

УДК 577.112.382.4:616-092.18:616-001.19

Н.М. Моїсеєва, О.К. Гулевський, О.Л. Горіна*

Вплив лей-енкефаліну (даларгіну) на розвиток апоптозу і некрозу лейкоцитів після холодного стресу

UDC 577.112.382.4:616-092.18:616-001.19

N.M. Moisieieva, O.K. Gulevskyy, O.L. Gorina*

Effect of Leu-Enkephalin (Dalargin) on Apoptosis and Necrosis of Leukocytes After Cold Stress

Реферат: У роботі досліджено вплив синтетичного лей-енкефаліну (даларгін) на розвиток апоптозу і некрозу лейкоцитів після холодного стресу за морфологічними ознаками клітин і за допомогою флуоресцентних барвників Hoechst 33342 та йодиду пропідію. З'ясовано ступінь впливу холодного стресу залежно від тривалості інкубації суспензії клітин при 0–2 та 37°C на ініціацію апоптозу і некрозу за морфологічними ознаками клітин. Доведено, що відношення апоптотичних клітин до некротичних було максимальним після використання режиму: попередня інкубація лейкоцитів при 37°C — 15 хв, експозиція клітин при 0–2°C — 15 хв і подальша інкубація лейкоцитів при 37°C. Доведено, що попередня інкубація клітин з нейропептидом до холодного стресу впливає на ефективність протекторної дії даларгіну, зокрема, сприяє значущому ($p \leq 0,05$) зменшенню відсотка лейкоцитів з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу. Встановлено, що послідовне підвищення температури після холодного стресу до 37°C не впливає на відсоток клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу. Доведено, що відсоток лейкоцитів з ознаками апоптозу і некрозу після холодного стресу значуще зменшується після інкубації лейкоцитів з даларгіном у концентрації 10^{-9} моль/л.

Ключові слова: холодний стрес, апоптоз, некроз, лейкоцити, лей-енкефалін, даларгін.

Abstract: The effect of synthetic leu-enkephalin (dalargin) on apoptosis and necrosis in leukocytes after cold stress on the morphological characteristics of cells and using fluorescent dyes Hoechst 33342 as well as propidium iodide was studied. The degree of cold stress influence depending on the duration of incubation of cell suspension at 0–2 and 37°C on the initiation of apoptosis and necrosis on the morphological characteristics of cells was determined. It has been proven that the ratio of apoptotic cells to necrotic ones was maximal after the use of the regimen as follows: preliminary incubation of leukocytes at 37°C – 15 min, cell exposure at 0–2°C – 15 min and subsequent incubation of leukocytes at 37°C. It has been confirmed that pre-incubation of cells with neuropeptide to cold stress affects the effectiveness of the protective action of dalargin, in particular, contributes to a significant ($p \leq 0.05$) reduction in the percentage of leukocytes with morphological signs of apoptosis and necrosis. It was found that a consistent increase in temperature after cold stress to 37°C did not affect the percentage of cells with morphological signs of apoptosis and necrosis. It has been validated that the percentage of leukocytes with the apoptosis and necrosis signs after cold stress was significantly reduced after incubation of leukocytes with dalargin at a concentration of 10^{-9} mol/l.

Key words: cold stress, apoptosis, necrosis, leukocytes, leu-enkephalin, dalargin.

Відомо, що причинами пошкодження лейкоцитів цільної крові або лейкоконцентрату в умовах гіпотермічного зберігання є зниження температури середовища до 4°C і повернення до нормотермії під час реконсервування та інфузії в русло реципієнта. В цих умовах внаслідок гіпоксії та розвитку оксидативного стресу порушується біоенергетика клітин, збільшується кількість гідроксильних радикалів та інших активних форм кисню, що в подальшому призводить до ушкодження ДНК та ініціації апоптозу [8, 14]. У зв'язку з цим ведеться пошук факторів, які після охолодження і повернення до умов нормотермії, впливають на репарацію клітин і запобігають розвитку апоптозу. На особливу увагу в цьому аспекті заслуговують опіоїдні пептиди, отримані з головного мозку.

In hypothermic storage lowering the temperature down to 4°C and returning to normothermia during re-conservation and infusion into the recipient's blood flow are known to be the causes of damage to whole blood leukocytes or leukoconcentrate. Under these conditions, due to hypoxia and development of oxidative stress, the cell bioenergy is disrupted, amount of hydroxyl radicals and other reactive oxygen species increases, that further leads to DNA damage and initiation of apoptosis [2, 13]. In this regard, we are looking for factors which after cooling and returning to the normothermia conditions, affect the cell repair and prevent apoptosis. Opioid peptides derived from the brains of hibernating animals deserve a special attention in this aspect. Such peptides play an important role in

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

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: ogorina2603@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: ogorina2603@gmail.com

Надійшла 12.07.2019

Прийнята до друку 14.12.2021

Received 12, July, 2019

Accepted 14, December, 2021

© 2022 N.M. Moisieieva, 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.

ку гібернуючих тварин. Такі пептиди відіграють важливу роль у стримуванні саме стрес-індукованих вільнорадикальних процесів та енергетичних порушень у період зниження температури [14]. У наших попередніх дослідженнях було показано, що нейропептиди (фракція 1–10 кДа) з головного мозку гібернуючих тварин здатні взаємодіяти з рецепторами клітин гомойотермних тварин, що проявляється в пригніченні синтезу білка та нуклеїнових кислот, регулювати транспорт іонів кальцію через зовнішню мембрану клітин, а також впливати на активність терморекцепторів шкіри [3, 11].

Введення синтетичних аналогів ендogenous опіоїдного пептиду лей-енкефаліну сприяє стримуванню стрес-індукованих вільнорадикальних порушень у період адаптації тварин до температурних коливань [5, 6, 10, 16]. До таких пептидів належить даларгін, у структурі якого наявні залишки Д-аланілу та аргініну в с-положенні. Крім посилення антиоксидантного та антирадикального захисту, він підвищує резистентність тварин до глибокої гіпотермії, стабілізуючи рівень активних форм кисню, транспорт іонів Na^+ , K^+ і Ca^{2+} через плазматичну та мітохондріальну мембрани. При цьому вплив даларгіну на апоптоз клітин після холодного стресу вивчено не було [5, 17].

Мета роботи — дослідження впливу синтетичного аналога ендogenous пептиду лей-енкефаліну даларгіну на ознаки розвитку апоптозу і некрозу лейкоцитів донорської крові людини в умовах холодного стресу за морфологічними показниками.

Матеріали і методи

Лейкоконцентрат отримували з донорської крові людини методом диференціального центрифугування [1]. Кров людини заготовляли на консерванті CPDA-1 (Terumo, Індія). Отримували кров в Харківському обласному центрі служби крові та транспортували за рекомендованими умовами до відповідного температурного режиму.

У першій серії експериментів досліджували розвиток апоптозу та некрозу лейкоцитів, підданих холодному стресу за наведеними у таблиці температурними режимами та часом експозиції клітин (таблиця).

На даному етапі роботи визначали вплив поступового підвищення температури на зміни морфологічних ознак клітин внаслідок розвитку апоптозу і некрозу після холодного впливу за схемою: 15 хв при температурі $0-2^{\circ}\text{C}$, 5 хв при 10°C , 5 хв при 20°C , 5 хв при 37°C .

У другій серії експериментів вивчали антиапоптотичну дію синтетичного даларгіну (у ви-

the constraining of the stress-induced free radical processes and energy disorders during the period of temperature decreasing [13]. Our previous studies have shown that neuropeptides (1–10 kDa fraction) from the brains of hibernating animals are able to interact with the receptors on homeotherms cells, that inhibits the protein and nucleic acid synthesis, regulates calcium ion transport across the cell membrane, and affects the activity of skin thermoreceptors [6, 7].

The introduction of synthetic analogues of the endogenous opioid peptide leu-enkephalin helps to control the stress-induced free radical disorders during the period of adaptation of animals to temperature fluctuations [5, 9, 10, 15]. Such peptides include dalargin, in the structure of which there are residues of D-alanyl and arginine in the c-position. In addition to enhancing antioxidant and anti-radical protection, it increases the resistance of animals to deep hypothermia, stabilizing the level of reactive oxygen species, transport of Na^+ , K^+ and Ca^{2+} ions across the plasma and mitochondrial membranes. The effect of dalargin on cell apoptosis after cold stress has not been explored [9, 17].

This research was aimed to study the effect on morphological indices of the synthetic analogue of the endogenous peptide leu-enkephalin dalargin on the apoptosis and necrosis features in leukocytes of human donor blood under cold stress.

Materials and methods

Leukoconcentrate was derived from human donor blood by differential centrifugation [1]. Human blood was harvested with the preservative CPDA-1 (Terumo, India) and obtained at the Kharkiv Regional Blood Service Center, then it was transported with keeping the recommended conditions up to the appropriate temperature.

In the first series of experiments the apoptosis and necrosis of leukocytes subjected to cold stress at the following temperature regimens and cell exposure time was investigated (Table).

In addition, at this stage we studied the effect of gradual increase in temperature on changes in morphological features of cells due to apoptosis and necrosis after cold exposure according to the scheme: 15 min at $0-2^{\circ}\text{C}$, 5 min at 10°C , 5 min at 20°C , 5 min at 37°C .

In the second series of experiments there was investigated the antiapoptotic effect of synthetic dalargin (as a commercial drug 'Dalargin-Biolik', JSC 'Pharmstandard-Biolik', Ukraine) on leukocytes subjected to cold stress in the following mode: 15 min at $0-2^{\circ}\text{C}$ and 15 min at 37°C . At the first stage of this study, the drug was added to the cells before

гляді комерційного препарату «Даларгін-Біолік» («Фармстандарт-Біолік», Україна) на лейкоцити, піддані холодному стресу за наступним режимом: 15 хв при температурі 0–2°C та 15 хв при температурі 37°C. На першому етапі досліджень препарат додавали до клітин перед моделюванням холодного стресу в концентраціях 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ та 10⁻⁹ моль/л, на другому етапі – лейкоцити інкубували з даларгіном в концентрації 10⁻⁹ моль/л протягом 15 хв (37°C) перед початком холодного впливу.

У кожній серії експериментів використовували зразки, в які замість препарату вносили фізіологічний розчин в еквівалентному об'ємі та інкубували в аналогічних умовах. Контрольну групу зразків складали проби свіжовиділених клітин.

Досліджували морфологічну будову лейкоцитів після холодного стресу за допомогою світлової та флуоресцентної мікроскопії. Наявність пікнозу клітин, фрагментації ядра та блебінгу як морфологічних ознак апоптозу, а також збільшення об'єму клітин, розпаду мембрани з вивільненням цитоплазматичного вмісту, каріолізу (некротичні ознаки) визначали з використанням світлового мікроскопу IN300T-FL (AmScope, США) під імерсією (×1000) після забарвлення мазків лейкоконцентрату за Романовським-Гімзою [18]. Визначали відсоток клітин з патологічними ознаками до загальної кількості всіх підрахованих клітин у зразку та відсоток лейкоцитів з нормальною морфологічною структурою.

Під час флуоресцентно-мікроскопічного аналізу оцінювали фрагментацію ядер клітин з використанням флуоресцентних барвників Hoechst 33342 (Sigma, США) та йодиду пропідію (PI, Sigma). Фотореєстрацію клітинних препаратів здійснювали за допомогою конфокального лазерного сканувального мікроскопа LSM 510 META Carl Zeiss (Carl Zeiss, Німеччина). Для аналізу отриманих зображень використовували програми LSM 510 та LSM Image Examiner (Carl Zeiss). Кількість клітин з патологічними ознаками ядер виражали у відсотках до загальної кількості підрахованих клітин у зразку. Аліквоти PI (7,5 мкМ) та Hoechst 33342 (9 мкМ), розведені фосфатно-сольовим буферним розчином (PBS; pH 7,4), додавали до 1 мл PBS та змішували у співвідношенні 1:1 з лейкоконцентратом, в якому вони знаходилися. Зразки витримували 30 хв у темряві при кімнатній температурі та видаляли барвники шляхом розведення до 5 мл PBS та центрифугування. Інтенсивність флуоресценції PI реєстрували при збудженні 490 нм та випромінюванні 636 нм,

Режими реалізації холодного стресу суспензії лейкоцитів
Cold stress modes for leukocyte suspension

Режим Mode	Тривалість температурного впливу, хв Temperature exposure duration, min	
	при 0–2°C at 0–2°C	при 37°C at 37°C
1	0	0
2	15	15
3		30
4		60
5	30	30
6		60
7		120
8	60	30
9		60
10		120

cold stress simulating at concentrations of 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ and 10⁻⁹ mol/l, at the second stage – leukocytes were incubated with dalargin at a concentration of 10⁻⁹ mol/l for 15 min (37°C) before the cold exposure onset.

In each series of experiments, we used the samples wherein a saline was added instead of the drug in an equivalent volume and incubated under similar conditions. The control group of samples included those of freshly isolated cells.

The morphological structure of leukocytes after cold stress was studied by light and fluorescence microscopy. The presence of cell pyknosis, fragmentation of the nucleus and blebbing as morphological signs of apoptosis, as well as cell volume increase, membrane disintegration with a release of cytoplasmic content, karyolysis (necrotic signs) were determined using an IN300T-FL light microscope (AmScope, USA) (×1000, immersion) after staining of leukoconcentrate smears according to Romanowsky-Giemsa [18]. The percentage of cells with pathological signs to the total number of all counted cells in the sample and that of leukocytes with normal morphological structure were examined.

Fragmentation of cell nuclei was evaluated by fluorescence microscopic analysis using fluorescent



а Hoechst 33342 – при збудженні 350 нм та випромінюванні 461 нм.

Статистичний аналіз експериментальних даних проводили з використанням програмного пакета «Statgraphics» (Statgraphics Technologies Inc, США) за непараметричним критерієм Манна-Вітні. У кожній серії експериментів була кількість повторів 5–6. Експериментальні дані наведено як середнє арифметичне \pm середнє квадратичне відхилення.

Результати та обговорення

На першому етапі досліджень було з'ясовано співвідношення часу експозиції клітин при температурі 0–2°C та 37°C, за якого відбувається індукція апоптозу і некрозу лейкоцитів. На рис. 1 показано, що після інкубації протягом 15 хв при температурі 0–2°C з подальшим нагріванням до 37°C (режим 2) лейкоцити з морфологічними ознаками апоптозу склали (59,2 \pm 3,1)%. Після використання режимів 3 (15 хв при температурі 0–2°C та 30 хв при 37°C), 4 (15 хв при температурі 0–2°C та 60 хв при 37°C) і 5 (30 хв при температурі 0–2°C та 30 хв при 37°C) клітини з морфологічними ознаками апоптозу не перевищували (60,7 \pm 2,3)%. Необхідно звернути увагу на той факт, що найменший відсоток клітин з морфологічними ознаками некрозу ((17,3 \pm 2,2)%) було виявлено після застосування режимів 2–4. Подовження часу перебування суспензії лейкоцитів при 0–2°C або при 37°C викликало значуще ($p < 0,05$) збільшення відносно 1 режиму відсотка клітин з ознаками некрозу і значуще зменшення відсотка клітин з нормальними морфологічними показниками.

Результати дослідження впливу підвищення температури до 37°C після холодного стресу на розвиток морфологічних ознак апоптозу і некрозу в лейкоцитах показали відсутність в обраних умовах експерименту значущої різниці між поетапним підвищенням температури та швидким переводом суспензії клітин з умов 0–2°C до температури 37°C.

Численні дані вказують на те, що ендogenous опіодні пептиди впливають на апоптоз клітин, ініційований гіпоксією, ішемією, оксидативним стресом тощо [4, 7, 12–14, 17]. Слід зазначити, що інформації відносно антиапоптотичної дії ендogenous пептидів в умовах холодного стресу

dyes Hoechst 33342 (Sigma, USA) and propidium iodide (PI). Cell specimens were photo-recorded using a confocal laser scanning microscope LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany). LSM 510 and LSM Image Examiner (Carl Zeiss) was used to analyze the obtained images. The number of cells with pathological signs of nuclei was expressed as a

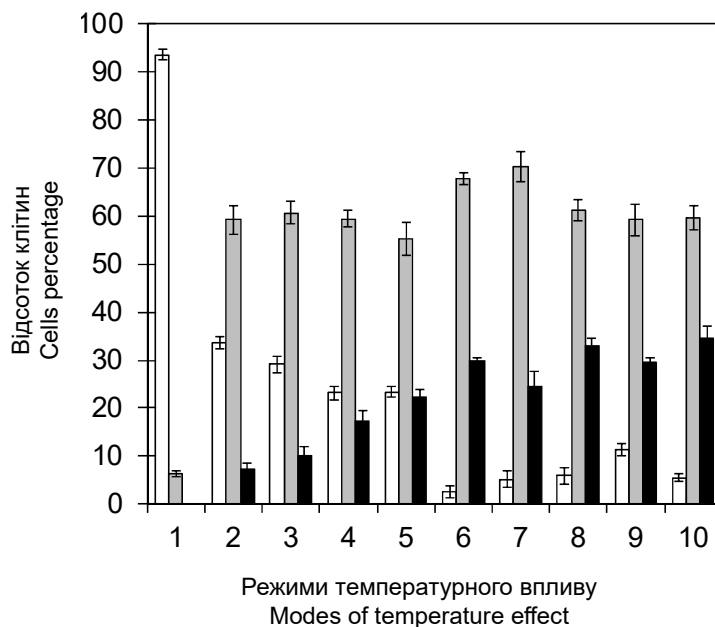


Рис. 1. Вміст лейкоцитів з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу після різних режимів температурного впливу (1–10 режими див. «Матеріали і методи»): □ — норма, ■ — клітини з ознаками апоптозу, ■ — клітини з ознаками некрозу.

Fig. 1. Content of leukocytes with morphological signs of apoptosis and necrosis after different modes of temperature exposure (1–10 modes, see 'Materials and methods'): □ – norm, ■ – cells with apoptosis signs, ■ – cells with necrosis signs.

percentage of the total number of counted cells in the sample. Aliquots of PI (7.5 μ M) and Hoechst 33342 (9 μ M) diluted with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) were added to 1 ml of PBS and mixed 1:1 with the leukoconcentrate where they were present. The samples were kept for 30 min in the dark at room temperature and the dyes were removed by diluting to 5 ml with PBS and centrifuging. The PI fluorescence intensity was recorded at 490 nm excitation and 636 nm radiation, and Hoechst 33342 were done at 350 nm excitation and 461 nm radiation.

Experimental data were statistically analyzed using the 'Statgraphics' software (Statgraphics Technologies Inc, USA) according to the non-parametric Mann-Whitney test. In each series of experiments we used 5–6 repetitions. Experimental data have been presented as arithmetic mean \pm standard deviation.

су немає. Саме тому на наступному етапі досліджень ми з'ясовували вплив даларгіну на апоптоз лейкоцитів, підданих холодовому впливу. Антиапоптотичну дію нейропептиду вивчали у залежності від концентрації (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} та 10^{-9} моль/л) на лейкоцити донорської крові після холодового стресу за режимом 2, який дозволяє отримати найменший відсоток клітин з ознаками некрозу у співвідношенні до апоптотичних клітин і найбільший відсоток клітин з нормальними морфологічними ознаками ($(33,6 \pm 1,3)\%$). З рис. 2 видно, що відсоток клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу порівняно з показниками, одержаними без додавання даларгіну, зменшувався на тлі введення нейропептиду в концентрації 10^{-9} моль/л.

Результати дослідження О.М. Олександрової та співавт. [2] щодо підвищення ефективності дії лей-енкефаліну на лімфоцити людини за рахунок попередньої інкубації з пептидом були використані у нашій подальшій роботі: передобробку лейкоцитів безпосередньо перед холодним впливом для запобігання пошкодженню різкою зміною температури (рис. 3). Для цього лей-енкефалін у концентрації 10^{-9} моль/л дода-

Results and discussion

At the first stage of research, the ratio of cell exposure time at $0-2^{\circ}\text{C}$ and 37°C , at which induction of apoptosis and leukocyte necrosis occurred, was elucidated. Fig. 1 shows that after incubation for 15 min at a temperature of $0-2^{\circ}\text{C}$ with subsequent warming up to 37°C (mode 2), the percentage of leukocytes with morphological signs of apoptosis was $(59.2 \pm 3.1)\%$. After using the modes 3 (15 min at $0-2^{\circ}\text{C}$ and 30 min at 37°C), 4 (15 min at $0-2^{\circ}\text{C}$ and 60 min at 3°C) and 5 (30 min at $0-2^{\circ}\text{C}$ and 30 min at 37°C) the percentage of cells with morphological signs of apoptosis did not exceed $(60.7 \pm 2.3)\%$. It should be noted that the lowest percentage of cells with morphological signs of necrosis ($(17.3 \pm 2.2)\%$) was found after the application of modes 2–4. Prolongation of the time of the leukocyte suspension maintaining at $0-2^{\circ}\text{C}$ or at 37°C caused a significant ($p < 0.05$) increase if compared with mode 1 of percentage of cells with signs of necrosis and a significant decrease in the percentage of cells with normal morphological parameters.

The findings on the effect of temperature rise to 37°C after cold stress on the development of morphological signs of apoptosis and necrosis in

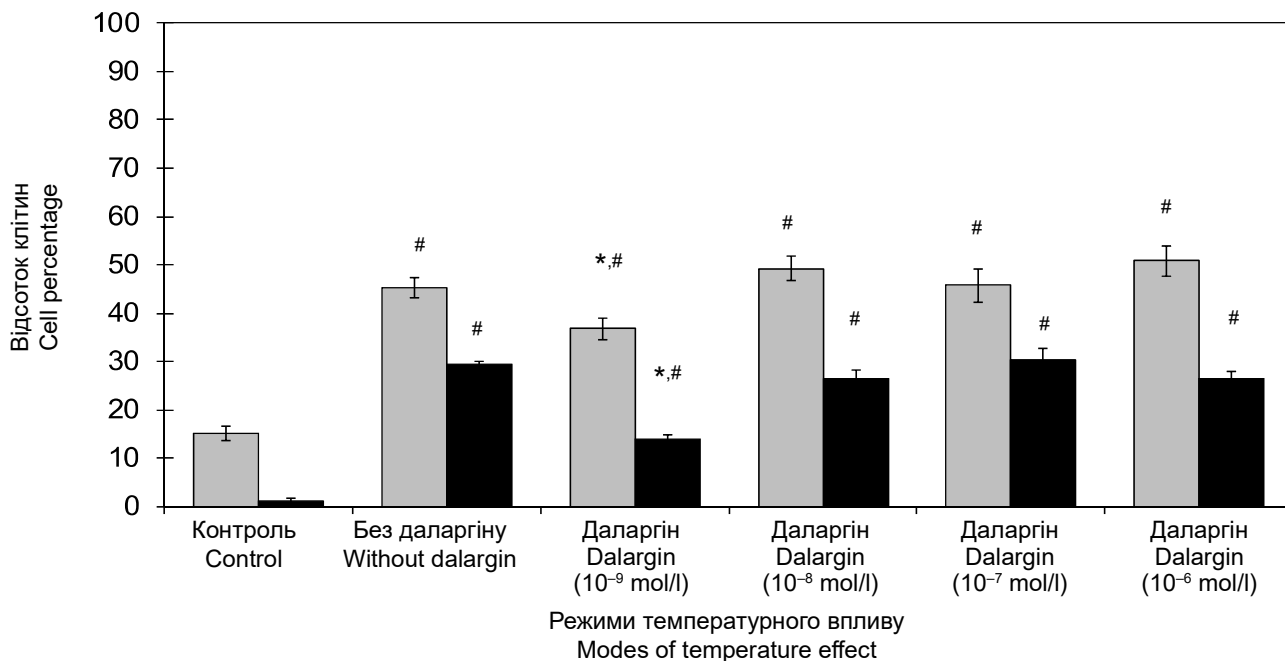


Рис. 2. Відсоток лейкоцитів з ознаками апоптозу і некрозу після холодового стресу та інкубації з даларгіном в концентраціях 10^{-6} моль/л; 10^{-7} моль/л; 10^{-8} моль/л та 10^{-9} моль/л за даними світлової мікроскопії (забарвлення за Романовським-Гімзою): ■ — клітини з ознаками апоптозу; ■ — клітини з ознаками некрозу. * — відмінності значущі порівняно з відповідним показником без додавання препарату, $p \leq 0,05$; # — відмінності значущі порівняно з відповідним показником у контролі, $p \leq 0,05$.

Fig. 2. Percentage of leukocytes with apoptosis and necrosis signs after cold stress and incubation with dalargin at concentrations of 10^{-6} mol/l; 10^{-7} mol/l; 10^{-8} mol/l and 10^{-9} mol/l according to light microscopy (Romanowsky-Giemsa staining): ■ — cells with apoptosis signs; ■ — cells with necrosis signs. * — differences are significant compared to the corresponding value without the drug adding, $p \leq 0.05$; # — differences are significant compared to the corresponding index in the control, $p \leq 0.05$.

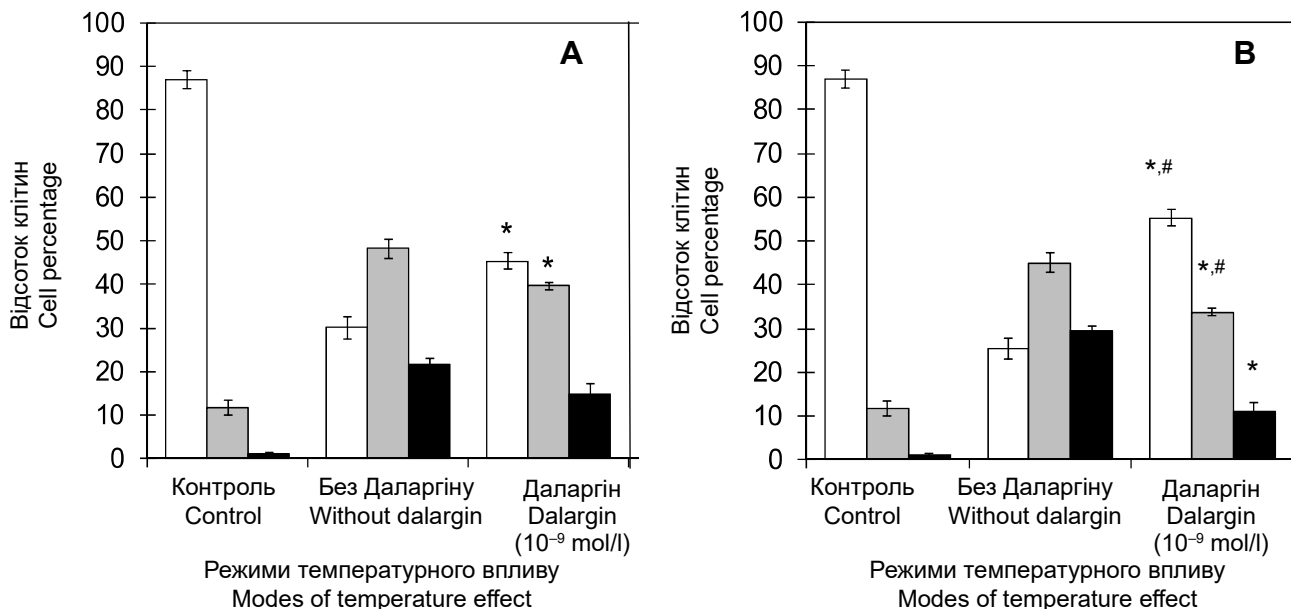


Рис. 3. Вплив даларгіну на відсоток лейкоцитів з ознаками апоптозу і некрозу (після холодового стресу) без попередньої інкубації клітин з нейропептидом (А) та з попередньою 15-хвилинною інкубацією (В) перед холодним стресом (забарвлення за Романовським-Гімзою): □ — норма; ■ — клітини з ознаками апоптозу; ■ — клітини з ознаками некрозу. * — відмінності значущі порівняно з відповідним показником без додавання препарату, $p \leq 0,05$; # — відмінності значущі порівняно з відповідним показником у зразках без попередньої інкубації з даларгіном, $p \leq 0,05$.

Fig. 3. Dalargin effect on percentage of leukocytes with apoptosis and necrosis signs (after cold stress) without pre-incubation of cells with neuropeptide (A) and with a previous 15-minute incubation (B) before cold stress (Romanovsky-Giemsa staining): □ — normal; ■ — cells with apoptosis signs; ■ — cells with necrosis signs. * — differences are significant compared to the corresponding value without the drug adding, $p \leq 0.05$; # — differences are significant compared to the corresponding value in samples without pre-incubation with dalargin, $p \leq 0.05$.

вали до клітинної суспензії перед холодним стресом, час експозиції складав 15 хв при 37°C. За даними світлової мікроскопії встановлено, що попередня інкубація лейкоцитів з нейропептидом у концентрації 10⁻⁹ моль/л приводить до значущого зменшення ($p \leq 0,05$) відсотка клітин з морфологічними ознаками апоптозу ((34,8 ± 2,2)%) порівняно з варіантом без попередньої інкубації клітин з нейропептидом ((44,7 ± 0,9)%). Необхідно відзначити той факт, що попередня інкубація з нейропептидом не впливала на зміну кількості некротичних клітин (рис. 3).

Для кращої візуалізації морфологічних змін ядерних структур та виявлення цілісності мембрани лейкоцитів після холодного впливу (режим 2) одночасно зі світловою мікроскопією використовували метод забарвлення клітин флуоресцентними ДНК-барвниками Hoechst 33342 та пропідію йодиду (PI) (рис. 4). Після використання Hoechst 33342 була встановлена тенденція, ідентична до вищевказаної (рис. 5). Так, в експериментальній групі без додавання даларгіну до зразків лейкоцитів після холодного впливу відсоток клітин з фрагментацією ядра становив ((41,4 ± 1,7)%). Після додавання до інкубаційного середовища нейропептиду відсоток

leukocytes showed no significant difference in the selected experimental conditions between gradual temperature rise and rapid transfer of cell suspension from 0–2°C to 37°C.

Numerous data indicate that endogenous opioid peptides affect cell apoptosis initiated by hypoxia, ischemia, oxidative stress, *etc.* [8, 11–13, 16, 17]. It should be noted that there is no information on the antiapoptotic action of endogenous peptides under cold stress. Therefore, in the next phase of research, we investigated the effect of dalargin on the apoptosis of cold-exposed leukocytes. The antiapoptotic effect of the neuropeptide was studied depending on the concentration (10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ and 10⁻⁹ mol/l) on donor blood leukocytes after cold stress according to mode 2, which allowed to obtain the lowest percentage of cells with the signs of necrosis regarding apoptotic cells and the highest percentage of cells with normal morphological features (33.6 ± 1.3)%. Fig. 2 demonstrates that the percentage of cells with morphological signs of apoptosis and necrosis compared to those obtained without the addition of dalargin, decreased when the neuropeptide was introduced at a concentration of 10⁻⁹ mol/l.

The results of the study performed by O.M. Oleksandrova *et al.* [3] to increase the effectiveness of leu-enkephalin on human lymphocytes due to pre-

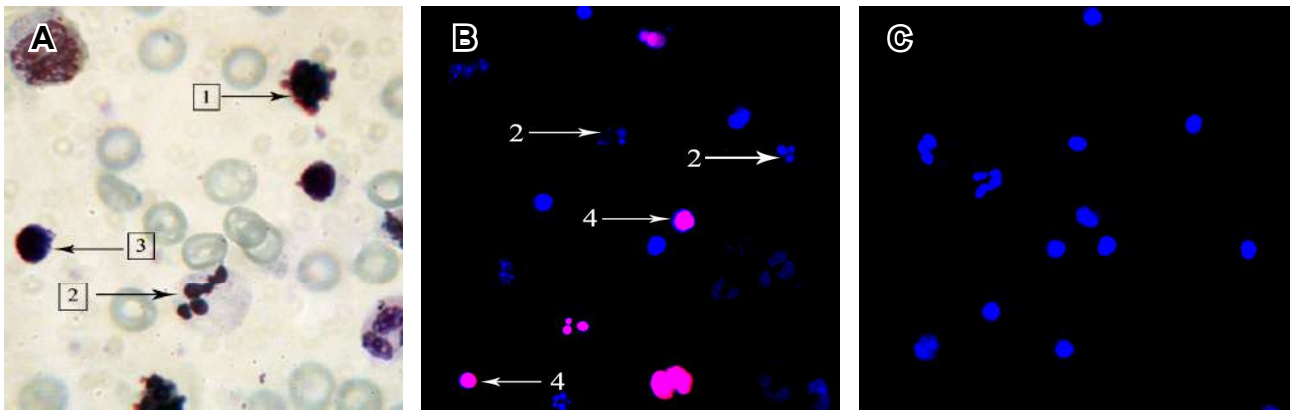


Рис. 4. Лейкоцити з морфологічними ознаками апоптозу після холодного стресу: **A** — мікрофотографія суспензії лейкоцитів після холодного стресу, забарвлення еозин-метиленовим синім та азур-еозином. Зб.: $\times 1000$; імерсія; **B** — мікрофотографія суспензії лейкоцитів після холодного стресу, забарвлення Hoechst 33342 та PI. Зб. $\times 630$, імерсія; **C** — мікрофотографія нативних лейкоцитів, забарвлення Hoechst 33342 та PI. Зб. $\times 630$, імерсія. 1 — блебінг, 2 — фрагментація ядра, 3 — пікноз, 4 — некроз.

Fig. 4. Leukocytes with morphological signs of apoptosis after cold stress: **A** — micrograph of leukocyte suspension after cold stress, staining with eosin-methylene blue and azure-eosin. Magnification: $\times 1000$; immersion; **B** — micrograph of leukocyte suspension after cold stress, Hoechst 33342 staining and PI. Magnification: $\times 630$, immersion; **C** — micrograph of native leukocytes, Hoechst 33342 staining and PI. Magnification: $\times 630$, immersion. 1 — blebbing, 2 — nucleus fragmentation, 3 — pyknosis, 4 — necrosis.

клітин із фрагментацією ядра значуще зменшувався ($22,7 \pm 2,7\%$) (рис. 5).

Результати дослідження життєздатності лейкоцитів після забарвлення PI також узгоджуються з попередніми даними відносно морфологічних ознак некрозу. З рис. 5 видно, що в контрольній групі некротичні клітини склали ($32,6 \pm 2,1\%$), однак після додавання нейропептиду вони не перевищували ($10,8 \pm 1,3\%$).

Таким чином, одержані результати узгоджуються з попередніми даними, які вказують на збільшення кількості апоптотичних клітин в умовах температури нижче фізіологічної, що може бути наслідком метаболічних змін у клітинах, цитоскелета, клітинного циклу, транскрипції та трансляції у відповідь на холодний стрес [8, 13, 15]. Зокрема, в роботі J.H. Fransen та співавт. [9] також було встановлено, що 2-годинна інкубація клітинної культури 32Dcl3 на льоду з подальшим поверненням до нормотермії (37°C) вже через 30–90 хв після відігрівання призводить до появи 80–90% клітин з ознаками раннього апоптозу (співвідношення annexin V-позитивні/PI-негативні). Після подальшого культивування культури при 37°C до 24 годин відсоток клітин збільшувався (до 98%) на стадії пізнього апоптозу (співвідношення annexin V-позитивні/PI-позитивні). Результати досліджень після використання різних режимів холодного стресу показали, що тривалість інкубації суспензії клітин при $0-2^{\circ}\text{C}$ та повернення до умов нормотермії при 37°C впливали на ініціацію апоптозу і некрозу клітин. Встановлено, що наймен-

шинування з пептидом, були використані в нашій подальшій роботі, а саме попереднє лікування лейкоцитів перед холодним впливом, щоб уникнути пошкодження раптово змінюючись температурою (рис. 3). Для цієї мети, leu-enkephalin у концентрації 10^{-9} mol/l додавали до клітинної суспензії перед холодним впливом, час впливу становив 15 хв при 37°C . Завдяки світловій мікроскопії, було встановлено, що попереднє лікування лейкоцитів з нейропептидом у концентрації 10^{-9} mol/l призвело до значущого зменшення ($p \leq 0,05$) в частоті клітин з морфологічними ознаками апоптозу до ($34,8 \pm 2,2\%$) порівняно з варіантом без попереднього лікування клітин з нейропептидом ($44,7 \pm 0,9\%$). Також слід зазначити, що попереднє лікування з нейропептидом не вплинуло на зміну частоти некротичних клітин (рис. 3).

Щоб краще візуалізувати морфологічні зміни ядерних структур та перевірити цілісність мембрани лейкоцитів після холодного впливу (режим 2) одночасно з світловою мікроскопією було використано метод фарбування клітин флуоресцентними фарбами Hoechst 33342 та PI. Після використання Hoechst 33342, було знайдено ідентичні результати до вищезгаданих (рис. 5). Таким чином, в експериментальній групі без додавання dalargin до лейкоцитів після холодного впливу, частота клітин з фрагментацією ядра становила ($41,4 \pm 1,7\%$). Після додавання нейропептиду до середовища інкубації, частота клітин з фрагментацією ядра знизилася значущо до ($22,7 \pm 2,7\%$) (рис. 5).



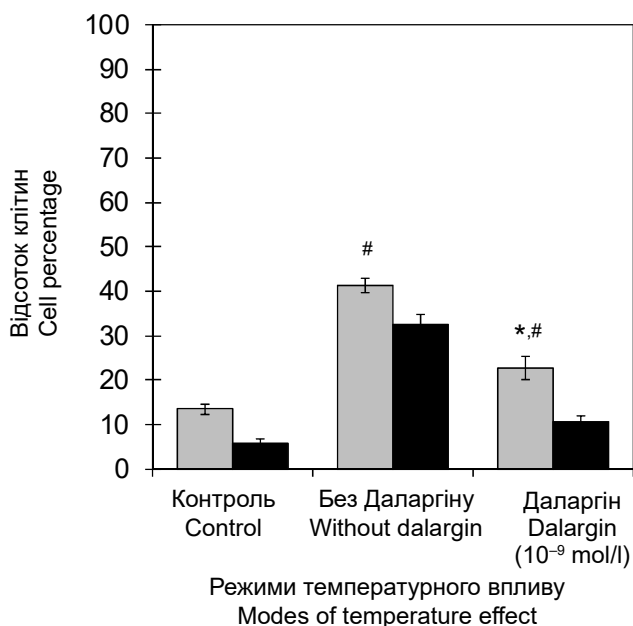


Рис. 5. Відсоток апоптотичних і некротичних лейкоцитів після попередньої інкубації з даларгіном в концентрації 10^{-9} моль/л та холодового стресу за даними флуоресцентної мікроскопії (забарвлення Hoechst 33342 і PI): ■ — клітини з ознаками апоптозу; ■ — клітини з ознаками некрозу. * — відмінності значущі порівняно з показником без додавання препарату, $p \leq 0,05$; # — відмінності значущі порівняно з контролем, $p \leq 0,05$.

Fig. 5. Percentage of apoptotic and necrotic leukocytes after pre-incubation with dalargin at a concentration of 10^{-9} mol/l and cold stress according to fluorescence microscopy (Hoechst 33342 and PI staining): ■ — cells with apoptosis signs; ■ — cells with necrosis signs. * — differences are significant compared to the figure without the drug adding, $p \leq 0.05$; # — differences are significant compared to the control, $p \leq 0.05$.

ший відсоток некротичних клітин по відношенню до клітин з ознаками апоптозу ($(17,3 \pm 2,2)\%$) був виявлений після використання режимів 2–5. За використання інших режимів даний показник значуще ($p < 0,05$) збільшувався до $(34,7 \pm 2,3)\%$, а у клітин з нормальними морфологічними ознаками він не перевищував $(11,4 \pm 1,3)\%$.

Дослідження антиапоптотичної дії нейропептиду на лейкоцити донорської крові людини після холодового стресу виявило його протекторний вплив при концентрації 10^{-9} моль/л. Результати роботи щодо попередньої інкубації з нейропептидом до впливу холодового стресу, які коригують з дослідженнями О.М. Олександрової та співавт. [2], свідчать про необхідність проведення даного етапу для підвищення ефективності дії лей-енкефаліну за різких змін температури.

Таким чином, встановлено, що синтетичний аналог лей-енкефаліну даларгін впливає на розвиток апоптозу і некрозу клітин в умовах

The investigations on the viability of leukocytes after PI staining are also consistent with preliminary data on the morphological signs of necrosis. Fig. 5 shows that in the control group the percentage of necrotic cells was $(32.6 \pm 2.1)\%$, but it did not exceed $(10.8 \pm 1.3)\%$ after the addition of the neuropeptide.

Thus, the obtained results are consistent with preliminary data, which indicate an increased number of apoptotic cells at sub-physiological temperatures, which may be due to metabolic changes in cells, cytoskeleton, cell cycle, transcription and translation in response to cold stress [2, 12, 14]. In particular, J.H. Fransen *et al.* [4] reported also that 2-hour incubation of 32Dc13 cell culture on ice with subsequent return to normothermia (37°C) after 30–90 min warming led to the appearance of 80–90% of cells with the signs of early apoptosis (annexin V-positive / PI-negative ratio). After further culturing at 37°C for up to 24 hours, the percentage of cells increased up to 98% at the stage of late apoptosis (annexin V-positive / PI-positive ratio). The results of studies after the use of different modes of cold stress showed that the duration of incubation of cell suspension at $0-2^{\circ}\text{C}$ and return to normothermia at 37°C influenced the initiation of apoptosis and necrosis of cells. It was found that the lowest percentage of necrotic cells in relation to those with the signs of apoptosis ($17.3 \pm 2.2\%$) was detected with the use of modes 2–5. Applying other regimens, this index significantly ($p < 0.05$) increased to $(34.7 \pm 2.3)\%$, and in the cells with normal morphological features it did not exceed $(11.4 \pm 1.3)\%$.

The investigation of the anti-apoptotic effect of the neuropeptide on human leukocytes of donor blood after cold stress revealed its protective effect at a concentration of 10^{-9} mol/l. The results of this research on pre-incubation with the neuropeptide as for cold stress effect, consistent with the reported studies of O.M. Oleksandrova *et al.* [3], indicate the necessity of this step to enhance the effectiveness of leu-enkephalin in sudden changes in temperature.

Thus, the synthetic analogue of leu-enkephalin dalargin has been established to affect the development of apoptosis and necrosis of cells during cold stress, that is manifested in its protective effect. Further studies are needed to elucidate the mechanism of this action of dalargin, the results of which can be used to develop rehabilitation and conservation media containing these peptides to increase the functional activity and viability of leukocytes after cold stress.

холодового стресу, що проявляється в його протекторній дії. Для з'ясування механізму описаної дії даларгіну необхідні подальші дослідження, результати яких можуть бути використані для розробки реабілітаційних і консервувальних середовищ із даними пептидами з метою підвищення функціональної активності та життєздатності лейкоцитів після холодового стресу.

Висновки

1. Досліджено ступінь впливу холодового стресу залежно від тривалості інкубації суспензії клітин при 0–2 та 37°C на ініціацію апоптозу і некрозу за морфологічними ознаками клітин. Встановлено, що після 15-хвилинної інкубації при 0–2°C і подальшого повернення до умов нормотермії (37°C) протягом 15 хв зареєстровано найменший відсоток клітин з ознаками некрозу ((7,2 ± 1,2)%) і найбільший відсоток клітин з нормальними морфологічними ознаками ((33,6 ± 1,3)%).

2. Доведено, що поетапне підвищення температури до 37°C після холодової дії не впливає на відсоток лейкоцитів з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу порівняно зі швидким поверненням до нормотермії.

3. Встановлено, що попередня інкубація лейкоцитів з даларгіном у концентрації 10⁻⁹ моль/л призводить до значущого ($p < 0,05$) зменшення кількості лейкоцитів з ознаками апоптозу і некрозу після холодового стресу.

4. Результати дослідження морфологічних ознак лейкоцитів після забарвлення PI та Hoechst 33342 узгоджуються з даними їх вивчення методом світлової мікроскопії.

Література

1. Аграненко ВА, Сукасян ГВ, Воробьева ГС, и др. Методы выделения концентратов тромбо- и лейкоцитов из лейкоцитарного слоя консервированной крови в пластиковых мешках. Гематология и трансфузиология. 1985; 30 (11): 54–9.
2. Александрова ЕН, Насонов ЕЛ, Виноградов ВА, и др. Влияние синтетического аналога эндогенных опиоидов даларгина на естественную цитотоксичность лимфоцитов человека. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1988; (4): 442–5.
3. Гулевский АК, Клейнбок ИЯ, Терещенко ОС, и др. Влияние фракции полипептидов (1–10 кД) из мозга гибернирующих сусликов *Citellus undulatus* на функционирование терморепрепторов кошки *Felis vulgaris*. Проблемы криобиологии. 1994; (2): 17–21.

Conclusions

1. The extent of cold stress influence depending on the duration of incubation of cell suspension at 0–2 and 37°C on the initiation of apoptosis and necrosis on morphological characteristics of cells was studied. It was found that after a 15-minute incubation at 0–2°C and subsequent return to normothermia (37°C) for 15 min, the lowest percentage of cells with signs of necrosis (7.2 ± 1.2)% and the highest percentage of cells with normal morphological features (33.6 ± 1.3%) were recorded.

2. It has been proven that the gradual rise of temperature to 37°C after cold effect does not affect the percentage of leukocytes with morphological signs of apoptosis and necrosis compared to the rapid return to normothermia.

3. Pre-incubation of leukocytes with dalargin at a concentration of 10⁻⁹ mol/l was found to result in a significant ($p < 0.05$) decrease in the number of leukocytes with the apoptosis and necrosis signs after cold stress.

4. The findings of morphological features of leukocytes after staining with PI and Hoechst 33342 are consistent with the light microscopy data.

References

1. Agranenko VA, Sukyasyan GV, Vorobyeva GS, et al. [Methods for isolation of thrombo- and leucocyte concentrates from the thrombocytic layer of the blood preserved in plastic bags]. *Gematologiya i transfuziologiya*. 1985; 30(11): 54–9. Russian.
2. Al-Fageeh MB, Smales MC. Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochem J*. 2006; 397(Pt 2): 247–59.
3. Aleksandrova EN, Nasonov EL, Vinogradov VA, et al. Effect of dalargin, a synthetic endogenous opioid analog, on natural cytotoxicity of human lymphocytes. *Bull Exp Biol Med*. 1988; 105: 528–31.
4. Fransen JH, Dieker JW, Hilbrands LB, et al. Synchronized turbo apoptosis induced by cold-shock. *Apoptosis*. 2011; 16 (1): 86–93.
5. 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 Oct 31 [cited Jul 23 2018]; 11:603. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2017.00603/full>.
6. Gulevsky AK, Grischenko VI, Tereschenko OS, et al. The effect of a (1–10 kD) brain fraction of *Equus Coballus* of Yakut region on the kinetic parameters of Ca²⁺-transporting systems in cardiomyocyte sarcolemma vesicles. *CryoLetters*. 1994; 15 (1): 27–32.
7. Gulevsky AK, Kleinbock IA, Tereschenko OS, et al. Effect of 1–10 kD polypeptide fraction from brain of hibernating ground squirrel (*Citellus undulatus*) on functioning of cat (*Felis vulgaris*) thermoreceptors. *Problems of Cryobiology*. 1994; (2): 16–20.



4. Korotkina RN, Fomichenkov EP, Babkina NV, et al. Antioxidant action of dalargin on the liver in experimental acute cholestasis. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 1990; (4): 42–4.
5. Likhvantsev VV, Grebenchikov OA, Shaposhnikov AA, et al. Pharmacological preconditioning: role of opioid peptides. *Общая реаниматология*. 2012; 8 (3): 51–5.
6. Maslov LN, Lishmanov YB, Barzakh EI, et al. Cardiovascular effects of D-Ala2,Leu5,Arg6-enkephalin (Dalargin) are mediated by activation of peripheral μ -opioid receptors. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2008; 71 (2): 21–8.
7. Solin AV, Lyashov YD. Influence of opioid peptides on the content of products of POC and activity of antioxidant system in the liver of mice, subjected to immobilization stress. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2012; 153 (6): 803–5.
8. Al-Fageeh MB, Smales MC. Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochem J*. 2006; 397 (Pt 2): 247–59.
9. Fransen JH, Dieker JW, Hilbrands LB, et al. Synchronized turbo apoptosis induced by cold-shock. *Apoptosis*. 2011; 16 (1): 86–93.
10. 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 Oct 31 [cited Jul 23 2018]; 11:603. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2017.00603/full>.
11. Gulevsky AK, Grischenko VI, Tereschenko OS, et al. The effect of a (1–10 kD) brain fraction of *Equus Coballus* of Yakut region on the kinetic parameters of Ca^{2+} -transporting systems in cardiomyocyte sarcolemma vesicles. *CryoLetters*. 1994; 15 (1): 27–32.
12. Neutelings T, Lambert CA, Nussgens BV, et al. Effects of mild cold shock (25°C) followed by warming up at 37°C on the cellular stress response. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jul 23 [cited 20.06.2019]; 2013; 8(7): e69687. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0069687>.
13. Rauen U, Petrat F, Li T, et al. Hypothermia injury/cold induced apoptosis – evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O_2 -/ H_2O_2 formation. *FASEB J*. 2000; 14 (13): 1953–64.
14. Rauen U, Polzar B, Stephan H, et al. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J*. 1999; 13 (1): 155–68.
15. Roobol A, Carden MJ, Newsam RJ, Smales CM. Biochemical insights into the mechanisms central to the response of mammalian cells to cold stress and subsequent rewarming. *FEBS J*. 2009; 276 (1): 286–302.
16. Shenoy SS, Lui F. *Biochemistry, Endogenous Opioids*. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [cited 20.06.2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532899/>
17. Tang B, Zhang Y, Liang R, et al. Activation of the δ -opioid receptor inhibits serum deprivation-induced apoptosis of human liver cells via the activation of PKC and the mitochondrial pathway. *Int J Mol Med*. 2011; 28 (6): 1077–85.
18. Zhang Y, Chen X, Gueydan C, et al. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Res*. 2017; 2018; 28 (1): 9–21.
8. Korotkina RN, Fomchenkov EP, Babkina NV, et al. [The antioxidant action of dalargin on the liver in experimental acute cholestasis]. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya Terapiya*. 1990; 4: 42–4. Russian.
9. Likhvantsev VV, Grebenchikov OA, Shaposhnikov AA, et al. [Pharmacological preconditioning: role of opioid peptides]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2012; 8(3): 51–5. Russian.
10. Maslov LN, Lishmanov YuB, Barzakh EI, et al. [Cardiovascular effects of D-Ala2,Leu5,Arg6-enkephalin (Dalargin) are mediated by peripheral μ -opioid receptor activation]. *Éksperimentalnaya i Klinicheskaya Farmakologiya*. 2008; 71(2): 21–8. Russian.
11. Neutelings T, Lambert CA, Nussgens BV, et al. Effects of mild cold shock (25°C) followed by warming up at 37°C on the cellular stress response. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jul 23 [cited 20.06.2019]; 2013; 8(7): e69687. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0069687>.
12. Rauen U, Petrat F, Li T, et al. Hypothermia injury/cold induced apoptosis – evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O_2 -/ H_2O_2 formation. *FASEB J*. 2000; 14(13): 1953–64.
13. Rauen U, Polzar B, Stephan H, et al. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J*. 1999; 13(1): 155–68.
14. Roobol A, Carden MJ, Newsam RJ, Smales CM. Biochemical insights into the mechanisms central to the response of mammalian cells to cold stress and subsequent rewarming. *FEBS J*. 2009; 276(1): 286–302.
15. Shenoy SS, Lui F. *Biochemistry, Endogenous Opioids*. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [cited 2019 Jun 20]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532899/>
16. Solin AV, Lyashev YuD. Effect of opioid peptides on the content of LPO products and antioxidant enzyme activity in the liver of rats after restraint stress. *Bull Exp Biol Med*. 2012; 153(6): 828–30.
17. Tang B, Zhang Y, Liang R, et al. Activation of the δ -opioid receptor inhibits serum deprivation-induced apoptosis of human liver cells via the activation of PKC and the mitochondrial pathway. *Int J Mol Med*. 2011; 28(6): 1077–85.
18. Zhang Y, Chen X, Gueydan C, et al. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Res*. 2017; 2018; 28 (1): 9–21.