2018;14(2):60–8. doi: 10.15360/1813-9779-2018-2-60-68.
 19. Welters ID, Menzebach A, Goumon Y, Langefeld TW, Harbach H, Mühling J, Cadet P, Stefano GB. Morphine inhibits AP-1 activity and CD14 expression in leukocytes by a nitric oxide and opioid receptor-dependent mechanism. *Eur J Anaesthesiol.* 2007;24(11):958–65. doi: 10.1017/S026502150700083X.
 20. Szeto HH, Schiller PW, Zhao K, Luo G. Fluorescent dyes alter intracellular targeting and function of cell-penetrating tetrapeptides. *FASEB J.* 2005;19(1):118–20. doi: 10.1096/fj.04-1982fe.
 21. Zhao K, Luo G, Zhao GM, Schiller PW, Szeto HH. Transcellular transport of a highly polar 3+ net charge opioid tetrapeptide. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;304(1):425–32. doi: 10.1124/jpet.102.040147.
 1. Balk RA. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): where did it come from and is it still relevant today? *Virulence.* 2014;5(1):20–6. doi: 10.4161/viru.27135.
 2. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia.* 2007;55(5):453–62. doi: 10.1002/glia.20467.
 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):447–56. doi: 10.1016/j.neuint.2007.08.006.
 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):161–75.
 5. Parkos CA, Colgan SP, Madara JL. Interactions of neutrophils with epithelial cells: lessons from the intestine. *J Am Soc Nephrol.* 1994;5(2):138–52.
 6. Schmidt T, Zündorf J, Grüger T, Brandenburg K, Reiners AL, Zinserling J, Schnitzler N. 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. doi: 10.1189/jlb.0911483.
 7. Lilius EM, Nuutila J. Bacterial infections, DNA virus infections, and RNA virus infections manifest differently in neutrophil receptor expression. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:527347. doi: 10.1100/2012/527347.
 8. Lioté F, Boval-Boizard B, Weill D, Wautier JL. Blood monocyte activation in rheumatoid arthritis: increased monocyte adhesiveness, integrin expression, and cytokine release. *Clin Exp Immunol.* 1996;106(1):13–9. doi: 10.1046/j.1365-2249.1996.d01-820.x.
 9. Mastej K, Adamiec R. Neutrophil surface expression of CD11b and CD62L in diabetic microangiopathy. *Acta Diabetol.* 2008;45(3):183–90. doi: 10.1007/s00592-008-0040-0.
 10. Weirich E, Rabin RL, Maldonado Y, Benitz W, Modler S, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Neutrophil CD11b expression as a diagnostic marker for early-onset neonatal infection. *J Pediatr.* 1998;132(3 Pt 1):445–51. doi: 10.1016/S0022-3476(98)70018-6.
 11. Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CG, Tervaert JW. Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med.* 2000;26(7):883–92.
 12. Boomer JS, Green JM, Hotchkiss RS. The changing immune system in sepsis: is individualized immuno-modulatory therapy the answer? *Virulence.* 2014;5(1):45–56. doi: 10.4161/viru.26516.
 13. Ball L, Costantino F, Pelosi P. Postoperative complications of patients undergoing cardiac surgery. *Curr Opin Crit Care.* 2016;22(4):386–92. doi: 10.1097/MCC.0000000000000319.
 14. Likhvantsev VV, Grebenchikov OA, Borisov KY, Shaibakova VL, Shaposhnikov AA, Cherpakov RA, Shmeleva EV. The mechanisms of pharmacological preconditioning of the brain and the comparative efficacy of the drugs – direct- and indirect-acting glycogen synthase kinase-3β inhibitors: experimental study. *General Reanimatology.* 2012;8(6):37. Russian. doi: 10.15360/1813-9779-2012-6-37.
 15. Likhvantsev VV, Grebenchikov OA, Shaposhnikov AA, Borisov KY, Cherpakov RA, Shulgina NM. Pharmacological preconditioning: role of opioid peptides. *General Reanimatology.* 2012;8(3):51. Russian. doi: 10.15360/1813-9779-2012-3-51.
 16. Schultz JJ, Hsu AK, Gross GJ. Ischemic preconditioning and morphine-induced cardioprotection involve the delta (delta)-opioid receptor in the intact rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29(8):2187–95. doi: 10.1006/jmcc.1997.0454.
 17. Vorobjeva N, Prikhodko A, Galkin I, Pletjushkina O, Zinovkin R, Sud'ina G, Chernyak B, Pinegin B. Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils in vitro. *Eur J Cell Biol.* 2017;96(3):254–65. doi: 10.1016/j.ejcb.2017.03.003.
 18. Grebenchikov OA, Ovezov AM, Skripkin YV, Zabelina TS, Ulitkina ON, Lugovoy AV, Prikhodko AS,



Ryzhkov AY, Zinovkin RA. Synthetic analogue of leu-enkephalin prevents endothelial dysfunction *in vitro*. *General Reanimatology*. 2018;14(2): 60–8. Russian. doi: 10.15360/1813-9779-2018-2-60-68.

19. Welters ID, Menzebach A, Goumon Y, Langefeld TW, Harbach H, Mühling J, Cadet P, Ste-

fano GB. Morphine inhibits AP-1 activity and CD14 expression in leukocytes by a nitric oxide and opioid receptor-dependent mechanism. *Eur J Anaesthesiol*. 2007;24(11):958–65. doi: 10.1017/S026502150700083X.

20. Szeto HH, Schiller PW, Zhao K, Luo G. Fluorescent dyes alter intracellular targeting and func-

tion of cell-penetrating tetrapeptides. *FASEB J*. 2005;19(1):118–20. doi: 10.1096/fj.04-1982fje.

21. Zhao K, Luo G, Zhao GM, Schiller PW, Szeto HH. Transcellular transport of a highly polar 3+ net charge opioid tetrapeptide. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;304(1):425–32. doi: 10.1124/jpet.102.040147.

Synthetic leu-enkefalin analogue prevents activation of neutrophils induced by a bacterial component

O.A. Grebenchikov^{1,2} • A.K. Shabanov^{2,3} • A.A. Kosov¹ • Yu.V. Skripkin¹ • A.G. Yavorovsky⁴ • V.V. Likhvantsev¹

Background: Neutrophil activation is a mandatory stage and a sensitive marker of systemic inflammatory response. The development of this condition is associated with subsequent multiple organ failure which is the main indication for the patients stay in the intensive care unit. The search for drugs that could prevent the development of systemic inflammatory response and reduce mortality remains an urgent task of anesthesiology/resuscitation. **Aim:** To study the anti-inflammatory effect of dalargin, a synthetic analogue of lei-enkephalin, on human neutrophils *in vitro*. **Materials and methods:** The study was performed on blood neutrophils isolated from 5 healthy donors. A proportion of neutrophils were activated by 10 mkM formil-Met-Leu-Pro (fMLP) and 100 ng/mL lipopolysaccharide (LPS) with subsequent assessment of their activity by fluorescent antibodies to the degranulation markers CD11b and CD66b. Thereafter intact and activated neutrophils were treated with dalargin solution at concentrations of 50 and 100 mcg/mL. **Results:** Dalargin at 100 mcg/mL reduced the expression of CD11b molecules on the surface of intact neutrophils by 5.5-fold ($p=0.008$). On the contrary, LPS at a dose of 100 ng/mL increased the expression of the same molecules by 46% ($p=0.08$). The addition of dalargin at

50 mcg/mL to LPS-activated neutrophils reduced the expression of CD11b molecules ($p=0.016$). The addition of dalargin at 50 mcg/mL to fMLP-activated neutrophils significantly ($p=0.008$) reduced the expression of CD11b molecules and reversed their expression virtually to the level of the control. The addition of dalargin at 100 mcg/mL to neutrophils activated by fMLP at 10 mkM reduced the expression of CD11b on their surface to a level below the control by 23% ($p=0.08$). **Conclusion:** Dalargin at the studied concentrations has an anti-inflammatory effect on both intact and pre-activated bacterial components of neutrophils, thus inhibiting the process of activation and degranulation in a dose-dependent manner.

Key words: inflammation, leukocyte, degranulation test, dalargin

For citation: Grebenchikov OA, Shabanov AK, Kosov AA, Skripkin YuV, Yavorovsky AG, Likhvantsev VV. Synthetic leu-enkefalin analogue prevents activation of neutrophils induced by a bacterial component. *Almanac of Clinical Medicine*. 2019;47. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-026.

Received 20 December 2018; accepted 5 June 2019; published xx June 2019

Funding

The study was performed without additional financial support from any third parties under the Agreement on gratuitous research collaboration between Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI) and A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Authors' contributions

O.A. Grebenchikov, the concept and design of the study, data collection, management and analysis, text writing. A.K. Shabanov, A.A. Kosov and A.G. Yavorovsky, analysis of experimental study results, text writing, editing of the manuscript. Yu.V. Skripkin, analysis of experimental study results, statistical analysis, text writing, editing of the manuscript. V.V. Likhvantsev, analysis of experimental study results, the concept and design of the study, text editing, approval of the final version of the manuscript. All authors have contributed significantly to the study conduct and preparation of the paper, have read and approved its final version before the publication.

Oleg A. Grebenchikov – MD, PhD, Leading Research Fellow, Intensive Care Department¹; Head of the Laboratory of Organ Protection in Critical Conditions, V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9045-6017>

✉ 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 631 74 82.

E-mail: oleg.grebenchikov@yandex.ru

Aslan K. Shabanov – MD, PhD, Chief Research Fellow, Laboratory of Clinical Pathophysiology of Critical Conditions, V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology²; Senior Research Fellow, Reanimation and Intensive Care Emergency Department³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3417-2682>. E-mail: aslan_s@mail.ru

Artem A. Kosov – Junior Research Fellow, Department of Organ Transplantation Surgery and Dialysis¹. E-mail: artem-kosov@bk.ru

Yuri V. Skripkin – MD, PhD, Head of Department of Reanimation and Intensive Care¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6747-2833>. E-mail: 4skripkin@mail.ru

Andrey G. Yavorovsky – MD, PhD, Professor, Head of the Anesthesiology and Reanimation Department⁴. E-mail: yavor@bk.ru

Valery V. Likhvantsev – MD, PhD, Professor, Chief of Department of Reanimation and Intensive Care¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5442-6950>. E-mail: lik0704@gmail.com

¹Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation

²Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation; 25/2 Petrovka ul., Moscow, 107031, Russian Federation

³N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine; 3 Bolshaya Sukharevskaya ploshchad', Moscow, 129090, Russian Federation

⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8/2 Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russian Federation

Table 1. CD11b expression levels (fluorescence units) on the surface of neutrophils under various stimuli

Group (n = 5)	CD11b expression, f.u. (median [Q1–Q3])	P value
Control	1672.8 [1641.4–1688.0]	
Dalargin 50 mcg/mL	470.4 [460.1–525.8]	0.841*
Dalargin 100 mcg/mL	304.8 [293.9–324.1]	0.008*
LPS	2397.0 [2387.9–2502.8]	0.008*
LPS + dalargin 50 mcg/mL	1666.7 [1622.6–1674.2]	0.016†
LPS + dalargin 100 mcg/mL	1012.4 [960.2–1104.1]	0.008†
fMLP	2501.0 [2151.0–2979.3]	0.008*
fMLP + dalargin 50 mcg/mL	1765.0 [1686.2–1902.7]	0.008‡
fMLP + dalargin 100 mcg/mL	1293.7 [1272.1–1304.8]	0.008‡

LPS lipopolysaccharide, f.u. fluorescence units, fMLP chemotactic peptide fMet-Leu-Phe

* compared to the control; † compared to LPS; ‡ compared to fMLP

Table 2. CD66b expression levels (fluorescence units) on the surface of neutrophils under various stimuli

Group (n = 5)	CD66b expression, f.u. (median [Q1–Q3])	P value
Control	70420.3 [69973.8–72442.1]	
Dalargin 50 mcg/mL	57543.7 [57540.8–61969.9]	0.016*
Dalargin 100 mcg/mL	52542.2 [52146.0–53172.5]	0.008*
LPS	108469.8 [105091.3–119445.3]	0.008*
LPS + dalargin 50 mcg/mL	70673.5 [68602.7–82840.8]	0.008†
LPS + dalargin 100 mcg/mL	47981.8 [41774.4–50830.7]	0.008†
fMLP	145804.8 [137011.2–147231.3]	0.008*
fMLP + dalargin 50 mcg/mL	96475.8 [83999.2–99279.7]	0.008‡
fMLP + dalargin 100 mcg/mL	86323.4 [85545.7–88886.5]	0.008‡

LPS lipopolysaccharide, f.u. fluorescence units, fMLP chemotactic peptide fMet-Leu-Phe

* compared to the control; † compared to LPS; ‡ compared to fMLP

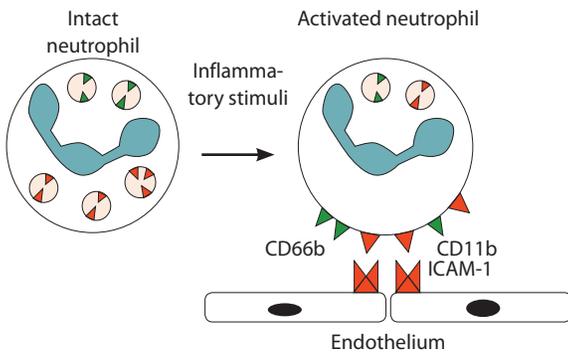


Fig. 1. Neutrophil activation and expression of adhesion molecules CD11b (red triangle) and CD66b (green triangle) induced by an inflammatory stimulus; *ICAM-1* intercellular adhesion molecule expressed by the endothelium

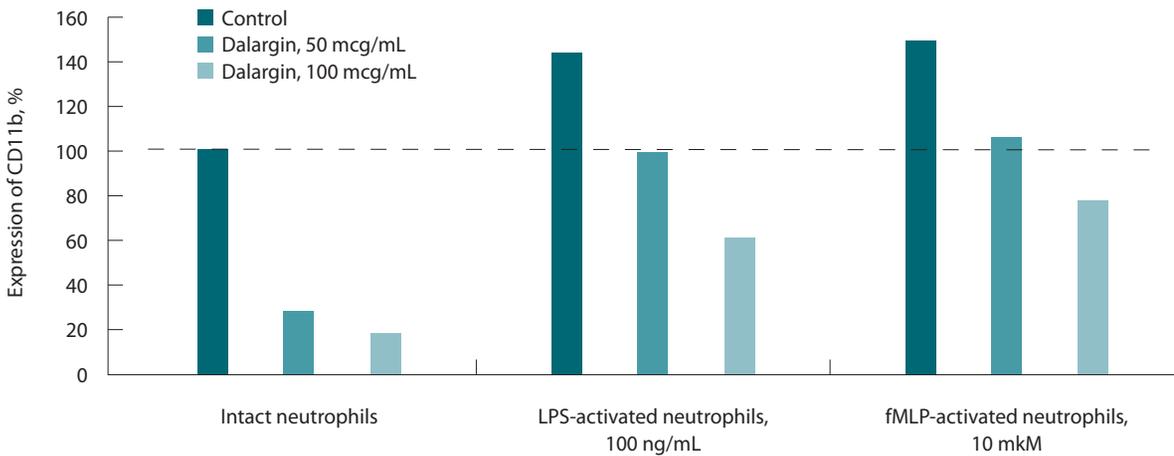


Fig. 2. Dalargin reduces the expression of degranulation marker CD11b in intact and lipopolysaccharide (LPS)- and chemotactic peptide fMet-Leu-Phe (fMLP)-activated human neutrophils. The data is presented as the level of fluorescence compared to the control

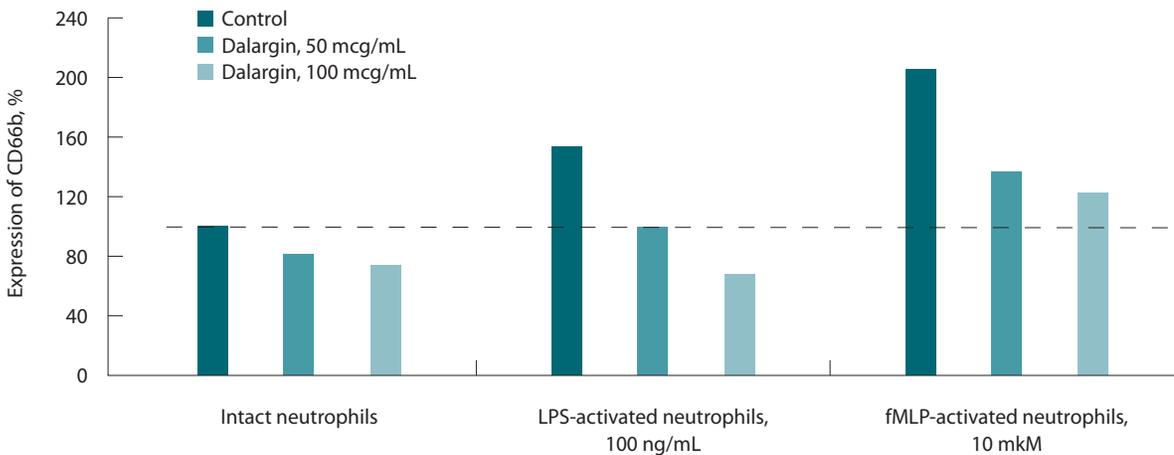


Fig. 3. Dalargin reduces the expression of degranulation marker CD66b in intact and lipopolysaccharide (LPS)- and chemotactic peptide fMet-Leu-Phe (fMLP)-activated human neutrophils. The data is presented as the level of fluorescence compared to the control