

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.04.094>

УДК 577.112.5:576.367:611-018.53:57.086.13

О.К. Гулевський, Н.М. Моїсєєва, О.Л. Горіна

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

E-mail: ukrainanataliy@gmail.com

Антиапоптотична дія нейропептиду лей-енкефаліну щодо лейкоцитів донорської крові, підданих холоддовому стресу

Представлено академіком НАН України А.М. Гольцевим

У дослідженнях із застосуванням різних режимів холоддового стресу визначено ступінь прояву апоптозу залежно від тривалості холоддого впливу і температури. Вивчено вплив регуляторного нейропептиду лей-енкефаліну на розвиток апоптозу лейкоцитів донорської крові людини після холоддого стресу за морфологічними показниками і за допомогою флуоресцентної мікроскопії з використанням фарбників Hoechst 33342 і PI. Доведено, що додавання нейропептиду в концентрації 10^{-9} моль до лейкоцитів, які були піддані холоддовому стресу, вірогідно зменшує кількість апоптотичних клітин.

Ключові слова: *холоддовий стрес, апоптоз, лейкоцити, лей-енкефалін.*

Актуальним завданням сьогодення є пошук антиапоптотичних агентів, дія яких спрямована на блокування апоптозу в лейкоцитах після холоддого стресу. Як відомо, однією з причин пошкодження клітин за умов зниження температури є гіпоксія, що призводить до збільшення кількості гідроксильних радикалів та інших активних форм кисню внаслідок порушень процесів окисного фосфорилування і розвитку окиснювального стресу, що спричиняє ушкодження ДНК та ініціації апоптозу [1]. У зв'язку з цим ведеться пошук агентів, які при охолодженні і поверненні в умови нормотермії впливають на окиснювально-відновні процеси в клітинах і запобігають апоптотичним процесам. Згідно з даними аналізу літератури і досліджень у цьому напрямку, як антиапоптотичні речовини особливої уваги заслуговують нейропептиди, отримані з головного мозку гібернуючих тварин, або їх синтетичні аналоги, зокрема лей-енкефалін, відомий як препарат Даларгін [2, 3]. Показано, що лей-енкефалін містить ключову послідовність амінокислот усіх опіоїдів і йому притаманний широкий спектр біологічної активності: антигіпоксична та імуномодельовальна дія, інгібування пероксидного окиснення ліпідів, обмеження гормонально-метаболічних та енергетичних порушень, покращення мікроциркуляції, прискорення фізіологічної та репаративної регенерації [2, 4]. Механізм антиапоптотичної дії цієї сполуки пов'язаний з регуляцією опіоїдних рецепторів і зв'язаних з ними K^+ - Na^+ каналів мітохондрій.

© О.К. Гулевський, Н.М. Моїсєєва, О.Л. Горіна, 2019

Зважаючи на вищесказане, ми ставили за мету дослідити вплив регуляторного нейропептиду лей-енкефаліну на апоптоз лейкоцитів донорської крові людини після холодового стресу за морфологічними показниками з використанням світлової та флуоресцентної мікроскопії.

Матеріали і методи. Лейкоконцентрат отримували з донорської крові людини методом диференціального центрифугування [5]. Для моделювання холодового стресу та ініціації апоптозу лейкоцитів використовували такі температурні режими і час експозиції клітин:

- 1 – 15 хв у льодовій бані та 15 хв при 37 °С;
- 2 – 15 хв у льодовій бані та 30 хв при 37 °С;
- 3 – 15 хв у льодовій бані та 60 хв при 37 °С;
- 4 – 30 хв у льодовій бані та 30 хв при 37 °С;
- 5 – 30 хв у льодовій бані та 60 хв при 37 °С;
- 6 – 30 хв у льодовій бані та 120 хв при 37 °С;
- 7 – 60 хв у льодовій бані та 30 хв при 37 °С;
- 8 – 60 хв у льодовій бані та 60 хв при 37 °С;
- 9 – 60 хв у льодовій бані та 120 хв при 37 °С.

Нейропептид вносили в суспензію клітин у передінкубаційний період у концентраціях: 10^{-6} моль– 10^{-7} моль– 10^{-8} моль– 10^{-9} моль. Аналіз наявності апоптотичних змін у клітинах проводили за морфологічними ознаками клітин (пікноз клітин, фрагментація ядра та блеблінг) за допомогою світлової мікроскопії (PZO-Warszawa, Польща; імерсія; ок. 8, об. 100) після фарбування мазків лейкоконцентрату за Романовським–Гімзе.

Дослідження морфологічних особливостей клітинних ядер та кількості некротичних клітин у лейкоконцентраті проводили з використанням флуоресцентних барвників Hoechst 33342 (“Sigma”) та пропідію йодиду (PI, “Sigma”). Аліквоти PI (7,5 мкМ) та Hoechst 33342 (9 мкМ), розведені фосфатно-сольовим буферним розчином (PBS; рН 7,4), додавали до 1 мл PBS та змішували у співвідношенні 1 : 1 з лейкоконцентратом, в якому знаходилися. Витримували 30 хв у темряві при кімнатній температурі та видаляли барвники шляхом розведення до 5 мл PBS та центрифугування.

Інтенсивність флуоресценції барвників реєстрували при збудженні 490 нм і випромінюванні 636 нм для PI та при збудженні 350 нм і випромінюванні 461 нм для Hoechst 33342 за допомогою конфокального лазерного сканувального мікроскопа LSM 510 META Carl Zeiss (“Carl Zeiss”, Німеччина). Підраховували кількість лейкоцитів з ядрами, позитивно забарвленими PI, та виражали їх у відсотках до загальної кількості клітин у лейкоконцентраті. Всього підраховували 200 клітин у зразку. Кількість клітин з патологічними ознаками ядер виражали у відсотках до загальної кількості підрахованих клітин.

Статистичний аналіз експериментальних даних проводили за допомогою комп’ютерної обробки з використанням програмного пакета “STATGRAPHIC plus for Windows” версії 2.1 за непараметричним критерієм Манна–Уїтні. Кількість повторів у кожній серії експериментів була не менше 5–6. Експериментальні дані наведені як середнє арифметичне \pm середнє квадратичне відхилення. Ступінь вірогідності становив 0,05.

Результати та їх обговорення. Відомо, що ініціація апоптотичних процесів починається в умовах температури нижче фізіологічної. Зокрема в роботах [6, 7] показано, що після інкубації лімфоцитів при 16–21 °С відбувається індукція апоптозу. Зниження температури

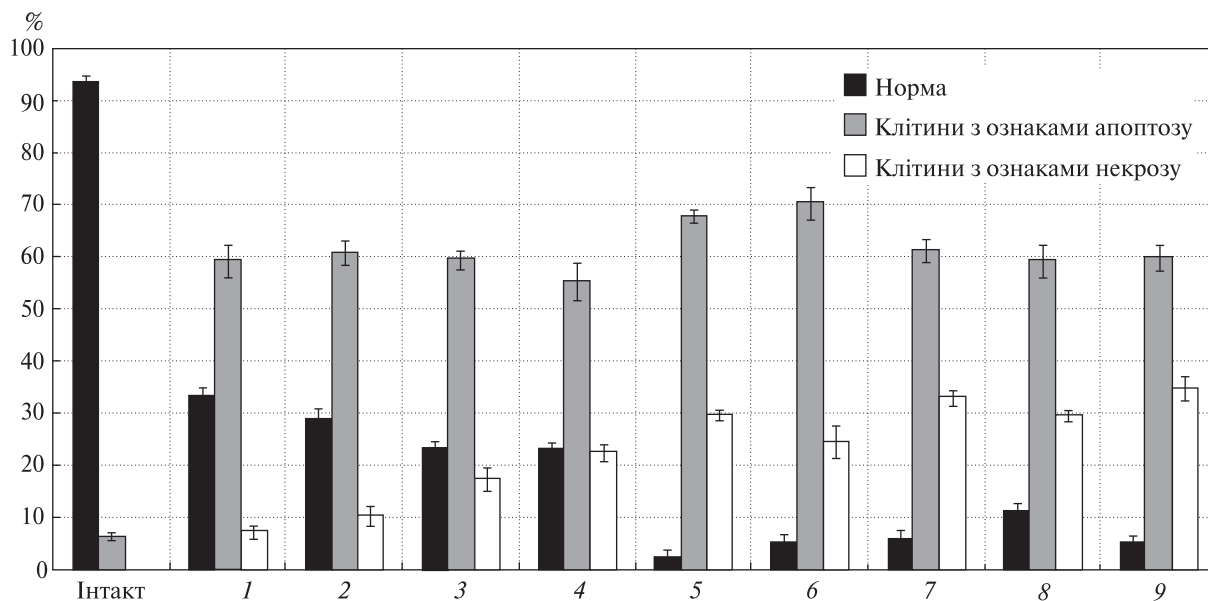


Рис. 1. Відсотковий вміст апоптичних лейкоцитів у суспензії після різних режимів температурного впливу: 1 – 15 хв у льодовій бані та 15 хв при 37 °С; 2 – 15 хв у льодовій бані та 30 хв при 37 °С; 3 – 15 хв у льодовій бані та 60 хв при 37 °С; 4 – 30 хв у льодовій бані та 30 хв при 37 °С; 5 – 30 хв у льодовій бані та 60 хв при 37 °С; 6 – 30 хв у льодовій бані та 120 хв при 37 °С; 7 – 60 хв у льодовій бані та 30 хв при 37 °С; 8 – 60 хв у льодовій бані та 60 хв при 37 °С; 9 – 60 хв у льодовій бані та 120 хв при 37 °С

на градус призводить до збільшення кількості клітин з ознаками апоптозу. Численні дані вказують на те, що для більшості клітин апоптоз є типовою реакцією на гіпотермію і подальше відігрівання [6, 8, 9]. Однак ступінь прояву апоптозу залежить від тривалості холододового впливу, температури, а також інших факторів.

Отже, в першій серії експериментів за мету ставилося визначення оптимальної температури і часу експозиції лейкоцитів, які призводять до індукції апоптозу цих клітин. Аналіз наявності апоптотичних змін у лейкоцитах проводили за такими морфологічними ознаками: пікноз клітин, фрагментація ядра та блебінг мембран [10]. Встановлено (рис. 1), що лейкоцити з ознаками апоптозу виявлялися вже після інкубації протягом 15 хв на льоду з подальшим різким підвищенням температури до 37 °С.

Так, після режиму 1 і 2 реестрували $59,2 \pm 3,1$ і $60,7 \pm 2,3$ % відповідно клітин з ознаками апоптозу і $7,2 \pm 1,2$ та $10,2 \pm 1,9$ % відповідно некротичних лейкоцитів. Збільшення часових інтервалів обох режимів інкубації сприяло не стільки підвищенню показника відсоткового вмісту апоптичних лейкоцитів, скільки кількості клітин з ознаками некрозу. Зокрема, після режиму 3 кількість клітин з морфологічними ознаками апоптозу не перевищувала $59,5 \pm 1,8$ %, при цьому вміст некротичних клітин вірогідно ($p \leq 0,05$) збільшувався до $17,3 \pm 2,2$ % порівняно з режимами 1 і 2. Таким чином, на підставі одержаних результатів нами встановлено, що подовження часу інкубації саме при 37 °С призводить до найбільш руйнівних наслідків, а саме збільшення кількості клітин з ознаками некрозу.

На наступному етапі ми оцінювали антиапоптотичний ефект нейропептиду лейкенкефаліну, дія якого безпосередньо спрямована на інгібування пероксидного окиснення

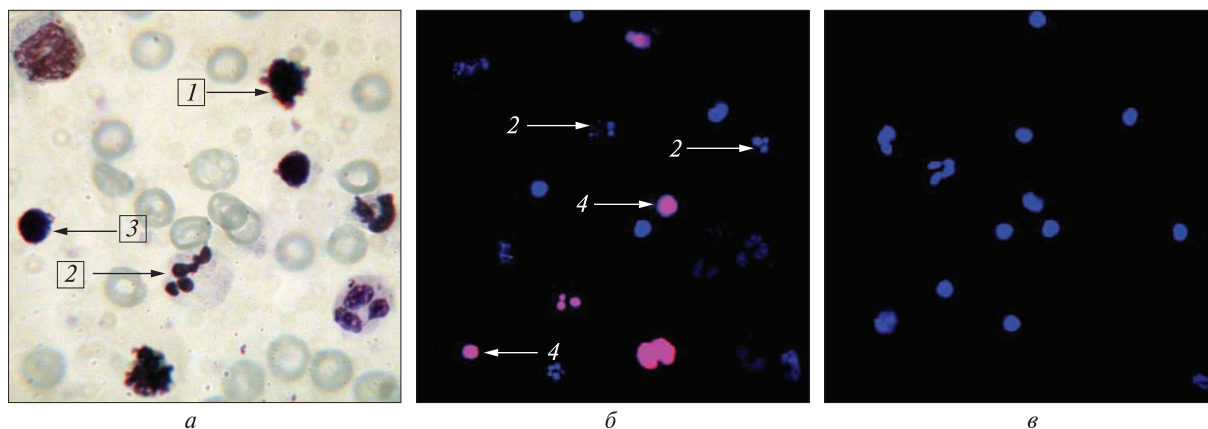


Рис. 2. Лейкоцити з морфологічними ознаками апоптозу після холодowego стресу: *а* – мікрофотографія суспензії лейкоцитів, забарвлення еозин-метиленим синім та азур-еозином, зб.: ок. 10, об. 100; імерсія; *б* – мікрофотографія суспензії лейкоцитів, забарвлення Hoechst 33342 та PI, зб. ок. 10, об. 63, імерсія; *в* – мікрофотографія нативних лейкоцитів, забарвлення Hoechst 33342 та PI, зб. ок. 10, об. 63, імерсія. 1 – блябінг; 2 – фрагментація ядра; 3 – пікноз; 4 – некроз

ліпідів [2, 11], що, як наслідок, може мати вплив на ступінь прояву апоптозу лейкоцитів після холодowego стресу. У роботі [2] припускалося, що реалізація захисних властивостей пептиду відбувається через активацію δ -опіоїдного рецептора та ініціацію каскаду реакцій, що сприяють стабілізації неспецифічної мітохондріальної пори.

З урахуванням вищесказаного на наступному етапі ми вивчали антиапоптотичну дію лей-енкефаліну в концентрації 10^{-9} моль/л за таким режимом 1 : 15 хв передінкубації з лейкоцитами до холодowego впливу, 15 хв у льодовій бані та 15 хв при 37°C . Апоптотичні зміни лейкоцитів оцінювали за морфологічними показниками методом Романовського—Гімзе (рис. 2, *а*) і за допомогою флуоресцентних барвників, зокрема Hoechst 33342 і PI (рис. 2, *б*, *в*).

Встановлено, що додавання нейропептиду до лейкоцитів після холодowego стресу в концентрації 10^{-9} моль/л сприяло вірогідному зменшенню відсотка клітин з морфологічними ознаками апоптозу, які оцінювали за методом Романовського—Гімзе. Зокрема, кількість апоптотичних клітин після додавання нейропептиду вірогідно ($p < 0,05$) зменшувалася до $48,2 \pm 3,2\%$ порівняно з контролем ($65,3 \pm 2,5\%$). Необхідно відзначити, що кількість некротичних клітин також вірогідно ($p < 0,05$) зменшувалася до $5,2 \pm 0,8\%$ порівняно з контролем ($14,9 \pm 1,8\%$) (рис. 3, *а*).

У разі використання флуоресцентного ДНК-барвника Hoechst 33342, який вільно проникає в усі клітини, незалежно від ступеня пошкодження їх мембрани, спостерігалася ідентична тенденція. Так, у контролі кількість клітин з фрагментацією ядра, що є наслідком апоптотичних процесів у лейкоцитах після холодowego стресу [1], становила $51,4 \pm 1,7\%$. Після додавання в інкубаційне середовище нейропептиду кількість клітин з фрагментацією ядра вірогідно зменшувалася до $32,7 \pm 2,7\%$ (див. рис. 3, *б*).

Результати дослідження життєздатності лейкоцитів за флуоресцентним ДНК-барвником PI також узгоджуються з попередніми даними щодо морфологічних ознак некрозу. Зокрема, з рис. 4 видно, що в контрольній групі кількість некротичних клітин становила

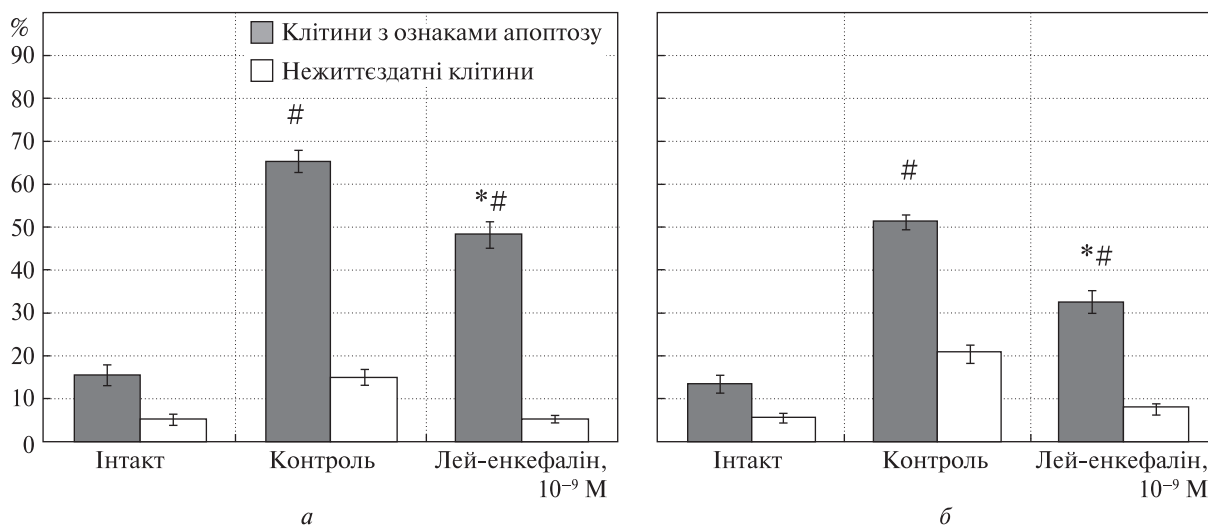


Рис. 3. Кількість апоптотичних і некротичних лейкоцитів після холодного стресу та інкубації з лей-енкефаліном у концентрації 10^{-9} моль/л: *a* – за даними світлової мікроскопії (забарвлення за Романовським–Гімзе); *б* – за даними флуоресцентної мікроскопії (забарвлення Ноехст 33342 і PI). * – відмінності вірогідні порівняно з контролем, $p \leq 0,05$; # – відмінності вірогідні порівняно з нормою, $p \leq 0,05$

$20,6 \pm 2,1$ %, однак після додавання нейропептиду кількість позитивних за PI клітин не перевищувала $7,8 \pm 1,3$ %.

Таким чином, у дослідженнях із застосуванням різних режимів холодного стресу з'ясовано ступінь прояву апоптозу залежно від тривалості холодного впливу і температури. Встановлено, що найбільш сприятливим для вивчення явищ апоптозу є такий режим: 15 хв передінкубації лейкоцитів при 37 °С, 15 хв експозиції клітин при 0 °С і 15 хв подальшої інкубації при 37 °С, оскільки саме за таких умов відношення апоптотичних клітин до некротичних було максимальним. Антиапоптотичну дію на лейкоцити після холодного стресу, яку оцінювали за морфологічними ознаками і за допомогою флуоресцентної мікроскопії з використанням барвників Ноехст 33342 і PI, нейропептид лей-енкефалін виявляє в концентрації 10^{-9} моль. З огляду на той факт, що для більшості клітин апоптоз є типовою реакцією на охолодження і подальше відігрівання, одержані дані актуальні і необхідні для вдосконалення протоколів низькотемпературного зберігання лейкоцитів або для створення реабілітуючих середовищ з метою пригнічення апоптотичних реакцій і підвищення функціональної активності клітин після холодного стресу.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Гулевський А.К., Ахатова Ю.С., Щенявський І.І. Особенности апоптоза, индуцированного снижением температуры. *Пробл. криобиологии и криомедицины*. 2017. 27, № 2. С. 97–109. doi: <https://doi.org/10.15407/cryo27.02.097>
2. Лихванцев В.В., Гребенников О.А., Шапошников А.А., Борисов К.Ю., Черпаков Р.А., Шульгина Н.М. Фармакологическое прекондиционирование: роль опиоидных пептидов. *Общая реаниматология*. 2012. 8, № 3. С. 51–55.
3. Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Барзах Е.И., Максимов И.В., Ворожцова И.Н., Буховец И.Л., Минин С.М., Орлова Е.Б., Лавров А.Г., Овчинников М.В. Кардиоваскулярные эффекты D-Ala², Leu⁵, Arg⁶-

- енкефаліна (Даларгин) связаны с активацией периферических опиоидных μ -рецепторов. *Эксперим. и клинич. фармакология*. 2008. **71**, № 2. С. 21–28.
- Shenoy S.S., Lui F. Biochemistry, Endogenous Opioids. *StatPerls*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532899/>. (Дата звернення: 15.01.2019).
 - Аграненко В.А., Сукиясян Г.В., Воробьева Г.С., Абезгауз Н.Н., Трошина В.М., Копыл В.И., Шитикова М.Г., Мартынова В.А., Ермакова Г.А. Методы выделения концентратов тромбо- и лейкоцитов из лейкоцитарного слоя консервированной крови в пластикатных мешках. *Гематология и трансфузиология*. 1985. **30**, № 11. С. 54–59.
 - Neutelings T., Lambert C.A., Nusgens B.V., Colige A.C. Effects of mild cold shock (25 °C) followed by warming up at 37 °C on the cellular stress response. *Plos One*. 2013. **8**. e69687. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069687>
 - Fransen J.H., Dieker J.W., Hilbrands L.B., Berden J.H., van der Vlag J. Synchronized turbo apoptosis induced by cold-shock. *Apoptosis*. 2011. **16**. P. 86-93. doi: <https://doi.org/10.1007/s10495-010-0546-0>
 - Rauen U., Polzar B., Stephan H., Mannherz H.G., de Groot H. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J*. 1999. **13**, № 1. P. 155–168.
 - Rauen U., Petrat F., Li T., De Groot H. Hypothermia injury/cold induced apoptosis – evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O₂-/H₂O₂ formation. *FASEB J*. 2000. **14**, № 13. P. 1953–1964. doi: <https://doi.org/10.1096/fj.00-0071com>
 - Zhang Y., Chen X., Gueydan C., Han J. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Res*. 2018. **28**. P. 9–21. doi: <https://doi.org/10.1038/cz.2017.133>
 - Plotnikov E.Y., Chupyrkina A.A., Jankauskas S.S., Pevzner I.B., Silachev D.N., Skulachev V.P., Zorov D.B. Mechanisms of nephroprotective effect of mitochondria-targeted antioxidants under rhabdomyolysis and ischemia/reperfusion. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011. **1812**, Iss. 1. P. 77–86. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.09.008>

Надійшло до редакції 12.02.2019

REFERENCES

- Gulevsky, A. K., Akhatova, Yu. S. & Shchenyavsky, I. I. (2017). Features of apoptosis, induced by temperature reduction. *Probl. Cryobiol. Cryomed.*, 27, No. 2, pp. 97-109 (in Russian). doi: <https://doi.org/10.15407/cryo27.02.097>
- Likhvantsev, V. V., Grebenchikov, O. A., Shaposhnikov, A. A., Borisov, K. Yu., Cherpakov, R. A. & Shulgina, N. V. (2012). Pharmacological preconditioning: role of opioid peptides. *Obshchaya Reanimatologiya*, 8, No. 3, pp. 51-55 (in Russian).
- Maslov, L. N., Lishmanov, Yu. B., Barzakh, E. I., Maksimov, I. V., Vorozhtsova, I. N., Bukhovets, I. L., Minin, S. M., Orlova, E. B., Lavrov, A. G. & Ovchinnikov, M. V. (2008). Cardiovascular effects of D-Ala², Leu⁵, Arg⁶-enkephalin (Dalargin) are mediated by peripheral μ -opioid receptor activation. *Éksperimentalnaya i Klinicheskaya Farmakologiya*, 71, No. 2, pp. 21-28 (in Russian).
- Shenoy, S. S. & Lui, F. (2018). Biochemistry, Endogenous Opioids. *StatPearls*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532899/>
- Agranenko, V. A., Sukisyan, G. V., Vorobyeva, G. S., Abezgaуз, N. N., Troshina, V. M., Kopyl, V. I., Shitikova, M. G., Martynova, V. A. & Ermakova, G. A. (1985). Methods for isolation of thrombo- and leucocyte concentrates from the thrombocytic layer of the blood preserved in plastic bags. *Hematology and Transfusiology*, 30, No. 11, pp. 54-59 (in Russian).
- Neutelings, T., Lambert, C. A., Nusgens, B. V. & Colige, A.C. (2013). Effects of mild cold shock (25 °C) followed by warming up at 37 °C on the cellular stress response. *Plos One*, 8, e69687. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069687>
- Fransen, J. H., Dieker, J. W., Hilbrands, L. B., Berden, J. H. & van der Vlag, J. (2011). Synchronized turbo apoptosis induced by cold-shock. *Apoptosis*, 16, pp. 86-93. doi: <https://doi.org/10.1007/s10495-010-0546-0>
- Rauen, U., Polzar, B., Stephan, H., Mannherz, H. G. & de Groot, H. (1999). Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J.*, 13, No. 1, pp. 155-168.

9. Rauen, U., Petrat, F., Li, T. & De Groot, H. (2000). Hypothermia injury/cold induced apoptosis – evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O₂⁻/H₂O₂ formation. FASEB J., 14, No. 13, pp. 1953-1964. doi: <https://doi.org/10.1096/fj.00-0071com>
10. Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C. & Han, J. (2018). Plasma membrane changes during programmed cell deaths. Cell Res., 28, pp. 9-21. doi: <https://doi.org/10.1038/cz.2017.133>
11. Plotnikov, E. Y., Chupyrkina, A. A., Jankauskas, S. S., Pevzner, I. B., Silachev, D. N., Skulachev, V. P. & Zorov, D. B. (2011). Mechanisms of nephroprotective effect of mitochondria-targeted antioxidants under rhabdomyolysis and ischemia/reperfusion. Biochim. Biophys. Acta., 1812, Iss. 1, pp. 77-86. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.09.008>

Received 12.02.2019

А.К. Гулевський, Н.Н. Моїсєєва, О.Л. Горіна

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков
E-mail: ukrainanataliy@gmail.com

АНТИАПОПТОТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ НЕЙРОПЕПТИДА ЛЕЙ-ЭНКЕФАЛИНА В ОТНОШЕНИИ ЛЕЙКОЦИТОВ ДОНОРСКОЙ КРОВИ, ПОДВЕРГНУТЫХ ХОЛОДОВОМУ СТРЕССУ

В исследованиях с использованием различных режимов холодного стресса определена степень проявления апоптоза в зависимости от продолжительности холодного воздействия и температуры. Изучено влияние регуляторного нейропептида лей-энкеφαлина на развитие апоптоза лейкоцитов донорской крови человека после холодного стресса по морфологическим показателям и с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием красителей Hoechst 33342 и PI. Доказано, что добавление нейропептида в концентрации 10⁻⁹ моль к лейкоцитам, которые были подвергнуты холодному стрессу, достоверно уменьшает количество апоптотических клеток.

Ключевые слова: *холодовой стресс, апоптоз, лейкоциты, лей-энкеφαлин.*

A.K. Gulevsky N.N. Moiseyeva, O.L. Gorina

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv
E-mail: ukrainanataliy@gmail.com

ANTIAPOPTOTIC EFFECT OF LEU-ENKEPHALIN NEUROPEPTIDE ON DONOR BLOOD LEUKOCYTES UNDER COLD STRESS

Using various modes of cold stress, the degree of apoptosis depending on the duration of cold exposure and the temperature is determined. The influence of leu-enkephalin regulatory neuropeptide on the development of leukocyte apoptosis of human donor blood after cold stress by morphological indices is studied. The fluorescence microscopy and Hoechst 33342 and PI dyes were used. It has been proved that the addition of the neuropeptide in a concentration of 10⁻⁹ Mol to leukocytes, which were subjected to cold stress, significantly reduces the number of apoptotic cells.

Keywords: *cold stress, apoptosis, leukocytes, leu-enkephalin.*