

УДК 57.086.13: 576.36.017.6

А.К. Гулевский*, Ю.С. Ахатова, И.И. Щенявский

Особенности апоптоза, индуцированного снижением температуры

UDC 57.086.13: 576.36.017.6

A.K. Gulevsky*, Yu.S. Akhatova, I.I. Shchenyavsky

Features of Apoptosis, Induced by Temperature Reduction

Реферат: В работе обобщены и проанализированы экспериментальные данные о вкладе апоптоза в повреждения клеток, вызванные отклонением температуры от физиологической нормы (ниже 37°C). Доказано участие в апоптозе, индуцированном умеренным охлаждением клеток, каспаз, под действием которых происходит расщепление антиапоптотических белков семейства Bcl-2 и протеолиз ингибитора ДНК-азы, ответственной за фрагментацию ДНК. Существенную роль в механизме холодовой адаптации играет РНК-связывающий белок (cold-inducible RNA-binding protein, CIRP), способный предотвращать развитие апоптоза, индуцированного окислительным стрессом. В работе приведены данные, подтверждающие участие в процессах апоптоза и холодовой адаптации активных форм кислорода и антиоксидантных клеточных компонентов: супероксиддисмутазы и пероксиредоксина 1 человека.

Ключевые слова: апоптоз, гипотермия, клеточные культуры, индукция апоптоза, каспазы, окислительный стресс, антиоксидантная система.

Реферат: У роботі узагальнено і проаналізовано експериментальні дані щодо внеску апоптозу в пошкодження клітин, викликані відхиленням температури від фізіологічної норми (нижче за 37°C). Доведено участь в апоптозі, індукованому помірним охолодженням клітин, каспаз, під дією яких відбувається розщеплення антиапоптотичних білків родини Bcl 2 та протеоліз інгібітора ДНК-азы, яка відповідає за фрагментацію ДНК. Істотну роль у механізмі холодової адаптації відіграє РНК-зв'язуючий білок (cold-inducible Rna-binding protein, CIRP), здатний запобігати розвитку апоптозові, індукованому окиснювальним стресом. У роботі викладено дані, які підтверджують участь у процесі апоптозу та холодової адаптації активних форм кисню і антиоксидантних клітинних компонентів: супероксиддисмутазу і пероксиредоксин 1 людини.

Ключові слова: апоптоз, гіпотермія, клітинні культури, індукція апоптозу, каспази, окиснювальний стрес, антиоксидантна система.

Abstract: We summarised and analysed here the findings on apoptosis contribution into the cell damages, caused by temperature deviation from the physiological norm (below 37°C). The participation of the caspases, causing the disintegration of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins and proteolysis of the DNAase inhibitor, responsible for DNA fragmentation in the apoptosis, induced by a moderate cell cooling, was shown. An important role in cold adaptation mechanism belongs to the RNA-binding protein (cold-inducible RNA-binding protein, CIRP), which is capable to prevent the oxidative stress-induced apoptosis development. We reported here the data, confirming the participation of reactive oxygen species and antioxidant cell components: superoxide dismutase and human peroxiredoxin 1 in apoptosis and cold adaptation.

Key words: apoptosis, hypothermia, cell cultures, apoptosis induction, caspases, oxidative stress, antioxidant system.

Апоптоз – регулируемый процесс запрограммированной гибели клеток, который свойственен всем эукариотам начиная от одноклеточных простейших и вплоть до высших организмов. Этот процесс сопровождается типичными морфологическими и биохимическими изменениями во всех клеточных структурах: цитоплазме, ядре, других органеллах, плазматической и митохондриальной мембранах (рис. 1). Одной из основных функций апоптоза является уничтожение дефектных (поврежденных, мутантных, инфицированных) клеток. В многоклеточных организмах апоптоз также задействован в процессах дифференциации и морфогенеза, поддержании клеточного гомеостаза, обеспечении важных звеньев иммунореактивности.

Apoptosis is a controlled process of programmed cell death, being inherent to all eukaryotes, starting from the one-celled protozoa up to the higher organisms. This process is accompanied by typical morphological and biochemical changes in all the cell structures: cytoplasm, nucleus, other organelles, plasma and mitochondrial membranes (Fig. 1). One of the main functions of apoptosis is the destruction of defective (damaged, mutant, infected) cells. In multicellular organisms the apoptosis is also involved into differentiation and morphogenesis, maintenance of cell homeostasis and providing the essential components of immunoreactivity.

For many years the attention of researchers has been focused on the problem of triggering and features

Отдел холодовой адаптации, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

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

*Автор, которому необходимо отправлять корреспонденцию:

ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,
электронная почта: profgulevskyy@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

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

Поступила 13.12.2016

Принята в печать 25.01.2017

Received December, 13, 2016

Accepted January, 25, 2017

© 2017 A.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.

Внимание исследователей на протяжении многих лет привлекает проблема запуска и особенности развития апоптотических процессов в условиях температуры ниже физиологической, поскольку отклонение от оптимальных значений способно вызывать запрограммированную гибель клеток (рис. 1). Многочисленные данные указывают на то, что для большинства клеток апоптоз является типичной реакцией на гипотермию и последующий отогрев [20, 24]. Степень проявления апоптоза, а также выживаемость разных типов клеток зависят от продолжительности холодового воздействия, величины и скорости температурного сдвига, а также других факторов. Так, в клетках млекопитающих активация апоптотической программы была отмечена даже после умеренного холодового стресса (25...35°C). При этом следует

отметить, что апоптотические изменения развиваются только через определенное время (несколько часов) после возвращения клеток в оптимальные температурные условия [7].

Снижение температуры может приводить как к стимуляции, так и задержке апоптоза [25]. Например, культивирование при 30°C индуцировало апоптоз в крысиных гистиоцитах линии BC-8 [11]. Клетки BC-8 были получены в результате клонирования единственной клетки линии опухолевых клеток АК-5. Они характеризуются низкой экспрессией антиапоптотического белка Bcl-2 – представителя семейства эволюционно родственных белков, которые контролируют пермеабиллизацию внешней мембраны митохондрий (*mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP) и могут быть проапоптотическими (Bax, BAD, Bak, Bok и др.) или антиапоптотическими (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w и др.). В клетках данной линии после культивирования при 30°C установлены типичные признаки апоптоза: нарушение морфологической структуры; конденсация хроматина; фрагментации ДНК; высвобождение цитохрома С; появление специфического белка апоптоза ASP (apoptosis specific protein); активация транскрипционного фактора p53 с апоптотической активностью; повышение содержания проапоптотичес-

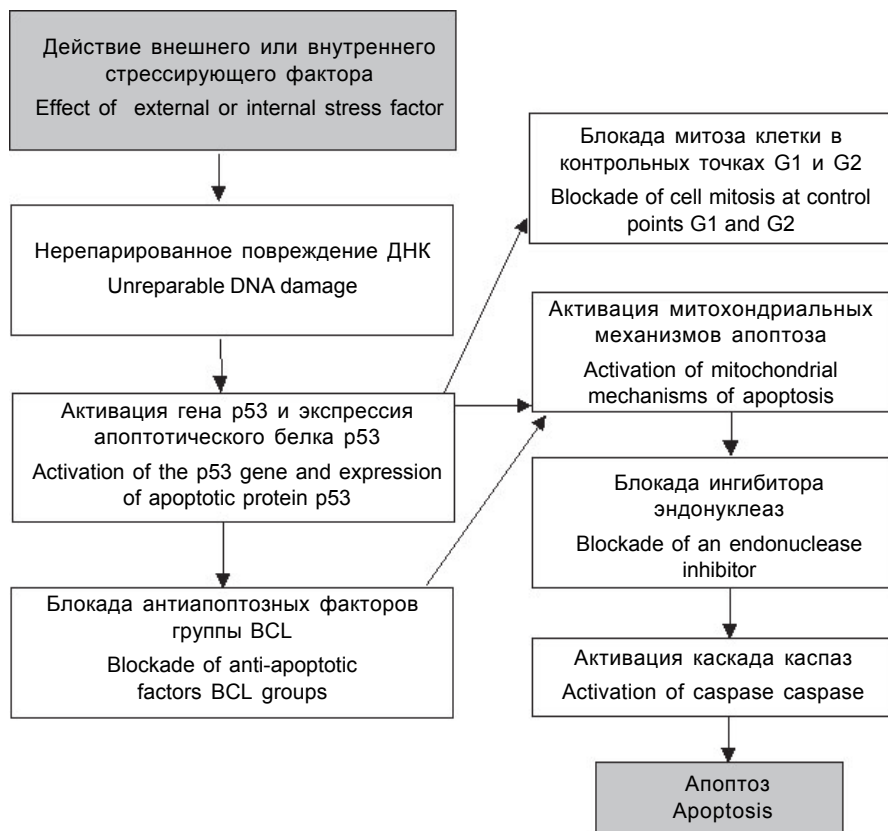


Рис. 1. Схема механизма апоптоза.
Fig. 1. Mechanism of apoptosis.

of apoptosis development under the temperature below physiological one, since a deviation from its optimal values may cause a programmed cell death. Numerous data demonstrate the apoptosis to be a typical reaction of the most cells to hypothermia and subsequent warming [20, 24]. The apoptosis manifestation level, as well as the survival of different cell types depend on cold exposure duration, magnitude and rate of temperature shift, and other factors as well. For example, in mammalian cells the activation of apoptotic program was even noted after moderate cold stress (25...35°C). Herewith it should be noted that the apoptotic changes develop only after a certain period (several hours) of cell returning back to optimal temperature conditions [6].

A temperature decrease may result either in stimulation or delay of apoptosis [25]. For example, the culture at 30°C induced apoptosis in rat BC-8 histiocytes [11]. The BC-8 cells were derived by cloning a single cell of AK-5 tumor cell line. They are characterised by a low expression of anti-apoptotic protein Bcl-2, a member of the family of evolutionarily related proteins, controlling the mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) and may be pro-apoptotic (Bax, BAD, Bak, Bok, etc.) or anti-apoptotic (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w etc.). In cells of this line



кого трансмембранного белка митохондрий Bcl-X, белка Bax и др. A. Khar и соавт. [11] предположили, что опухоли со сниженной экспрессией Bcl-2 чувствительны к холодовому шоку, поэтому гипотермия является индуктором апоптоза в таких опухолевых клетках. По данным R. Grand и соавт. [8] ASP может быть маркером апоптоза, поскольку он колокализуется с немышечным актином. Причем биохимическая экстракция ASP осуществима только при условии солюбилизации цитоскелета, а это означает, что данный белок образует устойчивые связи с модифицированным цитоскелетом, специфичным для апоптотических клеток.

Индукция апоптоза после инкубации клеток при температуре 16...21°C характерна также и для лимфоцитов периферической крови человека [1]. Было установлено, что в результате снижения температуры на градус количество апоптотических клеток (определено с помощью комбинированного окрашивания акридиновым оранжевым и этидиумбромидом) в течение 4,5–5 ч увеличивается на $(2,1 \pm 0,44)\%$. Регрессионный анализ показал, что граничное значение температуры, ниже которого активируется апоптоз, соответствует $(22,4 \pm 0,54)^\circ\text{C}$. По мнению авторов, в условиях длительного переохлаждения *in vivo* может также происходить стимуляция апоптоза лимфоцитов периферической крови, что может влиять на общую реактивность иммунной системы.

В человеческих легочных фибробластах линии WI26 после хранения при 25°C в течение 5 суток наблюдались морфологические изменения, которые сохранялись и через сутки после отогрева до 37°C [20]. Клетки имели округлую форму и не прикреплялись к подложке, что свидетельствует об индукции апоптоза. По данным количественного анализа ДНК и включению [³H]-тимидина установлено, что гибель клеток происходила не при 25°C, а после их возвращения в условия нормотермии. Уровень фосфорилирования киназы ERK1/2 (сигнальный путь ERK принимает участие в фосфорилировании p53) в процессе хранения при 25°C снижался, но через 1–2 ч после отогрева возрастал в 6–8 раз. В условиях культивирования при 25°C в человеческих трансформированных фибробластах линии WI26 экспрессия как антиапоптотического (Bcl-2), так и проапоптотического белка (Bax) снижалась и оставалась на таком же уровне в течение нескольких часов после возвращения клеток к нормотермии. Однако соотношение Bax/Bcl-2 во время холодового шока и вскоре после отогрева было повышено, что указывало на развитие апоптоза. В результате холодового шока общее содержание в клетках мРНК трансмембранного белка митохондрий Bcl-X значительно увеличивалось. При 25°C

the typical signs of apoptosis were established after culturing at 30°C such as a disorder in morphological structure; chromatin condensation; DNA fragmentation; cytochrome C release; appearance of apoptosis specific protein ASP; activation of transcription factor p53 with apoptotic activity; an increased content of pro-apoptotic transmembrane protein of mitochondria Bcl-X, Bax protein *etc.* A. Khar *et al.* [11] suggested the tumours with a reduced expression of Bcl-2 to be sensitive to cold shock, *i. e.* the hypothermia is the apoptosis inducer in these tumour cells. According to the findings of R. Grand *et al.* [8] the ASP may be the apoptosis marker, as it is colocalized with non-muscle actin. Moreover, a biochemical extraction of ASP is possible only after cytoskeleton solubilisation, *i. e.* this protein forms stable bonds with modified cytoskeleton, specific for apoptotic cells.

The apoptosis induction after cell incubation at 16...21°C is also characteristic for human peripheral blood lymphocytes [7]. It was found that due to a temperature decrease by one degree, a number of apoptotic cells (determined by a double staining with acridine orange and ethidium bromide) increased by $(2.1 \pm 0.44)\%$ for 4.5–5 hrs. The regression analysis allowed to estimate the threshold value of temperature below which the apoptosis was activated, and it was $(22.4 \pm 0.54)^\circ\text{C}$. The authors believed that the stimulation of apoptosis of peripheral blood lymphocyte might also occur *in vivo* under a long-term cooling, thereby possibly affecting the total immune reactivity.

In human lung fibroblast cell line WI26 after storage at 25°C for 5 days the morphological changes were observed, which were preserved even a day after warming back to 37°C [20]. The cells had a rounded shape and did not attach to the substrate, which testified to apoptosis induction. Quantitative DNA analysis and [³H]-thymidine inclusion showed that the cell death occurred not at 25°C, but after their return back to normothermic conditions. The level of ERK1/2 kinase phosphorylation (the ERK signal pathway is involved in phosphorylation of p53) decreased during storage at 25°C, and increased 6–8 times in 1–2 hrs after warming. Under culture at 25°C the expression of both anti-apoptotic (Bcl-2) and pro-apoptotic (Bax) proteins in human fibroblast cell lines WI26 decreased and remained at the same level within several hours after cell returning back to normothermia. However, the Bax/Bcl-2 ratio during cold shock and soon after warming was increased, thereby indicating the apoptosis development. Due to a cold shock the total content of transmembrane mitochondrial protein Bcl-X in mRNA cells was significantly increased. The shift toward a short



наблюдался сдвиг в сторону короткой проапоптотической формы Bcl-X, который сохранялся в течение 8 ч после возвращения клеток в условия 37°C [20]. По мнению авторов, ключевую ингибирующую роль в развитии апоптоза играл белок Akt (протеинкиназа В или РКВ), являющийся серин/треонин-специфической протеинкиназой. Через сутки после холодной экспозиции уровень фосфорилирования Akt снижался, затем возвращался к начальным значениям. На основании полученных данных авторы сделали вывод, что при гипотермии запускаются проапоптотические и антиапоптотические процессы. При этом большая часть клеток погибала путем апоптоза в течение 24 ч после отогрева, что было подтверждено результатами фазово-контрастной микроскопии (рис. 1) и исследованиями на клеточном сортере с активацией флуоресценции. Аналогичные результаты, свидетельствующие об индукции апоптоза, авторы получили при проведении экспериментов на человеческих остеобластах остеосаркомы линии MG-63 [20]. Этот факт указывает на то, что апоптоз является общим клеточным ответом на гипотермию и последующий отогрев.

Относительно антиапоптотического ответа, связанного с гипотермией, следует отметить, что у разных клеточных линий он имеет свои отличительные особенности. Так, при сдвиге температуры культивирования от 37 до 30°C в течение 48 ч 87 % клеток СНО (клетки яичников китайского хомячка, *Chinese hamster ovary*) прекращали рост на стадии фазы G1, и апоптотические изменения у них начинались значительно позже по сравнению с клетками, находившимися при 37°C [19]. По мнению авторов, задержка апоптоза при холодовом шоке (30°C, 48 ч) не обусловлена общим снижением клеточного метаболизма, поскольку при температуре, близкой к 30°C, энергетические запасы клеток не уменьшаются, следовательно, в этом процессе могут быть задействованы более сложные механизмы. По данным Z. Matijasevic и соавт. [18], исследовавших механизм индуцированного холодом апоптоза, такая остановка клеточного цикла связана с активацией p53. Этот белок является транскрипционным фактором, который регулирует клеточный цикл у многоклеточных организмов и обладает апоптотической активностью [28]. Chen S.J. и соавт. [3], Ohnishi и соавт. [22] также была отмечена активация p53 при холодовом шоке.

Вероятно, холодовый шок может запускать апоптоз клеток несколькими путями. В клетках с дефицитом связанной с кинетохором серин/треонин-протеинкиназы BUB1 холодовый шок вызывал каспазозависимую митотическую гибель клеток (*caspase-independent mitotic death*, CIMD) [13]. Индукция CIMD происходит в условиях активации

pro-apoptotic form of Bcl-X was observed at 25°C, and kept for 8 hrs after cell returning back to 37°C conditions [20]. The authors believed that the Akt protein (protein kinase B or PKB), being the serine/threonine-specific protein kinase, played the key inhibitory role in apoptosis development. A day after the cold exposure the Akt phosphorylation level decreased, then returned back to the initial values. Based on data obtained the authors concluded the proapoptotic and anti-apoptotic processes to be initiated during hypothermia. Herewith most of cells died as a result of apoptosis within 24 hrs after warming, and this was confirmed by the data obtained with phase contrast microscopy and fluorescence-activated cell sorter. The experiments in human MG-63 osteosarcoma osteoblast cells gave the similar results, testifying to apoptosis induction [20]. This fact suggests the apoptosis to be a general cell response to hypothermia and following warming.

As for the hypothermia-associated anti-apoptotic response, it should be noted that in different cell lines it has its own distinctive features. For example, when the culture temperature was shifted from 37 to 30°C within 48 hrs, 87% of Chinese hamster ovary cells (CHO cells) terminated their growth at the G1 phase and the apoptotic changes in them were found much later as compared to the cells, being at 37°C [19]. The authors supposed the apoptosis delay under cold shock (30°C, 48 hrs) as not stipulated by a total decrease in cell metabolism, since at the temperature close to 30°C, the energy reserves of cells did not reduce, and more complicated mechanisms might be therefore involved into this process. As reported by Z. Matijasevic *et al.* [18], who investigated the mechanism of cold-induced apoptosis, this stop of cell cycle was associated with the activation of p53. This protein is a transcription factor, regulating cell cycle in multicellular organisms and possessing an apoptotic activity [28]. Chen S.J. *et al.* [2], Ohnishi *et al.* [22] have also noted the p53 activation following cold shock.

Probably, a cold shock may initiate the cell apoptosis by several ways. In the cells with a deficient kinetochore-bound serine/threonine-protein kinase Bub1, a cold shock caused the caspase-independent mitotic death (CIMD) of cells [13]. The CIMD induction occurs under the spindle checkpoint activation and depends on p73 protein: a homologue of p53, but not on the latter. The CIMD effectors include the apoptosis-inducing factor (AIF), a flavoprotein, regulating the permeability of mitochondrial membranes, and causing DNA fragmentation and chromatin condensation [10], and the mitochondrial endonuclease G (Endo G), which migrates into apoptotic cell nucleus during activation and performs nucleosomal DNA



контрольной точки веретена деления и зависит от белка p73 – гомолога p53, но не от последнего. Эффекторами CIMD являются фактор индукции апоптоза (*apoptosis-inducing factor*, AIF) – флавопротеин, регулирующий проницаемость митохондриальных мембран, вызывающий фрагментацию ДНК и конденсацию хроматина [10], а также митохондриальная эндонуклеаза G (Endo G), которая при активации мигрирует в ядро апоптотических клеток и осуществляет нуклеосомальную фрагментацию ДНК [15]. При полном отсутствии протеинкиназы BUB1 CIMD не индуцируется и, как следствие, развивается анеуплоидия. Авторы сделали предположение, что CIMD может быть механизмом, предотвращающим анеуплоидию клеток с неправильной сегрегацией хромосом путем индукции их гибели.

Было отмечено, что в условиях 0...10°C апоптотические изменения в клетках развиваются гораздо быстрее, чем при более высоких гипотермических температурах [7]. Холодовой шок, создаваемый путем помещения образцов в ледяную баню на 2 ч, вызывал апоптоз мышечных миелоидных клеток гранулоцитарного ряда линии 32Dcl3, который проявлялся в течение 30–90 мин после их возвращения в условия 37°C. В этот период 80–90% клеток демонстрировали признаки раннего апоптоза. Интенсивность данного процесса определяли по окрашиванию клеток аннексином V и пропидий йодидом. Кроме того, с помощью электрофореза в агарозном геле и флуоресцентной микроскопии с применением ДНК-красителя DAPI оценивали степень повреждения ДНК. Через 20 мин при 37°C отмечались сжатие клеток, конденсация ядерного материала и апоптотические пузырьки на клеточной поверхности. Развитие апоптоза было подтверждено результатами теста с окрашиванием аннексином V, который связывается с фосфатидилсеринем исключительно на наружном слое мембраны. В норме этот фосфолипид содержится только во внутреннем слое липидного рафта мембраны, поэтому его присутствие в наружном слое является одним из признаков ранней стадии апоптоза. Комбинированное окрашивание аннексином V и пропидий йодидом позволяет выявлять клетки не только на ранних, но и на поздних стадиях апоптоза, что дает возможность судить о развитии данного процесса. Примечательно, что эти изменения были выявлены практически одновременно во всех клетках после их возвращения в условия нормотермии. Так, в начале периода отогрева практически 100% клеток не окрашивались ни одним из красителей, но уже через 30 мин при 37°C 82% клеток были окрашены аннексином V, что свидетельствовало о запуске процесса апоптоза. Через 90 мин при 37°C количество аннексин V-положительных клеток

фрагментация [15]. If protein kinase BUB1 is absent, the CIMD is not induced and, as a consequence, the aneuploidy develops. The authors assumed, that CIMD could underlie the preventing aneuploidy of cells with failed chromosome segregation through inducing their death.

It was noted that under 0...10°C the apoptotic changes in cells developed much rapidly than at higher hypothermic temperatures [6]. The cold shock as a result of placing samples into an ice bath for 2 hrs caused apoptosis of murine myeloid cell of 32Dcl3 line, and it was manifested within 30–90 min after their return back to 37°C conditions. Within this period 80–90% of cells showed signs of early apoptosis. The process intensity was assessed by cell staining with annexin V and propidium iodide. In addition, the DNA damage rate was assessed by agarose gel electrophoresis and fluorescence microscopy using a DAPI DNA stain. The cell shrinkage, nuclear content condensation and apoptotic vesicles appearance on cell surface were observed 20 min later at 37°C. The apoptosis development was confirmed by the Annexin V staining, which bound phosphatidylserine exclusively on the outer membrane layer. Normally this phospholipid is located only in inner layer of membrane lipid raft, therefore its presence in an outer one is one of the signs of early stage of apoptosis. A combined staining with Annexin V and propidium iodide enables detecting the cells not only at early, but at late stages of apoptosis as well, that makes possible to estimate the process development. Of note is the fact, that these changes were revealed almost simultaneously in all the cells after their return back to normothermic conditions. In particular, at the beginning of warming period, almost 100% of cells were not stained with any of dyes, but 30 min later at 37°C 82% of cells were stained with Annexin V, thereby testifying to the apoptosis initiation. The amount of Annexin V⁺ cells was 92% in 90 min at 37°C, but they were still propidium iodide-negative. In 5 hrs after warming the nuclei of 37% of cells were stained with propidium iodide, which was capable to penetrate only into the cells, being at the late apoptosis stage, and 24 hrs later at 37°C 98% of cells were at late apoptosis/secondary necrosis stage (Annexin V⁺/propidium iodide⁺). An internucleosomal cleavage of chromatin and caspase activation also indicated the apoptosis induction after a cold shock. In this case a fluorochrome-labelled inhibitor of caspases (FLICA) was used to investigate the pathway of apoptosis realisation. After a 60-min long warming the caspase activation was observed in 75% of cells, thereby indicating a caspase-dependent nature of cold-induced apoptosis. This was confirmed by the fact that in 2, 4 and 24 hrs after warming there

составляло 92%, но еще оставались пропидий йодид-отрицательными. Через 5 ч после отогрева у 37% клеток ядра окрашивались пропидий йодидом, который способен проникать лишь в клетки, находящиеся на поздних стадиях апоптоза, а через 24 ч при 37°C на стадии позднего апоптоза/вторичного некроза находились 98% клеток (аннексин V-положительные/пропидиум йодид-положительные). Межнуклеосомное расщепление хроматина и активация каспазы также указывали на индукцию апоптоза после холодового шока. В данном случае для исследования пути реализации апоптоза был применен конъюгированный с флуорохромом ингибитор каспаз (метод FLICA). После 60-минутного отогрева активацию каспаз наблюдали у 75% клеток, что свидетельствовало о каспазозависимом характере индуцированного холодом апоптоза. Этот факт подтверждается тем, что через 2, 4 и 24 ч после отогрева в образцах с добавлением ингибитора каспаз апоптотические клетки отсутствовали. Анализ ДНК, выделенной из мышинных миелоидных клеток линии 32Dcl3, подверженных холодовому воздействию и последующему отогреву, показал, что межнуклеосомное расщепление хроматина происходило уже через 2 ч после начала отогрева [7]. Аналогичные результаты были получены при исследовании клеток нейробластомы мыши [26]. Анализ ДНК после часовой инкубации образцов на ледяной бане подтвердил развитие апоптоза. Не исключено, что холодовой шок может индуцировать запрограммированную гибель этого типа клеток несколькими путями. Результаты анализа показателя выживаемости, уровня экспрессии каспазы 3 (установленного методом Вестерн-блоттинга) и фрагментации ДНК (данные анализа ДНК-лэддера), проведенного D. Carpenter и соавт. [2], также подтвердили холод-индуцированный характер апоптоза клеток мышинной нейробластомы линии C1300. Следует отметить, что при проведении экспериментов на других клеточных линиях (гепатоциты и эндотелиальные клетки печени) были получены подобные результаты, но с меньшей воспроизводимостью [24]. В 90-х годах U. Rauen и соавт. [24] показали, что при хранении в течение 48 ч при 4°C апоптозу подвергались (90 ± 5)% гепатоцитов и эндотелиальных клеток печени. При этом установлено, что частота и степень индуцированного холодом апоптоза *in vitro* зависели от длительности пребывания клеток в условиях охлаждения. Так, выход лактатдегидрогеназы (ЛДГ) из гепатоцитов после 6 ч хранения в холоде составлял около 20% и увеличивался до 40% после возвращения клеток в условия нормотермии. В образцах, подвергнутых 12-часовому хранению, данный показатель был на уровне 40% и повышался до 70% после отогрева, а через 24 ч

were no apoptotic cells in the caspase inhibitor-supplemented samples. The analysis of DNA isolated from the murine myeloid cell of 32Dcl3 line, subjected to cold exposure and subsequent warming showed an occurrence of internucleosomal cleavage of chromatin already in 2 hrs after warming [6]. The similar observations were made in the murine neuroblastoma cells [26]. The DNA analysis after 1-hour incubation of the samples in an ice bath confirmed the apoptosis development. It is not possible that a cold shock may induce a programmed death in this type of cells through several pathways. The findings of D. Carpenter *et al.* on the survival index, caspase 3 expression level (revealed by the Western blotting procedure) and DNA fragmentation (DNA ladder analysis data), have also confirmed the cold-induced character of apoptosis in mouse neuroblastoma C1300 cells [1]. It should be noted that the experiments in other cell lines (hepatocytes and liver endothelial cells) [24] gave the similar results, but with lower reproducibility. In the 1990s U. Rauen *et al.* [24] showed that (90 ± 5)% of hepatocytes and liver endothelial cells underwent apoptosis during storage for 48 hrs at 4°C. Herewith the frequency and degree of cold-induced apoptosis *in vitro* depended on duration of cell stay under cooling. In particular, the lactate dehydrogenase (LDH) release from hepatocytes after 6-hour-long storage in cold was about 20% and increased up to 40% after the cells returned back to normothermic conditions. In the samples, underwent a 12-hour storage, this index was at 40% level, and increased up to 70% after warming, and in 24 hrs in the warmed cells it made 80–90% [23]. Of note is the fact that after warming the cells, stored hypothermically, the manifestation of apoptosis increased. According to the data of U. Rauen *et al.* [24] the same pattern was observed for liver endothelial cells as well: the LDH release after a 24-hour cell incubation at 4°C was about 40%, and after their warming up to 37°C it was 75%. The described changes were accompanied by the appeared cytomorphological features, characteristic of apoptosis, such as formation of apoptotic bodies and chromatin condensation [24]. An increased content of hydroxyl radicals and other reactive oxygen species due to disorders in oxidative phosphorylation processes was established to be one of the causes in cell damage under hypothermic storage. In all the cells exposed to hypothermia and warming, a number of reactive oxygen species gradually increased and an oxidative stress developed, that was supposed by I. Nicoletti *et al.* [21] as a reason of DNA damage and apoptosis initiation. The similar findings were obtained by another group of scientists [27], who studied an anti-apoptotic effect of Bcl-2 after its introduction as an exogenous antioxidant to the HL-60



у отогретых клеток он составлял 80–90% [23]. Следует отметить, что после отогрева клеток, хранившихся в условиях гипотермии, степень проявления апоптоза увеличивалась. По данным U. Rauен и соавт. [24] такая же закономерность была отмечена и для эндотелиальных клеток печени: выход ЛДГ после 24-часовой инкубации клеток при 4°C составлял около 40%, а после их отогрева при 37°C – 75%. Описанные изменения сопровождались появлением характерных для апоптоза цитоморфологических признаков: образование апоптотических телец и конденсация хроматина [24]. Установлено, что одной из причин повреждения клеток при гипотермическом хранении является увеличение количества гидроксильных радикалов и других активных форм кислорода вследствие нарушений процессов окислительного фосфорилирования. Во всех клетках, подверженных воздействию гипотермии-отогреву, постепенно увеличивалось количество активных форм кислорода и развивался окислительный стресс, который, по предположению I. Nicoletti и соавт. [21], приводит к повреждению ДНК и инициации апоптоза. Подобные результаты были получены и другой группой ученых [27], которые изучали антиапоптотическое действие Bcl-2 после его добавления в качестве экзогенного антиоксиданта к культивируемым при комнатной температуре промиелоцитарным лейкемическим клеткам линии HL-60. J.H. Kim и соавт. [12] показали, что один из основных антиоксидантов – пероксиредоксин 1 человека (hPrx1) – проявлял активность РНК-шаперона и ингибировал как апоптоз, индуцированный биохимическими агентами (например, aFAS, TNF- α), так и апоптоз, вызванный снижением температуры. A. Khar и соавт. [11] была выявлена способность hPrx1 к детоксикации пероксидов. В условиях *in vitro* hPrx1 связывается с РНК и ДНК и раскручивает дуплексы нуклеиновых кислот. При понижении температуры общее содержание hPrx1 в клетке не увеличивается, а в ядре повышается. Кроме того, при холодовом шоке избыточная экспрессия hPrx1 способствует повышению показателя выживаемости клеток, в то время как нокадаун гена hPrx1 в этих же условиях существенно его снижает.

R. Grand и соавт. [8] показали, что экспозиция клеток лимфомы Беркитта при 4°C вызывала экспрессию специфического белка апоптоза ASP и сопровождалась фрагментацией ДНК, высвобождением цитохрома С. При помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии данный белок был выявлен в цитоплазме клеток с типичными для апоптоза признаками – конденсация и фрагментация хроматина. При этом в жизнеспособных и пассивно умирающих клетках после продолжительной холодовой экспозиции путем некроза, ASP не обнаруживался.

promyelocytic leukemia cells, cultured at room temperature. J.H. Kim *et al.* [12] showed one of the main antioxidants, *i. e.* human peroxiredoxin 1 (hPrx1) to manifest the RNA-chaperone activity and inhibit both biochemical agents-induced apoptosis (*e. g.* aFAS, TNF- α), and that caused by temperature decrease. A. Khar *et al.* [11] revealed the capability of hPrx1 to detoxify peroxides. Under *in vitro* conditions the hPrx1 binds to RNA and DNA and untwists nucleic acid duplexes. Under temperature decrease no rise in the total hPrx1 content in cell occurs, but its increase in nucleus is present. In addition, cold shock is accompanied with an excessive expression of hPrx1 promoting an increase in cell survival rate, while the hPrx1 gene knockdown significantly reduces it under the same conditions.

R. Grand *et al.* [8] showed an exposure of Burkitt's lymphoma cells at 4°C to cause the expression of an apoptotic specific protein ASP and being accompanied by DNA fragmentation and cytochrome C release. Using laser scanning confocal microscopy this protein was detected in cytoplasm of cells with characteristic signs of apoptosis such as chromatin condensation and fragmentation. Herewith in viable cells and those, passively dying after a prolonged cold exposure through necrosis, no ASP was revealed.

Z. Zhang *et al.* [30] reported about the expression of the Bcl-2 anti-apoptotic protein in rat hippocampal neurons, subjected to a 10-min forebrain ischemia, under normothermia (37°C) and moderate hypothermia (33°C). A number of Bcl-2-positive neurons was higher in the rats, ischemized at 33°C, as compared to those, ischemized at 37°C and in the intact animals. The expression level of apoptosis-inducing Bax, which binds to Bcl-2 and thereby blocks the action of the latter, did not differ in brain neurons of rats from the intact group and those subjected to moderate hypothermia, and in the rats under normothermic conditions it was significantly lower. Under moderate hypothermia the neuron survival after ischemia was significantly higher than that after 37°C ischemia (90 vs. 53%, respectively). The results of electron microscopy also confirmed the presence of a greater number of apoptotic cells in the rats underwent cerebral ischemia at 37°C.

Nowadays the mammalian nerve cells were established to contain a special cold-inducible RNA-binding protein (CIRP), being expressed in response to a moderate cooling (30...32°C). It is capable to prevent the oxidative stress-induced apoptosis development due to hypothermic effect on cells [14, 17]. The CIRP protein is of interest of the scientists mainly in terms of its protective effect in oxidative stress, since opening the prospect of its use as a new neuroprotective agent in neurology [17]. The findings on a pro-



Z. Zhang и соавт. [30] сообщили об экспрессии в условиях нормотермии (37°C) и умеренной гипотермии (33°C) антиапоптотического белка Bcl-2 в нейронах гиппокампа крыс, подвергнутых 10-минутной ишемии переднего мозга. У крыс, ишемизированных при 33°C, Bcl-2-позитивных нейронов было больше, чем в условиях 37°C и у интактных животных. Уровень экспрессии индуцирующего апоптоз Bax, который, связываясь с Bcl-2, блокирует действие последнего, в нейронах мозга крыс интактной группы и крыс, подвергнутых умеренной гипотермии, не отличался, а у крыс, находившихся в условиях нормотермии, он был значимо ниже. При умеренной гипотермии выживаемость нейронов после ишемии была значительно выше, чем после ишемии при температуре 37°C (90 против 53% соответственно). Результаты электронной микроскопии также подтвердили, что у крыс, подвергавшихся ишемии мозга при 37°C, присутствовало большее количество апоптотических клеток.

В настоящее время установлено, что нервные клетки млекопитающих содержат особый холод-индуцибельный РНК-связывающий белок (*cold-inducible RNA-binding protein*, CIRP), экспрессирующийся в ответ на умеренное охлаждение (30...32°C). Он способен предотвращать развитие апоптоза, индуцированного окислительным стрессом вследствие гипотермического воздействия на клетки [14, 17]. Белок CIRP интересует ученых преимущественно в аспекте его защитного эффекта при окислительном стрессе, поскольку это открывает перспективу его применения в неврологии в качестве нового нейропротектора [17]. Результаты исследований защитного действия CIRP могут быть применены и в области криобиологии, так как накопление в клетках активных форм кислорода является одной из причин развития апоптоза при гипотермическом воздействии. Попытку определить роль CIRP в регуляции апоптоза нейронов при гипотермии предприняли S. Li и соавт. [16]. С этой целью первичные кортикальные нейроны крыс трансдуцировали лентивирусным вектором, несущим ген CIRP, и культивировали при 32°C (контроль – при 37°C). Перекисью водорода в клетках индуцировали апоптоз, после чего определяли его уровень методом проточной флуориметрии с использованием маркеров Hoechst 33342 и Аннексин V-FITC/пропидиум бромид, а также по активности каспазы 3. Методом вестерн-блоттинга было установлено, что уровень CIRP в кортикальных нейронах после инкубации при 32°C был значительно выше, а экспрессия активированной каспазы 3 ниже, чем в клетках, инкубированных в условиях нормотермии. Уровень апоптоза нейронов, культивированных при 32°C, был ниже по сравнению с клетками, культивированными

protective effect of CIRP may be also applied in cryobiology, since the accumulation of reactive oxygen species in cells is one of the reasons of apoptosis development under hypothermic exposure. S. Li *et al.* [16] studied the role of CIRP in regulating apoptosis of neurons under hypothermia. For this purpose the rat primary cortical neurons were transduced with a lentiviral vector, bearing CIRP gene and cultured at 32°C (37°C for the control). The apoptosis in cells was induced by hydrogen peroxide, then its level was determined using flow cytometry with the Hoechst 33342 and Annexin V-FITC/propidium bromide dyes, as well as by caspase 3 activity. Using the Western blotting procedure the CIRP level in cortical neurons after 32°C incubation was established to be significantly higher, but the expression of activated caspase 3 was lower, than in the cells incubated under normothermia. The apoptosis level in the neurons, cultured at 32°C was lower as compared to the cells cultured at 37°C (4.5 ± 0.8 vs. 53.5 ± 1.7 %). Thus, under hypothermia the CIRP caused a neuroprotective effect. The authors established the murine neuroblastoma cells after 2-hour incubation with CIRP to be more resistant to subsequent treatment with hydrogen peroxide as compared to the CIRP-free incubated cells and to have a higher viability within 24 hrs. In addition, the preincubation of cultured murine neuroblastoma cells with CIRP promoted an accelerated development of cell cycle from S to G2/M phase and an increased amount of phosphorylated Akt, involved in apoptosis inhibiting. J. Li *et al.* [14] have studied the mechanism of a protective effect of CIRP. For this purpose the cells of the standard culture of rat hippocampal neurons, the CIRP overexpressed neurons and CIRP knockdowned cells were cultured under moderate hypothermia (32°C). Then the level of apoptosis was assessed by annexin V-FITC/propidium iodide staining as well as redox metabolism estimated (superoxide dismutase (SOD) activity, malonic dialdehyde (MDA) and hydroperoxides (HP) contents, total antioxidant activity) were. The findings showed the CIRP content under hypothermia in the standard culture cells and in those with CIRP overexpression to be significantly higher, and the apoptosis level to be significantly lower as compared to the control cells, cultured at 37°C. In the CIRP knockdowned cells the level of apoptosis under hypothermia was higher as compared to the standard culture. The authors established the SOD activity, HP content and total antioxidant capacity to be significantly higher in the standard culture and the cells with overexpressed CIRP under hypothermia (32°C), than in the standard culture cells under normothermia (37°C), but in the CIRP knockdown cells these values were lower both at 32



при 37°C ((4,5 ± 0,8) против (53,5 ± 1,7)%). Таким образом, в условиях гипотермии CIRP оказывал нейрозащитное действие. Авторы установили, что клетки нейробластомы мышцы после 2-часовой инкубации с CIRP были более устойчивы к последующей обработке перекисью водорода по сравнению с клетками, инкубированными без CIRP, и имели более высокую жизнеспособность в течение 24 ч. Кроме того, предынкубация культивируемых клеток нейробластомы мышцы с CIRP способствовала ускоренному развитию клеточного цикла от S до G2/M фазы и увеличению количества фосфорилированного Akt, участвующего в ингибировании процесса апоптоза. J. Li и соавт. [14] исследовали механизм защитного действия CIRP. Для этого клетки стандартной культуры нейронов гиппокампа крысы, нейроны со сверхэкспрессией CIRP и CIRP-нокдаун-клетки культивировали в условиях умеренной гипотермии (32°C). Затем с помощью окрашивания аннексином V-FITC/пропидий йодидом определяли уровень апоптоза, а также уровень окислительно-восстановительного метаболизма (активность супероксиддисмутазы (СОД), содержание малонового диальдегида (МДА) и гидроперекисей (ГП), общая мощность антиоксидантной системы). Результаты исследований показали, что при гипотермии содержание CIRP в клетках стандартной культуры и клетках со сверхэкспрессией CIRP было статистически значимо выше, а уровень апоптоза – значимо ниже по сравнению с контрольными клетками, культивируемыми при 37°C. В CIRP-нокдаун-клетках уровень апоптоза при гипотермии был выше по сравнению со стандартной культурой. Авторами установлено, что в стандартной культуре и клетках со сверхэкспрессией CIRP при гипотермии (32°C) активность СОД, содержание ГП и общая мощность антиоксидантной системы были значительно выше, чем у клеток стандартной культуры при нормотермии (37°C), а у CIRP-нокдаун клеток эти показатели были ниже как при 32°C, так и при 37°C. В то же время концентрация малонового диальдегида – одного из основных маркеров перекисного окисления липидов – у CIRP-нокдаун клеток и клеток стандартной культуры при 37°C была существенно выше, что свидетельствовало о развитии оксидативного стресса. На основании полученных результатов авторы заключили, что CIRP способен ингибировать апоптоз нейронов гиппокампа крыс посредством подавления образования свободных радикалов кислорода при гипотермии [14]. Кроме того высказано предположение [29], что данный холод-индуцибельный белок при низких температурах способствует экспрессии специфических белков (например, тиоредоксина TRX), предотвращающих развитие окислительного стресс-

and 37°C. At the same time, the concentration of malonic dialdehyde, one of the main markers of lipid peroxidation, in CIRP knockdown cells and those of the standard culture at 37°C was significantly higher, thereby indicating the oxidative stress development. Based on the data obtained the authors concluded the CIRP as capable to inhibit apoptosis of rat hippocampal neurons by suppressing the free oxygen radical formation under hypothermia [14]. In addition, there was suggested [29] that this cold-inducible protein at low temperatures promoted the expression of specific proteins (e. g. thioredoxin TRX), preventing oxidative stress development and inhibiting signalling pathways of apoptosis, which ensured a rapid adaptation of cells to changing environmental conditions.

Studying the cold induction mechanism of apoptosis revealed the new evidence that both anti- and pro-apoptotic factors were involved in this process. For example, A.L. Ferry *et al.* [3] induced the skeletal myoblast apoptosis with staurosporin and showed the overexpression of cold shock protein RBM3 (RNA-binding motif protein 3) due to cold effect or temporary transfection as correlating with a decrease in morphological change rate, preventing membrane potential collapse and increasing the cell viability rate. Under RBM3 overexpression the activity of caspases 3, 8 and 9, increased due to the staurosporin treatment returned back to the norm.

D. Fisher and A. McLennan [4], investigated the role of pro-apoptotic fragile histidine triad protein (Fhit): enzyme of purine metabolism in cold-induced apoptosis development in HEK293 cancer cell line, showed a correlation between the apoptosis intensity and the diadenosine triphosphate content, being the Fhit substrate.

Guedez *et al.* [9] established the cold shock-induced apoptosis development to be possibly suppressed by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1). The Burkitt's lymphoma cell lines, expressing TIMP-1, are resistant to cold shock apoptosis. In addition, the activation of TIMP-1 resulted in induction of Bcl-XL expression (but not Bcl-2) and a decreased activity of universal transcription factor NF-κB as compared to the control.

Obviously, the survival of cold-resistant organisms under hypothermia is determined by the capability of their cells to resist the cold-induced apoptosis. C.C. Fleck *et al.* [5] obtained the data indicating an increased expression of anti-apoptotic proteins in hibernating ground squirrels, which ensured the survival of enterocytes in apoptosis-inducing oxidative environment [5]. No 'ladder' pattern, characteristic of apoptosis was found using DNA electrophoresis of mucosal cells. In cell nuclei of hibernating ground

са и ингибирующих сигнальные пути апоптоза, что обеспечивает быструю адаптацию клеток к изменениям условий окружающей среды.

При изучении механизма индукции апоптоза холодом были получены новые доказательства участия в этом процессе как анти-, так и проапоптотических факторов. Так A.L. Ferry и соавт. [4] индуцировали апоптоз скелетных миобластов стауроспорином и показали, что сверхэкспрессия белка холодового шока RBM3 (*RNA-binding motif protein 3*) в результате действия холода или временной трансфекции коррелировала с уменьшением степени морфологических изменений, предотвращала коллапс мембранного потенциала и повышала показатель жизнеспособности клеток. В условиях сверхэкспрессии RBM3 активность каспаз 3, 8 и 9, повышенная в результате обработки стауроспорином, возвращалась к норме.

D. Fisher и A. McLennan [5], которые исследовали роль проапоптотического белка ломкой гистидиновой триады (*fragile histidine triad protein, Fhit*) – фермента метаболизма пуринов в развитии холодоиндуцированного апоптоза в опухолевых клетках линии HEK293, показали корреляцию между интенсивностью апоптоза и содержанием диаденозина трифосфата, являющегося субстратом Fhit.

L. Guedez и соавт. [9] установили, что развитие апоптоза, вызванное холодовым шоком, может быть подавлено тканевым ингибитором металлопротеиназ (TIMP-1). Клеточные линии лимфомы Беркитта, экспрессирующие TIMP-1, устойчивы к апоптозу холодового шока. Кроме того, активация TIMP-1 приводила к индукции экспрессии Bcl-XL (но не Bcl-2) и снижению активности универсального фактора транскрипции NF-κB по сравнению с контролем.

Очевидно, что выживание холодоустойчивых организмов в условиях гипотермии определяется способностью их клеток противостоять апоптозу, индуцированному действием холода. С.С. Fleck и соавт. [6] получили данные, свидетельствующие о повышении у гибернирующих сусликов экспрессии антиапоптотических белков, которые обеспечивают выживание эритроцитов в апоптоз-индуцирующей оксидативной среде [6]. Методом электрофореза ДНК клеток слизистой оболочки типичная для апоптоза картина «лестницы» не была обнаружена. В ядрах клеток гибернирующих сусликов уровень апоптотического белка Bax был ниже, чем у активных «летних» особей. При этом во время гибернации повышались уровни как антиапоптотического белка Bcl-x(L), так проапоптотического белка Bax, но если содержание первого увеличивалось в 12 раз, то второго – только в 2 раза, что обуславливало превалирование передачи антиапоп-

squirrels the level of apoptotic protein Bax was lower than in active ‘summer’ species. Herewith during hibernation the levels of both anti-apoptotic protein Bcl-x (L) and pro-apoptotic Bax protein increased, but if the content of the first was 12-fold, the content of the second one increased only twice, which stipulated the predominance of anti-apoptotic signal transmission. The caspase 3 activity during periodic arousals of ground squirrels in winter was lower

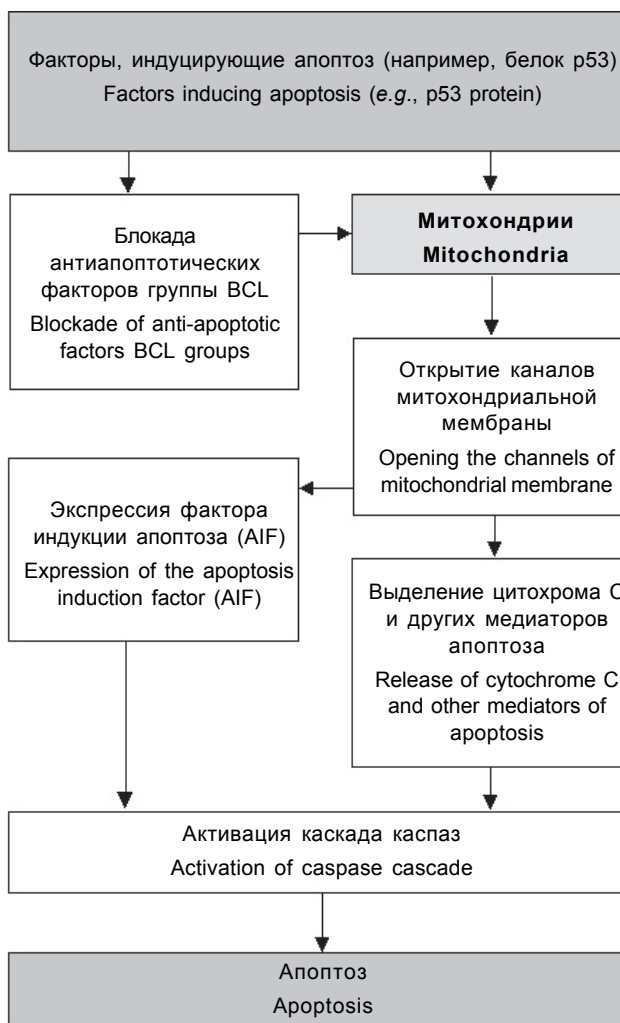


Рис. 2. Митохондриальный механизм апоптоза клетки.
Fig. 2. Mitochondrial cell apoptosis mechanism.

than in summer. During hibernation the Akt expression was 20-fold increased. In addition, the content of phosphorylated form of anti-apoptotic factor Bcl-2 augmented during hibernation.

Thus, proceeding from the available experimental findings we may suggest both pro-apoptotic and anti-apoptotic processes to be triggered during hypothermic exposure on cells. Depending on cell type, a tem-



тотического сигнала. Активность каспазы 3 при периодических пробуждениях сусликов зимой была ниже, чем летом. Во время гибернации в 20 раз повышалась экспрессия Akt. Кроме того, при гибернации повышалось содержания фосфорилированной формы антиапоптотического фактора Bcl-2.

Таким образом, на основании имеющихся экспериментальных данных можно заключить, что во время гипотермического воздействия на клетки запускаются и проапоптотические, и антиапоптотические процессы. В зависимости от типа клеток снижение температуры может приводить как к стимуляции, так и к ингибированию процесса апоптоза. Для большинства клеток индукция апоптоза, очевидно, является типичным ответом на охлаждение и последующее возвращение в условия нормотермии. Однако в некоторых типах клеточных культур, а также в клетках холодоадаптированных животных при температуре ниже физиологической содержание проапоптотических факторов не увеличивается, а, напротив, происходит ингибирование апоптоза или остановка клеточного цикла в фазе «гибернации» (G0). Последние исследования показали, что индуцированный гипотермией и последующим отогревом клеток апоптоз развивается по внутреннему (митохондриальному), а не по внешнему (рецептор-зависимому) пути в отличие от индуктивного апоптоза (рис. 2). Одной из причин повреждений клеток при гипотермическом хранении может быть оксидативный стресс, являющийся результатом увеличения количества гидроксильных радикалов и других активных форм кислорода. В связи с этим ведется поиск факторов, способных при охлаждении и последующем возвращении в условия нормотермии влиять на уровень окислительно-восстановительного метаболизма клеток, т. е. повышать активность супероксиддисмутазы, снижать содержание малонового диальдегида и гидроперекисей при увеличении общей мощности антиоксидантной системы.

Литература

1. Герасимов И.Г., Игнатов Д.Ю., Хадарцев А.А., Яшин А.А. Индукция апоптоза лимфоцитов периферической крови человека комнатной температурой *in vitro* // Вестник мед. технологий. – 2007. – Т. 14, №4. – С. 159.
2. Carpenter D., Hsiang C., Brown D.J. et al. Stable cell lines expressing high levels of the herpes simplex virus type 1 LAT are refractory to caspase 3 activation and DNA laddering following cold shock induced apoptosis // *Virology*. – 2007. – Vol. 369, №1. – P. 12–18.
3. Chen S.J., Lin P.W., Lin H.P. et al. UV irradiation/cold shock-mediated apoptosis is switched to bubbling cell death at low temperatures // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6, №10. – P. 8007–8018.

perature decrease may result in both stimulation and inhibition of apoptosis. For the most cells the induction of apoptosis is obviously a typical response to cooling and subsequent return back to normothermia. However, in some types of cell cultures, as well as in cells of cold-adapted animals at a temperature below the physiological one the content of pro-apoptotic factors does not increase, but, on the contrary, the apoptosis is inhibited or the cell cycle is stopped in the 'hibernation' phase (G0). The recent studies have shown the apoptosis, induced by hypothermia and subsequent cell warming to develop by the inner (mitochondrial) pathway, but not the outer (receptor-dependent) one in contrast to the instructive apoptosis (Fig. 2). One of the causes of cell damages during hypothermic storage may be an oxidative stress, resulting from an increased number of hydroxyl radicals and other reactive oxygen species. Due to this fact the scientists are in progress now with searching for the factors, capable to affect the level of redox cell metabolism during cooling and subsequent returning back to normothermic conditions, *i. e.* to augment the superoxide dismutase activity, reduce the malonic dialdehyde and hydroperoxide contents with increasing the total antioxidant capacity.

References

1. Carpenter D., Hsiang C., Brown D.J. et al. Stable cell lines expressing high levels of the herpes simplex virus type 1 LAT are refractory to caspase 3 activation and DNA laddering following cold shock induced apoptosis. *Virology* 2007; 369(1): 12–18.
2. Chen S.J., Lin P.W., Lin H.P. et al. UV irradiation/cold shock-mediated apoptosis is switched to bubbling cell death at low temperatures. *Oncotarget* 2015; 6(10): 8007–8018.
3. Ferry A.L., Vanderklish P.W., Dupont-Versteegden E.E. Enhanced survival of skeletal muscle myoblasts in response to overexpression of cold shock protein RBM3. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 301(2): 392–402.
4. Fisher D.I., McLennan A.G. Correlation of intracellular diadenosine triphosphate (Ap3A) with apoptosis in Fhit-positive HEK293 cells. *Cancer Lett* 2008; 259(2): 186–191.
5. Fleck C.C., Carey H.V. Modulation of apoptotic pathways in intestinal mucosa during hibernation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289(2): R586–R595.
6. Fransen J.H., Dieker J.W., Hilbrands L.B. et al. Synchronized turbo apoptosis induced by cold-shock. *Apoptosis* 2011; 16(1): 86–93.
7. Gerasimov I.G., Ignatov D.Yu., Khadartsev F.F., Yashin A.A. The induction of lymphocytes apoptosis of human peripheric blood of room temperature *in vitro*. *Vestnik Novykh Meditsynskikh Tekhnologiy* 2007; 14(4): 159.
8. Grand R.J., Milner A.E., Mustoe T. et al. A novel protein expressed in mammalian cells undergoing apoptosis. *Exp Cell Res* 1995; 218(2): 439–451.



4. Ferry A.L., Vanderklish P.W., Dupont-Versteegden E.E. Enhanced survival of skeletal muscle myoblasts in response to over-expression of cold shock protein RBM3. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2011. – Vol. 301, № 2. – P. 392–402.
5. Fisher D.I., McLennan A.G. Correlation of intracellular diadenosine triphosphate (Ap3A) with apoptosis in Fhit-positive HEK293 cells // *Cancer Lett.* – 2008. – Vol. 259, №2. – P. 186–191.
6. Fleck C.C., Carey H.V. Modulation of apoptotic pathways in intestinal mucosa during hibernation // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2005. – Vol. 289, №2. – P. R586–R595.
7. Fransen J.H., Dieker J.W., Hilbrands L.B. et al. Synchronized turbo apoptosis induced by cold-shock // *Apoptosis.* – 2011. – Vol. 16, №1. – P. 86–93.
8. Grand R.J., Milner A.E., Mustoe T. et al. A novel protein expressed in mammalian cells undergoing apoptosis // *Exp. Cell Res.* – 1995. – Vol. 218, №2. – P. 439–451.
9. Guedez L., Stetler-Stevenson W.G., Wolff L. et al. In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1 // *J. Clin. Invest.* – 1998. – Vol. 102, №11. – P. 2002–2010.
10. Joza N., Pospisilik J.A., Hangen E. et al. AIF: not just an apoptosis-inducing factor // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2009. – Vol. 1171. – P. 2–11.
11. Khar A., Pardhasaradhi B.V., Ali A.M., Kumari A.L. Protection conferred by Bcl-2 expression involves reduced oxidative stress and increased glutathione production during hypothermia-induced apoptosis in AK-5 tumor cells // *Free Radical. Biol. Med.* – 2003. – Vol. 35, №8. – P. 949–957.
12. Kim J.H., Lee J.M., Lee H.N. et al. RNA-binding properties and RNA chaperone activity of human peroxiredoxin 1 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2012. – Vol. 425, №4. – P. 730–734.
13. Kitagawa K., Niihara Y. Caspase-independent mitotic death (CIMD) // *Cell Cycle.* – 2008. – Vol. 7, №8. – P. 1001–1005.
14. Li J.-H., Zhang X., Meng Y. et al. Cold inducible RNA-binding protein inhibits hippocampal neuronal apoptosis under hypothermia by regulating redox system // *Acta Physiologica Sinica.* – 2015. – Vol. 67, №4. – P. 386–392.
15. Li L.Y., Luo X., Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria // *Nature.* – 2001 – Vol. 412, №6842. – P. 95–99.
16. Li S., Zhang Z., Xue J. et al. Cold-inducible RNA binding protein inhibits H₂O₂-induced apoptosis in rat cortical neurons // *Brain Res.* – Vol. 1441. – P. 47–52.
17. Liu J., Xue J., Zhang H. et al. Cloning, expression, and purification of cold inducible RNA-binding protein and its neuroprotective mechanism of action // *Brain Res.* – 2015. – Vol. 1597. – P. 189–195.
18. Matijasevic Z., Snyder J.E., Ludlum D.B. Hypothermia causes a reversible, p53-mediated cell cycle arrest in cultured fibroblasts // *Oncol. Res.* – 1998. – Vol. 10, №11–12. – P. 605–610.
19. Moore A., Mercer J., Dutina G. et al. Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch cultures // *Cytotechnology.* – 1997. – Vol. 23, №1–3. – P. 47–54.
20. Neutelings T., Lambert C.A., Nussgens B.V. et al. Effects of mild cold shock (25°C) followed by warming up at 37°C on the cellular stress response // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, №7. – e69687.
21. Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M.C. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry // *J. Immunol. Methods.* – 1991. – Vol. 139, №2. – P. 271–279.
22. Ohnishi T., Wang X., Ohnishi K. et al. p53-dependent induction of WAF1 by heat treatment in human glioblastoma cells // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271, №24. – P. 14510–14513.
23. Ohnishi T., Wang X., Ohnishi K. et al. p53-dependent induction of WAF1 by heat treatment in human glioblastoma cells. *J Biol Chem* 1996; 271(24): 14510–14513.
24. Guedez L., Stetler-Stevenson W.G., Wolff L. et al. In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest* 1998; 102(11): 2002–2010.
25. Joza N., Pospisilik J.A., Hangen E et al. AIF: not just an apoptosis-inducing factor. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1171: 2–11.
26. Khar A., Pardhasaradhi B.V., Ali A.M., Kumari A.L. Protection conferred by Bcl-2 expression involves reduced oxidative stress and increased glutathione production during hypothermia-induced apoptosis in AK-5 tumor cells. *Free Radical Biol Med* 2003; 35(8): 949–957.
27. Kim J.H., Lee J.M., Lee H.N. et al. RNA-binding properties and RNA chaperone activity of human peroxiredoxin 1. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 425(4): 730–734.
28. Kitagawa K., Niihara Y. Caspase-independent mitotic death (CIMD). *Cell Cycle* 2008; 7(8): 1001–1005.
29. Li J.-H., Zhang X., Meng Yu. et al. Cold inducible RNA-binding protein inhibits hippocampal neuronal apoptosis under hypothermia by regulating redox system. *Acta Physiologica Sinica* 2015; 67(4): 386–392.
30. Li L.Y., Luo X., Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001; 412(6842): 95–99.
31. Li S., Zhang Z., Xue J. et al. Cold-inducible RNA binding protein inhibits H₂O₂-induced apoptosis in rat cortical neurons. *Brain Res* 2012; 1441: 47–52.
32. Liu J., Xue J., Zhang H. et al. Cloning, expression, and purification of cold inducible RNA-binding protein and its neuroprotective mechanism of action. *Brain Res* 2015; 1597: 189–195.
33. Matijasevic Z., Snyder J.E., Ludlum D.B. Hypothermia causes a reversible, p53-mediated cell cycle arrest in cultured fibroblasts. *Oncol Res* 1998; 10(11–12): 605–610.
34. Moore A., Mercer J., Dutina G. et al. Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch cultures. *Cytotechnology* 1997; 23(1–3): 47–54.
35. Neutelings T., Lambert C.A., Nussgens B.V. et al. Effects of mild cold shock (25°C) followed by warming up at 37°C on the cellular stress response. *PLoS One* 2013; 8(7): e69687.
36. Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M.C. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991; 139(2): 271–279.
37. Ohnishi T., Wang X., Ohnishi K. et al. p53-dependent induction of WAF1 by heat treatment in human glioblastoma cells. *J Biol Chem* 1996; 271(24): 14510–14513.



23. Rauen U., Petrat F., Tongju L.I. et al. Hypothermia injury/cold-induced apoptosis-evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O₂-/H₂O₂ formation // FASEB Journal. – 2000. – Vol. 14, №13. – P. 1953–1964.
24. 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. – Vol. 13, №1. – P. 155–168.
25. Sakurai T., Itoh K., Liu Y. et al. Low temperature protects mammalian cells from apoptosis initiated by various stimuli in vitro // Exp. Cell. Res. – 2005. – Vol. 309, №2. – P. 264–272.
26. Shen W., Silva M.S., Jaber T. et al. Two small RNAs encoded within the first 1.5 kilobases of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript can inhibit productive infection and cooperate to inhibit apoptosis // J. Virol. – 2009. – Vol. 83, №18. – P. 9131–9139.
27. Shimura M., Osawa Y., Yuo A. et al. Oxidative stress as a necessary factor in room temperature-induced apoptosis of HL-60 cells // J. Leukoc. Biol. – 2000. – Vol. 68, №1. – P. 87–96.
28. Wang X.W., Tseng A., Ellis N.A. et al. Functional interaction of p53 and BLM DNA helicase in apoptosis // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276, №35. – P. 32948–32955.
29. Yang R., Weber D.J., Carrier F. Post-transcriptional regulation of thioredoxin by the stress inducible heterogenous ribonucleo-protein A18 // Nucleic Acids Res. – 2006. – Vol. 34, №4. – P. 1224–1236.
30. Zhang Z., Sobel R.A., Cheng D. et al. Mild hypothermia increases Bcl-2 protein expression following global cerebral ischemia // Mol. Brain Res. – 2001. – Vol. 95, №1–2. – P. 75–85.
28. Wang X.W., Tseng A., Ellis N.A. et al. Functional interaction of p53 and BLM DNA helicase in apoptosis. J Biol Chem 2001; 276(35): 32948–32955.
29. Yang R., Weber D.J., Carrier F. Post-transcriptional regulation of thioredoxin by the stress inducible heterogenous ribonucleo-protein A18. Nucleic Acids Res 2006; 34(4): 1224–1236.
30. Zhang Z., Sobel R. A., Cheng D. et al. Mild hypothermia increases Bcl-2 protein expression following global cerebral ischemia. Mol Brain Res 2001; 95(1–2): 75–85.

