

УДК 577.17.084: 612.592: 57.086.13

І.Й. Щенявський, О.К. Гулевський*

Вивчення захисної дії синтетичного нейропептиду даларгіну в умовах холодного стресу

UDC 577.17.084: 612.592: 57.086.13

I.I. Schenyavsky, O.K. Gulevsky*

Study of Protective Effect of Synthetic Neuropeptide Dalargin Under Cold Stress

Реферат: Проведено дослідження впливу нейропептиду даларгіну, який є синтетичним аналогом лей-енкефалінів, на обумовлені холодним стресом негативні процеси, котрі мають місце при штучній гіпотермії *in vivo*. Показано, що даларгін запобігає розвитку апоптотичних процесів у клітинах гоміотермних тварин після холодного стресу, що проявлялося у зменшенні ступеня фрагментації ДНК. У нирках та печінці тварин, підданих охолодженню, даної ознаки апоптозу і некрозу клітин не виявлено, а в слизовій оболонці кишечника та селезінці ступінь фрагментації ДНК значуще підвищується. Попереднє введення шурам даларгіну зменшує ступінь фрагментації ДНК до значень тварин без холодного впливу. Показано, що даларгін запобігає розвитку у експериментальних тварин гіпертрофії наднирників, зменшує ступінь інволюції тимуса та селезінки, знижує вираженість індукованого холодним стресом ульцерогенезу. Одночасне введення тваринам антагоніста опіатних рецепторів налоксону пригнічує захисну дію агоніста опіатних рецепторів даларгіну.

Ключові слова: нейропептиди, даларгін, гіпотермія, холодний стрес, апоптоз, стрес-протекторна дія.

Реферат: Проведено исследование влияния нейропептида даларгина, который является синтетическим аналогом лей-енкефалинов, на обусловленные холодным стрессом негативные процессы, которые имеют место при искусственной гипотермии *in vivo*. Показано, что даларгин предотвращает развитие апоптотических процессов в клетках гоміотермных животных после холодного стресса, что проявлялось в уменьшении степени фрагментации ДНК. В почках и печени животных, подвергнутых охлаждению, данного признака апоптоза и некроза клеток не обнаружено, а в слизистой оболочке кишечника и селезенке степень фрагментации ДНК значительно повышается. Предварительное введение крысам даларгина уменьшает степень фрагментации ДНК до значений животных без холодного воздействия. Показано, что даларгин предотвращает развитие у экспериментальных животных гипертрофии надпочечников, уменьшает степень инволюции тимуса и селезенки, снижает выраженность индуцированного холодным стрессом ульцерогенеза. Одновременное введение животным антагониста опіатных рецепторов налоксона подавляет защитное действие агониста опіатных рецепторов даларгина.

Ключевые слова: нейропептиды, даларгин, гипотермия, холодный стресс, апоптоз, стресс-протекторное действие.

Abstract: The effect of neuropeptide dalargin, that is synthetic analogue of leu-enkephalins, on the cold stress-induced negative processes, occurring under artificial hypothermia *in vivo*, has been studied. The dalargin was demonstrated to prevent an apoptotic process development in cells of homeotherms after cold stress, that was manifested in a decreased level of DNA fragmentation. In kidneys and liver of the animals exposed to cooling, no signs of cell apoptosis and necrosis were revealed, and in the intestinal mucosa and spleen the level of DNA fragmentation was statistically and significantly increased. The preliminary injection of dalargin to rats reduces the DNA fragmentation level down to the values for the animals with no cold exposure. It was shown that dalargin prevented the development of adrenal hypertrophy in experimental animals, reduced the level of thymus and spleen involution, and decreased the severity of cold stress-induced ulcerogenesis. The simultaneous injection to animals of an opioid receptor antagonist naloxone suppressed a protective effect of opioid receptor agonist dalargin.

Key words: neuropeptides, dalargin, hypothermia, cold stress, apoptosis, stress-tread effect.

Відомо, що у гоміотермних тварин та людини внаслідок значного зниження температури відносно фізіологічної норми запускається ряд процесів у клітинах, тканинах, окремих органах та на рівні цілого організму [12, 13, 18]. Зниження інтенсивності обмінних процесів та зменшення споживання кисню супроводжується розвитком гіпоксії. При цьому спостерігається значне пригнічення функцій ЦНС та імунологічної

It is known that in homeotherms and human, a number of processes are triggered in cells, tissues, certain organs and at the whole body level due to a significant temperature decrease relative to physiological norm [5, 6, 18], *i. e.* there is a decrease in the intensity of metabolic process and immunological reactivity of a body, the reduction of oxygen consumption, accompanied by hypoxia development, and CNS function inhibition.

Відділ холодової адаптації, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Department of Cold Adaptation, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: profgulevskyy@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: profgulevskyy@gmail.com

Надійшла 27.02.2018

Прийнята до друку 03.09.2019

Received February, 27, 2018

Accepted September, 03, 2019

© 2019 O.K. Gulevsky, *et al.* Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

реактивності організму. Наступне відновлення температури тіла (ТТ) до фізіологічного рівня не завжди усуває всі викликані гіпотермією та наступним відігріванням порушення регуляторних систем і структурних елементів, що в окремих випадках може мати летальні наслідки.

Внаслідок стресових впливів активується і бере участь в реалізації стрес-реакції організму система опіатних пептидів як регуляторів рівня больової чутливості, модуляторів емоційної поведінки та вегетативної нервової системи. Це супроводжується підвищенням больового порогу, розвитком аналгезії [1, 5]. Відомо, що ендогенні антистресові речовини та їх синтетичні аналоги, зокрема опіоїди, відіграють важливу роль у пригнічуванні стрес-індукованих вільнорадикальних процесів і чинять протекторну дію на мембрани, стримують розвиток апоптотичних процесів [11, 14, 15, 20]. У літературних джерелах згадується ряд біологічних сполук, а саме пептидів природного та штучного походження, введення яких експериментальним тваринам або до складу інкубаційних середовищ сприяє резистентності клітинних культур до холодового впливу [16, 19]. Наприклад, такою здатністю володіють речовини пептидної природи, отримані з мозку гібернуючих тварин [3]. Існують відомості щодо участі в підтримці стану зимової сплячки таких нейропептидів, як лей- і метенкефаліни [9]. До групи лей-енкефалінів відноситься синтетичний аналог пептиду з головного мозку гібернуючих тварин – гексапептид Лей-Тир-Д-Ала-Глі-Фен-Лей-Арг, відомий як даларгін, котрий містить спільну для всіх лей-енкефалінів послідовність амінокислот [5]. Захисну дію цього пептиду на організм в умовах гіпотермії доведено [7], однак дані щодо його антиапоптотичної дії в умовах холодового стресу (ХС) відсутні.

У зв'язку з вищевикладеним метою роботи було вивчення захисної дії агоніста опіатних рецепторів гексапептиду Лей-Тир-Д-Ала-Глі-Фен-Лей-Арг (даларгін) в умовах холодового стресу, викликаного у експериментальних щурів глибоким охолодженням (до 20°C) та наступним відігріванням до фізіологічного рівня.

Матеріали та методи

У роботі використовували білих щурів-самців із середньою масою тіла (273 ± 12) г. Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) із дотриманням вимог Комітету з біоетики Інституту, узгоджених із положенням «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються

Further recovery of body temperature (BT) up to physiological level does not fully eliminate all the disorders of regulatory systems and structural elements, resulted from hypothermia and subsequent warming, and in some cases they may be fatal.

Because of stress effects, the system of opioid peptides being regulators of the pain sensitivity level, modulators of emotional behavior and autonomic nervous system, is activated and participates in implementation of the body's stress responses. This is accompanied by an increase in pain threshold, and analgesia development [9, 14]. It is known that the endogenous anti-stress substances and their synthetic analogues, in particular opioids, play a key role in limiting the stress-induced free radical processes, have a protective effect on membranes, and inhibit the apoptotic process development [3, 10, 11, 20]. There are the reports about a number of biological compounds, namely peptides of natural and artificial origins, the administration of which either to experimental animals or to the composition of incubation media contributes to the resistance of cell cultures to a cold impact [16, 19]. For example, this capability is inherent to the substances of peptide nature derived from hibernators' brain [7]. Such neuropeptides as leu- and meth-enkephalins were reported to be involved in maintenance of winter hibernation state [1]. The group of leu-enkephalins comprises a synthetic analogue of peptide derived from hibernators's brain: hexapeptide Leu-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg, known as dalargin, containing the amino acid sequence common for all the leu-enkephalins [9]. Protective effect of this peptide on a body under hypothermia has been proven [13], but there are no reported data on its anti-apoptotic effect under cold stress (CS).

Proceeding from the mentioned above, this research was aimed to study a protective effect of opioid receptor agonist of Leu-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg (dalargin) hexapeptide under cold stress, induced in experimental rats by deep cooling (down to 20°C) and following warming up to physiological level.

Materials and methods

White male rats with an average body weight of (273 ± 12) were used in this study. The experiments were carried out in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals from Cruelty' (№ 3447-IV of 21.02.2006) in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute in line with the provisions of the 'European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986).

в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Перед початком експерименту тварин розподілили на групи ($n = 4$ у кожній): 1 – тварини, яким за півгодини до початку стресуючого впливу внутрішньочеревно вводили досліджуваний гексапептид Лей-Тир-Д-Ала-Глі-Фен-Лей-Арг («Даларгін», «Пептидные технологии», Росія) у дозі 100 мкг на 1 кг маси тіла; 2 – тварини, яким за півгодини до початку охолодження вводили 250 мкл фізіологічного розчину; 3 – тварини, яким одночасно з агоністом опіатних рецепторів даларгіном вводили антагоніст опіатних рецепторів налоксон («Налоксон», «Здоров'я народу», Україна) у дозі 200 мкг на 1 кг маси тварини; 4 – щури, яким не вводили препаратів та яких не піддавали охолодженню.

Умови, що викликають розвиток у дослідних щурів ХС, створювали за допомогою моделі гострої імерсійної гіпотермії [6]. Тварин поміщали у закриті резервуари з сумішшю води та льоду (висота резервуара – 8 см, рівень води – 5 см). Початкова ТТ за даними вимірювання ректальної температури (РТ) у тварин була однаковою. Щура після досягнення РТ 20°C діставали з води, ретельно витирали і залишали при кімнатній температурі (20°C) для відігрівання. Надалі РТ вимірювали кожні 30 хв до рівня 37°C.

Тварин декапітували з дотриманням існуючих норм через одну або 18 годин після досягнення РТ 20°C. У декапітованих тварин вилучали наднирники, тимус, селезінку для зважування та обчислювали відносну масу за формулою:

$$BM = a \times 100\% / A,$$

де a – маса органа, A – маса тіла тварини.

Для оцінки стресогенного ульцерогенезу шлунків тварин, яких декапітували через 18 годин після досягнення РТ 20°C, промивали, оглядали і підраховували в ньому кількість виразок, визначали їх площу з урахуванням точкових і петехіальних крововиливів та гіперемії. За отриманими показниками визначали ступінь та індекс виразкового ураження слизової оболонки шлунка [8].

Печінку, нирки, селезінку (після зважування) та фрагмент кишечника поміщали в стакани з середовищем виділення ДНК (10 мМ Tris-HCl, 1 мМ EDTA, рН 8). Ступінь розвитку апоптозу в тканинах тварин, підданих впливу глибокої гіпотермії, оцінювали за відносним вмістом фрагментованої ДНК [4]. Даний метод засновано на визначенні за допомогою дифеніламінового реагенту концентрації ДНК у надосаді (фраг-

Before starting the experiment, all the animals were divided into the following groups ($n = 4$ in each): the group 1 comprised the animals, intraperitoneally injected with the studied hexapeptide Leu-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg (Dalargin, 'Peptidnye Tekhnologii', Russia) at a dose of 100 μg per kg body weight 30 min before starting the stress exposure; the group 2 made the animals received 250 μl of physiological saline 30 min before starting the cooling; the group 3 consisted of the animals, received the opioid receptor agonist dalargin together with the opioid receptor antagonist naloxone (Naloxone, LLC Kharkiv Pharmaceutical Enterprise 'Zdorov'ia Narodu', Ukraine) at a dose of 200 μg per kg animal weight; in group 4 were the rats with no drug administered and not subjected to cooling.

The conditions, inducing the CS development in experimental rats were created using the model of acute immersion hypothermia [12]. The animals were placed into closed tanks with a mixture of water and ice (8 cm tank height, 5 cm water level). The initial BT in animals was the same by the rectal temperature (RT) measurement data. The rat, after reaching the RT of 20°C, was removed from water, thoroughly wiped and left at room temperature (20°C) for warming. Then, the RT was measured every 30 min up to 37°C.

Animals were decapitated in compliance with the existing standards in 1 hr or 18 hrs after reaching the RT of 20°C. In decapitated animals, the adrenal glands, thymus, spleen were separated for weighing and the relative weight (RW) was calculated by the following formula:

$$RW = a \times 100\% / A,$$

where a is weight of organ, A is body weight of animal.

To assess a stressogenic ulcerogenesis, the stomachs of animals, decapitated in 18 hrs after reaching the RT of 20°C, were washed, examined and the number of ulcers was calculated, and their area was determined, taking into account the point and petechial hemorrhages and hyperemia. The degree and index of ulcerative lesions of gastric mucosa were determined by the obtained indices [15].

The liver, kidney, spleen (after weighing) and intestinal fragment were placed into the flask with DNA isolation medium (10 mm Tris-HCl, 1 mm EDTA, pH 8). The degree of apoptosis development in tissues of animals, exposed to deep hypothermia was assessed by relative content of fragmented DNA [8]. This method is based on determining the DNA concentration by means of diphenyla-

ментована ДНК) та осаді (нативна ДНК), отриманих після обробки лізуючим розчином (5 мМ Tris-HCl, 20 мМ ЕДТА, 0,5% Triton X-100, рН 8) та центрифугування гомогенатів тканин. Екстинції проб вимірювали на спектрофотометрі «СФ 48» («ЛОМО», СРСР) та обчислювали за формулою відносний вміст фрагментованої ДНК:

$$\% \text{ДНК}_{\text{фр.}} = \frac{E_{\text{надосаду}}}{E_{\text{надосаду}} + E_{\text{осаду}}} \times 100\%$$

де E – екстинція.

Для статистичної обробки даних використовували метод Стьюдента-Фішера та пакет програм «Microsoft Excel 2010» («Microsoft», США).

Результати та обговорення

Основними патологічними процесами на клітинному рівні за умов зниження ТТ відносно фізіологічної норми є апоптоз. Проведений нами раніше детальний аналіз результатів досліджень впливу охолодження на апоптоз клітин [2] свідчить, що ознаки апоптозу проявляються не під час перебування клітин у гіпотермічному середовищі, а після їх повернення в умови нормотермії та наступної експозиції протягом певного часу. На нашу думку, під поняттям ХС мають на увазі послідовний вплив на клітини охолодження, перебування у гіпотермічних умовах та відновлення початкової температури.

На моделі ХС у щурів було встановлено, що попереднє введення даларгіну (група 1) сприяло більш швидкому ($p \leq 0,05$), порівняно з тваринами, яким його не вводили (група 2) або разом з ін'єкціями цього лей-енкефаліну робили ін'єкції невібіркового блокатора опіатних рецепторів налоксону (група 3), досягненню РТ 20°C ((30,7 ± 5,1) хв проти (41,00 ± 3,60) і (42,0 ± 2,0) хв відповідно) та зворотному довільному відігріву до 37°C ((5,25 ± 1,25) годин проти (8,25 ± 1,00) і (7,50 ± 0,50) годин відповідно). Особливо помітною була різниця швидкості відігрівання після досягнення РТ 30°C. У щурів групи 1 підвищення РТ від 30 до 37°C відбувалось протягом (1,50 ± 0,50) годин, а у тварин груп 2 та 3 – (3,15 ± 0,50) і (2,90 ± 0,75) годин відповідно. Таким чином, попереднє введення даларгіну скорочувало тривалість гіпотермічного стану тварин на 2–3 години.

Для вивчення впливу даларгіну, охолодження і наступного відігрівання на показники «тріади Сельє» (характерні зміни, до яких зазвичай призводить будь-який стрес) у дослідних тварин визначали збільшення відносної маси наднирників та зменшення відносної маси імуноком-

mine reagent in supernatant (fragmented DNA) and precipitate (native DNA) obtained after treatment with lysing solution (5 mm Tris-HCl, 20 mm EDTA, 0.5% Triton X-100, pH 8) and centrifugation of tissue homogenates. The samples' extinctions were measured with spectrophotometer 'SF 48' (LOMO, USSR) and the relative content of fragmented DNA was calculated by the following formula:

$$\% \text{DNA}_{\text{fr}} = \frac{E_{\text{supernatant}}}{E_{\text{supernatant}} + E_{\text{precipitate}}} \times 100\%$$

where E is extinction.

The data were statistically processed with the Student's t-test and Microsoft Excel 2010 software (Microsoft, USA).

Results and discussion

The main pathological processes at a cellular level during BT decrease relative to the physiological norm are necrosis and apoptosis. Our previous detailed analysis of findings of cooling impact on cell apoptosis [4] shows its signs as manifested not during cell staying in hypothermic medium, but after their return under normothermia and further exposure within a certain time period. We believe the term of CS should be considered as a consistent impact of cooling on biological object, staying under hypothermic conditions and restoring the initial temperature.

In the CS model in rats, a previous administration of leu-enkephalin (group 1) was established to promote more rapid ($p \leq 0.05$), if compared with the animals with no drug injected (group 2) or when administering together with the studied leu-enkephalin an nonselective opioid naloxone receptor blocker (group 3), reaching the RT of 20°C ((30.7 ± 5.1) vs. (41.00 ± 3.60) and (42.0 ± 2.0) min respectively) and a reverse spontaneous warming up to 37°C ((5.25 ± 1.25) vs. (8.25 ± 1.00) and (7.50 ± 0.50) hrs, respectively). The difference in warming rate after reaching the RT of 30°C was particularly noticeable. In the rats of group 1, RT increased from 30 up to 37°C within (1.50 ± 0.50) hrs, but in the animals of groups 2 and 3 it made (3.15 ± 0.50) and (2.90 ± 0.75) hrs, respectively. Thus, a preliminary administration of dalargin reduced the hypothermic state duration in animals by 2–3 hrs.

To study the impact of dalargin, cooling and subsequent warming on the indices of the 'triad of stress' described by Selye (characteristic changes, resulting from any stress) in experimental animals we determined an increase in relative weight of



Вплив даларгіну на відносну масу органів експериментальних щурів ($M \pm \sigma$)
Influence of dalargin on the relative weight organs of experimental rats ($M \pm \sigma$)

Групи Groups	Відносна маса, % Relative weight, %					
	тимуса thymus		селезінки spleen		наднирників suprarenal gland	
	А	В	А	В	А	В
1	0,142 ± 0,002 [#]	0,139 ± 0,001 ^{**}	0,58 ± 0,03 [#]	0,64 ± 0,01 [#]	0,011 ± 0,001 [#]	0,011 ± 0,001
2	0,126 ± 0,002 [*]	0,130 ± 0,005 [*]	0,47 ± 0,01 [*]	0,69 ± 0,03 [*]	0,014 ± 0,001 [*]	0,011 ± 0,0001
3	1,26 ± 0,05 [*]	1,32 ± 0,003 [*]	0,49 ± 0,04 [*]	0,68 ± 0,02 [*]	0,013 ± 0,0001 [*]	0,011 ± 0,0001
4	0,145 ± 0,001 [#]	0,145 ± 0,001 [#]	0,60 ± 0,05 [#]	0,60 ± 0,05 [#]	0,011 ± 0,0001 [#]	0,011 ± 0,0001

Примітки: А – через годину перебування в стані гіпотермії; В – через 12 годин після досягнення фізіологічної температури. Відмінності статистично значущі в порівнянні з групами 2 та 3 ([#]) і групою 4 (^{*}), $p \leq 0,05$.

Notes: A – 1 hr after staying under hypothermia; B – 12 hrs after reaching physiological temperature; differences are statistically significant as compared with the groups 2 and 3 ([#]) and with the group 4 (^{*}), $p \leq 0,05$.

петентних органів (вилочкової залози та селезінки), а також реєстрували випадки виникнення в слизовій оболонці шлунка деструктивних явищ та їх вираженість [17]. Встановлено, що під час охолодження та перебування тварини у стані глибокої гіпотермії зменшувалася відносна маса тимуса та селезінки, збільшувалася відносна маса наднирників (таблиця). У випадках, коли перед охолодженням вводили лей-енкефалін, відносна маса органів після перебування у стані гіпотермії протягом години значуще не відрізнялася від відповідного показника тварин, яких не піддавали охолодженню (група 4). Одержані результати узгоджується з даними робіт, в яких було показано, що попереднє введення даларгіну сприяє істотному послабленню стрес-індукованої гіперактивації глюкокортикоїдної функції наднирників щурів за умов холодного стресу з значущим зниженням рівня кортизолу в крові [5, 7].

Через 18 годин після досягнення РТ 20°C (таблиця) відносна маса тимуса щурів, які охолоджувалися без попереднього введення лей-енкефаліну (група 2) або яким одночасно з даларгіном вводили налоксон (група 3), дещо збільшувалась, але залишалася статистично значуще нижчою, ніж у тварин, без охолодження (група 4). Відносна маса селезінки тварин цих груп, навпаки, статистично значуще збільшувалася порівняно з щурами без охолодження (група 4) або з попереднім введенням лише лей-енкефаліну (група 1). У цей строк спостереження маса наднирників щурів усіх груп була близькою до показника тварин, яких не піддавали охолодженню. У щу-

adrenal glands and a decrease in relative weight of immune organs (thymus and spleen), as well as the cases of destructive phenomena occurrence in gastric mucosa and their severity were also recorded [17]. It was found that during animals' cooling and staying under deep hypothermia, the relative weight of thymus and spleen decreased, and the relative weight of adrenal glands increased (Table). In the cases, where the leu-enkephalin was administered to rats prior to cooling, the relative weight of organs after animal staying under hypothermia for one hour did not significantly differ from the corresponding index of animals, not subjected to cooling (group 4). Our findings are consistent with the previous data, where a preliminary administration of dalargin was demonstrated to significantly weaken the stress-induced hyperactivation of glucocorticoid function of rat adrenal glands under cold stress with a significant decrease in cortisol level in blood [9, 13].

In 8 hours after reaching the RT of 20°C (Table), the relative weight of thymus of rats, cooled with no preliminary administration of leu-enkephalin (group 2) or injected with naloxone in combination with dalargin (group 3) was slightly increased but remained significantly lower, than in the animals without cooling (group 4). The relative weight of spleen of the animals from these groups, on the contrary, increased significantly as compared to the rats without cooling (group 4) or with preliminary administration of leu-enkephalin only (group 1). At this time of observation, the adrenal gland weight in rats of all the groups was close to that for the animals not subjected to cooling.



рів, яким перед початком охолодження вводили лей-енкефалін (група 1), спостерігалася тенденція до зменшення відносної маси тимуса та збільшення відносної маси селезінки. Перший показник не був статистично значущим порівняно з визначеним через годину перебування тварин у стані гіпотермії, але статистично значущим було його зменшення порівняно з показником щурів, яких не піддавали охолодженню. Відносна маса селезінки, навпаки, статистично значуще збільшувалася порівняно з показником, визначеним через годину перебування тварини у стані гіпотермії, але значуще не відрізнялася від такої у тварин без охолодження (група 4).

Результати дослідження слизової оболонки шлунка стресованих тварин також підтвердили протекторну дію лей-енкефаліну. Тільки в групі щурів, яким вводили даларгін без одночасного введення налоксону (група 1), слизова оболонка шлунка була без ознак виразок. Лише в одній тварини з цієї групи (10 %) у слизовій шлунка виявлялася гіперемія. Однак у групах 2 та 3 відносна кількість тварин із виразками становила 80 та 60% відповідно, ступінь виразкового ураження – $2,2 \pm 1,2$ та $1,1 \pm 1,1$ відповідно, а виразковий індекс – $1,76 \pm 0,98$ та $0,66 \pm 0,70$ відповідно.

Вживання холодостійких організмів в умовах гіпотермії визначається, зокрема, здатністю їх клітин протистояти апоптозу, індукованому дією холоду. С.С. Fleck та співавт. [10] отримали дані, які свідчать про те, що у гібернуючих ховрахів підвищується експресія антиапоптотичних білків. Ці білки сприяють виживанню клітин у внутрішньому середовищі, яке за тривалий час перебування тварин у гіпометаболічному стані зимової сплячки набуває оксидативних властивостей, що може індукувати апоптоз.

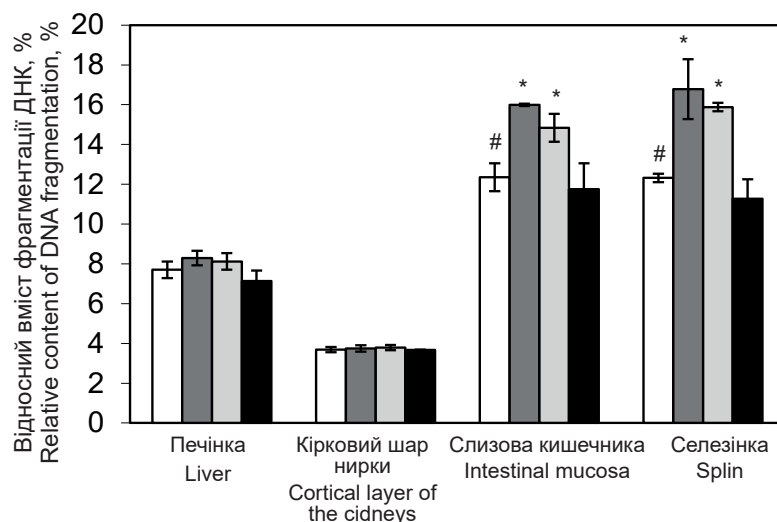
Дослідження впливу агоніста опіатних рецепторів даларгін на ступінь фрагментації ДНК як прояву процесів апоптозу та некрозу клітин у результаті холодостресу показало, що в клітинах печінки та нирок після охолодження тварин до 20°C та наступного відігрівання цей показник не відрізнявся від такого у тварин, яких не піддавали охолодженню (група 4) (рисунк).

У клітинах селезінки та слизової оболонки кишечника щурів після охолодження до 20°C та наступного довільного відігрівання до нор-

Leu-enkephalin-treated rats (group 1) prior to cooling demonstrated a tendency to reduced relative weight of thymus and increased relative weight of spleen. The first index was not statistically significant if compared with the one hour later the stay of animals in a hypothermia state, but its decrease versus that of not cooled rats was statistically significant. The relative mass of spleen, on the contrary, was significantly increased if compared with the index determined after an hour of animals' staying in a hypothermia state, but not significantly different from that of the animals with no cooling (group 4).

The findings on gastric mucosa of stress-subjected animals also confirmed the protective effect of leu-enkephalin. Only in the group of rats administered with dalargin without simultaneous administration of naloxone (group 1) the gastric mucosa had no signs of ulcers. Only one animal in this group (10%) showed hyperemia in gastric mucosa. However, in groups 2 and 3, the relative number of animals with ulcers was 80 and 60%, respectively, the degree of ulcerative lesions was 2.2 ± 1.2 and 1.1 ± 1.1 , respectively, and the ulcer index made 1.76 ± 0.98 and 0.66 ± 0.70 , respectively.

The survival of cold-resistant organisms in hypothermia is determined, in particular, by the ability of their cells to resist a cold-induced apoptosis. C.C. Fleck *et al.* [2] obtained the data indicating that the expression of antiapoptotic proteins was increased in hibernating ground squirrels. These pro-



Рівень фрагментації ДНК, клітинах печінки, кіркового шару нирок, слизової оболонки кишечника та селезінки щурів, які зазнали впливу холодостресу: відмінності статистично значущі в порівнянні з групами 2, 3 (#) та групою 4 (*), $p \leq 0,05$.

Occurrence of DNA fragmentation in cells of liver, cortical layer of kidneys, intestinal mucosa and spleen of rats exposed to cold stress: differences are statistically significant as compared with the groups 2 and 3 (#) and with the group 4 (*), $p \leq 0.05$.

мальної температури спостерігалось статистично значуще збільшення ступеня фрагментації ДНК. Після попереднього введення щурам даларгіну (група 1) ступінь фрагментації ДНК селезінки та слизової оболонки кишечника знизився до рівня тварин, яких не піддавали охолодженню (група 4). Введення тваринам невібіркового антагоніста опіатних рецепторів налоксону (група 3) блокувало захисну дію лей-енкефаліну: ступінь фрагментації ДНК у щурів цієї групи не відрізнявся від такого у тварин, яких піддавали впливу гіпотермії без попереднього введення даларгіну (група 2). Цей факт свідчить про те, що даларгін, окрім безпосереднього анти-апоптотичного впливу, сприяє антистресорній дії ендогенних опіатів шляхом активації опіатних рецепторів клітин.

Таким чином, охолодження тварин до температури 20°C та наступне відігрівання до фізіологічної температури не викликають апоптозу та некрозу клітин у нирках та печінці за показниками фрагментації ДНК. У тканинах, клітини яких інтенсивно оновлюються (слизова кишечника), ступінь фрагментації ДНК у результаті впливу гіпотермії та наступного відігрівання значуще зростає, а попереднє введення даларгіну його зменшує до рівня тварин, яких не піддавали охолодженню (група 4). Також значне збільшення відносного вмісту фрагментованої ДНК виявлено в селезінці, що, можливо, свідчить не стільки про активацію апоптозу спленоцитів, як про інтенсифікацію процесу утилізації шляхом апоптозу лейкоцитів.

Виявлені зміни в організмі щурів можуть бути не тільки наслідком впливу холодного стресу, а й результатом емоційно-больового стресу тварини, який є супутнім моделюванню гіпотермії та наступному відігріванню. Отже, отримані результати свідчать про те, що даларгін запобігає розвитку апоптотичних процесів у клітинах організму гоміотермних тварин після холодного стресу *in vivo*, а також загальностресовим проявам. Отже, можна вважати доцільним застосування препаратів-агоністів опіатних рецепторів в поєднанні з гіпотермією.

Висновки

1. Дослідження ступеня фрагментації ДНК у тканинах експериментальних тварин, підданих охолодженню, через 18 годин після досягнення ректальної температури 20°C не виявило інтенсифікації апоптозу і некрозу клітин в тканинах, де ці явища за нормальних фізіологічних умов не дуже виражені (нирки, печінка). У тканинах, клітини яких інтенсивно оновлюються (слизова

теїни contribute to the survival of cells in inner environment, which over a long period of stay of the animals in a hypometabolic state of hibernation acquires the oxidative properties that can induce apoptosis.

Investigation of the effect of opioid receptor agonist dalargin on DNA fragmentation level as a manifestation of cell apoptosis and necrosis processes as a result of cold stress showed that in liver and kidney cells after cooling of animals down to 20°C and subsequent warming, this index did not differ from that in animals not subjected to cooling (group 4) (Figure).

A statistically significant increase in the DNA fragmentation level was observed in the cells of the spleen and mucous membrane of rat's intestine after cooling down to 20°C and subsequent gradual warming to normal temperature. After preliminary administration of dalargin to rats (group 1), the level of DNA fragmentation of spleen and intestinal mucosa decreased to the one of animals that were not cooled (group 4). An introduction of indiscriminate opioid receptor antagonist naloxone (group 3) in animals blocked the protective effect of leu-enkephalin: the DNA fragmentation level of this group did not differ from that in the animals exposed to hypothermia without prior administration of dalargin (group 2). This fact indicates that, in addition to direct anti-apoptotic effects, dalargin contributes to an anti-stress effect of endogenous opiates by activating opiate cell receptors.

Thus, cooling animals down to 20°C and subsequent warming to physiological temperature does not cause the cell apoptosis and necrosis in kidneys and liver in terms of DNA fragmentation. In tissues the cells of which are intensively renewed (intestinal mucosa), the level of DNA fragmentation resulted from hypothermia and subsequent warming increases significantly, and preliminary administration of dalargin reduces it to the level of the animals that have not been cooled (group 4). As well a significant increase in the relative content of fragmented DNA was found in spleen, that may indicate rather the intensification of leukocyte utilization by apoptosis than the activation of apoptosis of splenocytes.

The revealed changes in rat's body can be not only a consequence of the effects of cold stress, but also the result of emotional and painful stress to an animal, which is concomitant with the modeling of hypothermia and subsequent warming. Thus, the findings indicate that dalargin prevents the development of apoptotic processes in cells of homoiotherms after a cold stress *in vivo*, as well as general stress manifestations. Therefore, it may be



оболонка кишечника), або в імунокомпетентних тканинах (селезінка) встановлено значуще підвищення даного показника у результаті холодового стресу.

2. Попереднє введення шурам гексапептиду Лей-Тир-Д-Ала-Глі-Фен-Лей-Арг (даларгін), який належить до групи лей-енкефалінів, зменшує ступінь фрагментації ДНК до значень тварин без холодового стресу.

3. Встановлено, що введення даларгіну запобігає розвитку у експериментальних тварин гіпертрофії наднирників, зменшує ступінь інволюції тимуса та селезінки, знижує вираженість індукованого холодовим стресом ульцерогенезу.

Література

1. Адо АД, Ишимова ЛМ. Патологическая физиология. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина; 1980. 520 с.
2. Гулевский АК, Ахатова ЮС, Щенявский ИИ. Особенности апоптоза, индуцированного снижением температуры. Проблемы кробиологии і кріомедицини. 2017; 27(2): 97–109.
3. Игнат'ев ДА, Колаева СГ, Крамарова ЛИ, Кравченко ИИ. Гипотермическое влияние на мышей фракции 1-10 кД тонкой кишки гибернирующего суслика (*Citellus undulatus*) в условиях гипоксии и гиперкапнии. Журн. эволюц. биохимии. 1989; 25(3): 318–23.
4. Комаревцев ВН, Комаревцева ИА, Фильчуков ДА, и др. Апоптоз и патоморфоз опухолей почек. Лікарська справа. 2001; (4): 115–8.
5. Лишманов ЮБ, Маслов ЛН, Нарыжная НВ, и др. Эндогенная опиоидная система как звено срочной и долговременной адаптации организма к экстремальным воздействиям. Перспективы клинического применения опиоидных пептидов. Вестник РАМН. 2012; (6): 73–85.
6. Лычева НА, Киселев ВИ, Шахматов ИИ, Вдовин ВМ. Вклад стрессоров различной природы в формирование ответной гемостатической реакции организма при действии общей гипотермии. Фундаментальные исследования. 2014; (7, Ч 1): 106–10.
7. Маяки МТД, Кличханов НК. Влияние даларгина на содержание гормонов гипофизарно-надпочечникового и гипофизарно-тиреоидного эндокринного комплексов в крови крыс при гипотермии. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2012; 14(5): 273–7.
8. Стефанова ОВ, редактор. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації). К.: ВД «Авіцена», 2002. 527 с.
9. Borlongan CV, Wang Y, Su T-P. Delta opioid peptide (D-Ala 2, D-Leu 5) Enkephalin: Linking hibernation and neuroprotection. Front. Biosci. J. Virtual Libr. [Internet]. 2004; (9): 3392–8. [cited Jan 15 2019]; Available from: <http://www.bioscience.org/2004/v9/af/1490/list.htm>.
10. Fleck CC. Modulation of apoptotic pathways in intestinal mucosa during hibernation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005; 289(2): R586–R595.
11. Fu D, Liu H, Li S, Chen L, Yao J. Antioxidative and antiapoptotic effects of delta-opioid peptide [D-Ala2, D-Leu5] enkephalin on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits. Front Neurosci. [Internet]. 2017 [cited Jul 23 2018]; 11:603. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2017.00603/full>

considered appropriate to use opioid receptor agonist drugs in combination with hypothermia.

Conclusions

1. The study of the level of DNA fragmentation in the tissues of experimental animals, subjected to cooling, 18 hours after reaching a rectal temperature of 20°C revealed no intensification of apoptosis and necrosis of cells in tissues, where these phenomena were not very pronounced under normal physiological conditions (kidneys, liver). In tissues the cells of which are intensively renewed (intestinal mucosa), or in immune competent tissues (spleen), a significant increase in this index due to cold stress has been found.

2. Pre-administration of hexapeptide Leu-Tyr-D-Ala-Gl-Feng-Lei-Arg (dalargin), belonging to the leu-enkephalin group, to rats reduces the level of DNA fragmentation to the values the animals not subjected to a cold stress.

3. It has been established that the introduction of dalargin prevented the development of adrenal hypertrophy in experimental animals, reduced the degree of thymus and spleen involution, and decreased the severity of cold stress induced by ulcerogenesis.

References

1. Ado AD, Ishimova LM, editors. [Pathological physiology], 2nd ed. Moscow: Medicine, 1980. 520 p. Russian.
2. Borlongan CV, Wang Y, Su TP. Delta opioid peptide (D-Ala 2, D-Leu 5) enkephalin: linking hibernation and neuroprotection. Front Biosci J. [Internet]. 2004 [cited Jan 15 2019]; (9): 3392–8. Available from: <http://www.bioscience.org/2004/v9/af/1490/list.htm>
3. Fleck CC. Modulation of apoptotic pathways in intestinal mucosa during hibernation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005; 289(2): R586–R595.
4. Fu D, Liu H, Li S, Chen L, Yao J. Antioxidative and antiapoptotic effects of delta-opioid peptide [D-Ala2, D-Leu5] enkephalin on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits. Front Neurosci. [Internet]. 2017 [cited Jul 23 2018]; 11:603. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2017.00603/full>
5. Gulevsky AK, Akhatova YuS, Shchenyavsky II Features of apoptosis, induced by temperature reduction. Probl Cryobiol Cryomed. 2017; 27(2): 97–109.
6. Hendriks KDW, Lupi E, Hardenberg MC, Hoogstra-Berends F. Differences in mitochondrial function and morphology during cooling and rewarming between hibernator and non-hibernator derived kidney epithelial cells. Sci Rep. [Internet]. 2017 [cited July 23 2018]; 7(1): 15482. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-15606-z>.
7. Himms-Hagen J. Neural and hormonal responses to prolonged cold exposure. In: Fregly M, Blatteis C, editors. Adaptation to the environment. Handbook of Physiology. New York: Oxford University Press; 1996. p. 439–80.
8. Ignat'ev DA, Kolaeva SG, Kramarova LI, Kravchenko II. [Hypothermic effect on mice of a 1-10 kD fraction of the small



12. Hendriks KDW, Lupi E, Hardenberg MC, Hoogstra-Berends F. Differences in mitochondrial function and morphology during cooling and rewarming between hibernator and non-hibernator derived kidney epithelial cells. *Sci Rep*. [Internet]. 2017 [cited July 23 2018]; 7(1): 15482. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-15606-z>.
13. Himms-Hagen J. Neural and hormonal responses to prolonged cold exposure. In: Fregly M, Blatteis C, editors. *Adaptation to the environment. Handbook of Physiology*. New York: The American Physiological Society and Oxford University Press; 1996. p. 439–80.
14. Liu H, Chen B, Li S, Yao JJ. Dose-dependent neuroprotection of delta-opioid peptide [D-Ala(2), D-Leu(5)] enkephalin on spinal cord ischemia-reperfusion injury by regional perfusion into the abdominal aorta in rabbits. *Vasc Surg*. 2016; 63(4):1074-81.
15. Liu H, Chen B, Zhang Y, et al. Protective effect of delta opioid agonist [D-Ala2, D-Leu5] enkephalin on spinal cord ischemia reperfusion injury by regional perfusion into abdominal aorta in rabbits. *J Neurosci Lett*. 2015; 584:1–6.
16. Quinones QJ, Ma Q, Zhang Z, et al. Organ protective mechanisms common to extremes of physiology: a window through hibernation biology. *Integr Comp Biol*. 2014;54(3):497–515.
17. Selye H. *Stress without distress*, New York: Signet, 1974. 116 p.
18. Stocks JM, Taylor NA, Tipton MJ, Greenleaf JE. Human physiological responses to cold exposure. *Aviat Space Environ Med*. 2004; 75(5): 444–57.
19. Tamura Y, Monden M, Shintani M, et al. Neuroprotective effects of hibernation-regulating substances against low-temperature-induced cell death in cultured hamster hippocampal neurons. *Brain Res*. 2006; 1108(1):107–16.
20. Yao LL, Wang YG, Cai WJ, et al. Survivin mediates the anti-apoptotic effect of delta-opioid receptor stimulation in cardiomyocytes. *J Cell Sci*. 2007; 120(5): 895-907.
- intestine of the hibernating suslik *Citellus undulatus* during hypoxia and hypercapnia]. *Zh Evol Biokhim Fiziol*. 1989; 25(3): 318–23. Russian.
9. Komarevtseva IA, Popov EN, Komarevtseva KV, Zaika AV. [The promotor of apoptosis gen p53 and antyapoptotic gen Bcl-2 in cell proliferation]. *Likarska sprava*. 2001; (4): 115–8. Russian.
10. Lishmanov luB, Maslov LN, Naryzhnaia NV et al. [Endogenous opioid system as a mediator of acute and long-term adaptation to stress. Prospects for clinical use of opioid peptides]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 2012; (6): 73–82. Russian.
11. Liu H, Chen B, Li S, Yao JJ. Dose-dependent neuroprotection of delta-opioid peptide [D-Ala(2), D-Leu(5)] enkephalin on spinal cord ischemia-reperfusion injury by regional perfusion into the abdominal aorta in rabbits. *Vasc Surg*. 2016; 63(4):1074–81.
12. Liu H, Chen B, Zhang Y, et al. Protective effect of delta opioid agonist [D-Ala2, D-Leu5] enkephalin on spinal cord ischemia reperfusion injury by regional perfusion into abdominal aorta in rabbits. *J Neurosci Lett*. 2015; 584:1–6.
13. Lycheva NA, Kiselev VI, Shakhmatov II, Vdovin VM. [Contribution stressors of different nature in the formation of a hemostatic response reaction of the organism under the influence of general hypothermia]. *Fundamental research*. 2014; (7, Pt 1): 106–10. Russian.
14. Mayahi MTJ, Klichkhanov NK [Effect of dalargin on pituitary-adrenal and pituitary-thyroid endocrine complex hormones content in the blood of rats during hypothermia]. *Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2012; 14(5): 273–7. Russian.
15. Quinones QJ, Ma Q, Zhang Z, et al. Organ protective mechanisms common to extremes of physiology: a window through hibernation biology. *Integr Comp Biol*. 2014;54(3):497–515.
16. Selye H. *Stress without distress*, New York: Signet, 1974. 116 p.
17. Stefanova OV, editors. [Preclinical research of medicinal products (methodical recommendations)]. Kyiv: Avitsenna, 2002. 527 p. Ukrainian.
18. Stocks JM, Taylor NA, Tipton MJ, Greenleaf JE. Human physiological responses to cold exposure. *Aviat Space Environ Med*. 2004; 75(5): 444–57.
19. Tamura Y, Monden M, Shintani M, et al. Neuroprotective effects of hibernation-regulating substances against low-temperature-induced cell death in cultured hamster hippocampal neurons. *Brain Res*. 2006; 1108(1): 107–16.
20. Yao LL, Wang YG, Cai WJ, et al. Survivin mediates the anti-apoptotic effect of delta-opioid receptor stimulation in cardiomyocytes. *J Cell Sci*. 2007; 120(5): 895–907.