

ПРЕДІНКУБАЦІЯ ФІБРОБЛАСТІВ ЛІНІЇ L929 З СИНТЕТИЧНИМ ЛЕЙ-ЕНКЕФАЛІНОМ TYR-D-ALA-GLY-PHE-LEU-ARG ЗБЕРІГАЄ ЇХ ПРОЛІФЕРАТИВНИЙ ПОТЕНЦІАЛ В УМОВАХ ХОЛОДОВОГО СТРЕСУ

О.К. ГУЛЕВСЬКИЙ, Н.М. МОІСЄЄВА, О.Л. ГОРІНА, О.С. СИДОРЕНКО

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, 61016, Україна

E-mail: profgulevsky@gmail.com, ukrainanataliy@gmail.com, ogorina2603@gmail.com, lesunec@gmail.com

В умовах холодового стресу досліджено вплив синтетичного лей-енкефаліну (TYR-D-ALA-GLY-PHE-LEU-ARG) на апоптоз, некроз і проліферативні властивості фібробластів клітинної лінії L929 в моношарі без ушкодження і з «рановою поверхнею». Доведено, що холодовий стрес ініціює апоптоз, некроз та уповільнює проліферацію клітин в ушкодженному і неушкодженному моношарі фібробластів лінії L 929. Предінкубація клітин з синтетичним лей-енкефаліном до моделювання холодового стресу призводить до вірогідного ($p < 0,05$) зменшення кількості фібробластів з морфологічними ознаками некрозу і апоптозу та вірогідного ($p < 0,05$) збільшення проліферативного потенціалу клітин в неушкодженному моношарі і з рановою поверхнею. З'ясовано, що протекторна дія синтетичного лей-енкефаліну є дозозалежною і суттєво відрізняється в умовах холодового стресу при ранозагоюванні. Найбільша ефективність синтетичного лей-енкефаліну щодо запобігання апоптозу клітин і стимуляції проліферації клітин в умовах холодового стресу спостерігається в концентрації 10 і 100 мкг/л.

Ключові слова: холодовий стрес, лей-енкефалін, клітинна лінія фібробластів L929, апоптоз, некроз, проліферація клітин, рана поверхня.

Вступ. Відомо, що синтетичний лей-енкефалін TYR-D-ALA-GLY-PHE-LEU-ARG — ензимостійкий аналог ендogenous лей-енкефаліну, який відрізняється наявністю в структурі залишків Д-аланіну та аргініну в с-положенні — крім посилення антиоксидантного та антирадикального захисту підвищує резистентність тварин до гіпотермії, стабілізуючи рівень активних форм кисню (Tadzhibova et al, 2011). Також в численних дослідженнях встановлено здатність синтетичного лей-енкефаліну стимулювати проліферативний потенціал клітин в різних культурах (Vasilyev et al, 2014; Zhivotova et al, 2012).

Наведені результати дозволили припустити, що лей-енкефалін може сприяти підвищенню стійкості клітин в умовах холодового стресу, який включає в себе охолодження до 0 °С, з наступним поверненням в нормотермічні умови. В цитованих роботах було доведено, що основні пошкодження після охолодження відбуваються саме після повернення клітин в умови нормотермії (Slepko et al, 1992). Зокрема, в дослідженнях (Neutelings et al, 2013) було показано, що зниження температур в культурі клітин WI26 до 25 °С з подальшим поверненням в нормотермічні умови призводить до реакції клітинного стресу, в результаті чого відбуваються патологічні зміни (фрагментація ДНК), що свідчать про явища апоптозу. Як з'ясувалося в роботах (Gulevsky et al, 2019), основні морфологічні і метаболічні порушення в клітинах (апоптоз і некроз) відбувались також після повернення клітин в умови нормотермії.

Однак, на теперішній час досліджень щодо протекторної дії опіоїдних пептидів в умовах холодового стресу на проліферативний потенціал клітин при ранозагоюванні в культурі клітин in vitro проведено не було.

Приймаючи до уваги все вище сказане, метою даної роботи було дослідження впливу холодового стресу на розвиток клітинних пошкоджень (апоптозу і некрозу), а також з'ясування його впливу на проліферативний потенціал фібробластів лінії L929 в присутності синтетичного нейропептиду лей-енкефаліну в моношарі і на моделі «рана поверхня».

Експериментальна частина. Дослідження виконані на перешеплюваній лінії фібробластів L929, яку підтримували впродовж 4 пасажів. Клітинну лінію підтримували з використанням живильного середовища DMEM/F12 («Biowest», Франція), доповненого 10%-вою фетальною телячою сироватки («Biowest», Франція), 200

Од/мл бензилпеніциліну («Arterium», Україна) та 200 мкг/мл стрептоміцину («Arterium», Україна), у зволоженому інкубаторі з 5 % CO₂ при 37 °С. Для трипсинізації використовували розчин трипсину (0,25 % («Sigma», США))/Версену («РАА», США), витримували 5 хв та відмивали від ферментного розчину середовищем DMEM/F12 з додаванням сироватки.

Моделювання холодового стресу. Після трипсинізації клітини переносили у 24-лункові планшети («SPL Life Sciences», Корея) у концентрації 0,5 · 10⁶ клітин/мл та культивували впродовж 7 діб в стандартних умовах. Після утворення моношару на 7 добу планшети переносили в льодову баню і витримували при температурі від 0 до 2 °С впродовж 20 хв, далі — культуру переносили в умови нормотермії (5 % CO₂, 37 °С) на 60 хв або 48 год в залежності від умов експерименту. Паралельно вели культуру, яку не піддавали дії холоду (контроль).

Для дослідження дії синтетичного нейропептиду лей-енкефаліну (TYR-D-ALA-GLY-PHE-LEU-ARG) на фібробласти, піддані холодовому стресу, нейропептид додавали у концентрації 10–100–500 мкг/л до середовища культивування за 15 хв перед моделюванням холодового стресу та одноразово через 24 год культивування при дослідженні проліферативного потенціалу. В зразки без препарату додавали еквівалентний об'єм фізіологічного розчину.

Забарвлення гематоксиліном/еозином. Для дослідження морфології клітин через 60 хв інкубації моношар трипсинізували як описано вище, клітини промивали фосфатно-сольовим буферним розчином (PBS) та фіксували в метанолі. Далі додавали 1%-вий розчин гематоксиліну («Sigma-Aldrich», США) з наступною промивкою PBS та забарвленням 1%-вим розчином еозину («Sigma-Aldrich», США). Морфологію клітин оцінювали методом світлової мікроскопії («PZO-Warszawa», Польща) під імєрсією (ок. 8, об. 100). Аналіз наявності апоптотичних змін в клітинах проводили за наступними ознаками клітин: пікноз клітин, фрагментація ядра та блебінг, некротичні клітини оцінювали за такими морфологічними змінами як збільшення об'єму клітин, розпад мембрани з вивільненням цитоплазматичного вмісту та каріолізис. Всього підраховували по 200 клі-

тин у зразку. Кількість клітин з ознаками апоптозу/некрозу виражали у відсотках до загальної кількості підрахованих клітин.

Забарвлення Hoechst 33342/йодидом пропідію. Для дослідження морфології ядра та життєздатності клітин методом подвійного забарвлення ДНК-барвниками Hoechst 33342 («Sigma», США) та йодидом пропідію (PI, «Sigma», США) через 60 хв інкубації моношар трипсинізували як описано вище, клітини промивали PBS. Аліквоти PI (7,5 мкм) та Hoechst 33342 (9 мкм), розведені PBS (pH 7,4), додавали до 1 мл PBS та змішували у співвідношенні 1 : 1 з суспензією клітин. Витримували 30 хв в темряві в умовах нормотермії (5 % CO₂, 37 °С) та видаляли барвники шляхом розведення до 5 мл PBS та центрифугування. Інтенсивність флуоресценції барвників реєстрували при збудженні 490 нм та випромінюванні 636 нм для PI та при збудженні 350 нм та випромінюванні 461 нм для Hoechst 33342. Фотореєстрацію клітинних препаратів здійснювали за допомогою конфокального лазерного сканувального мікроскопу LSM 510 META Carl Zeiss («Carl Zeiss», Німеччина). Для аналізу отриманих зображень використовували програми LSM 510 та LSM Image Examiner. Всього підраховували по 200 клітин у зразку. Кількість клітин з патологічними ознаками ядер виражали у відсотках до загальної кількості підрахованих клітин у зразку.

Оцінка проліферативного потенціалу в моношарі фібробластів лінії L929. Оцінку проліферативного потенціалу фібробластів в умовах холодового стресу проводили на моделі механічного ушкодження моношару «ранова поверхня» (Denker et al, 2002). Для цього після моделювання холодового стресу (як описано вище) наносили подряпину на моношар клітинної культури за допомогою пластикового наконечника діаметром 0,8 мм (для піпет-дозатору об'ємом 200 мкл) після чого промивали моношар культуральним середовищем для видалення клітинного дебрису та повертали планшети в умови культивування (5 % CO₂, 37 °С) на 48 год. Площу поверхні «рани» оцінювали безпосередньо після нанесення подряпини, а також через 24 і 48 год за допомогою інвертованого мікроскопа, мікрофотографії аналізували у програмі Zeiss LSM Image Examiner. Результати представлені як співвідношення площі рани

на 24 або 48 год до площі рани після нанесення подряпини та виражені у відсотках. За 100 % приймали площу контрольної подряпини.

Для дослідження протекторної дії синтетичного лей-енкефаліну на проліферативні властивості фібробластів в моношарі після механічного ушкодження в умовах холодового стресу препарат додавали у концентраціях 10–100–500 мкг/л до середовища культивування перед моделюванням холодового стресу та одноразово через 24 год культивування. В групи без препарату додавали еквівалентний об'єм фізіологічного розчину. Проліферативну активність фібробластів, оцінювали за коефіцієнтом проліферації через 48 год за відношенням кількості отриманих клітин до посіяних, отримані результати представляли у відносних одиницях. Кількість клітин підраховували у камері Горяєва.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми «Statgraphics plus for Windows 2.1» («Manugistics Inc.», США) за непараметричним критерієм Манна-Уїтні. Експериментальні дані приведені як середнє арифметичне $\pm$ середнє квадратичне відхилення. Достовірними вважались відмінності при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. В дослідженнях (Slepko et al, 1992; Tang et al, 2011) було доведено стимулюючий вплив пептидних опіоїдів, зокрема синтетичного аналога лей-енкефаліна, на регенерацію епітелію. Встановлено, що цей ефект реалізації відбувається при зв'язуванні молекул лей-енкефаліну з δ -опіоїдними рецепторами. В результаті цих досліджень синтетичний лей-енкефалін (препарат «Даларгін») було рекомендовано при лікуванні виразки шлунку і дванадцятипалої кишки (Vasilyev et al, 2014). У численних роботах обговорюється найбільш ефективне дозування синтетичного нейропептиду для впливу на опіоїдні рецептори (Millan et al, 1988; Pan'kova TD and Timoshi, 1990; Vasilyev et al, 2014). В приведених роботах встановлена логарифмічна залежність між дозою препарату і ефектом його впливу. Результати досліджень свідчать про те, що оптимальне дозування становить 10 і 100 мкг/л. Наприклад, в експерименті при травмі рогівки ока у білих щурів було доведено, що найбільш ефективно синтетичний нейропептид підвищує мітотич-

ний індекс клітин в концентрації 100 мкг/кг. Особливу увагу привертає і той факт, що підвищення проліферативної активності клітин спостерігалось при зменшенні дози до 0,1 мкг/кг, а при збільшенні дози до 1000 мкг/кг, ефект знижувався до повного зникнення і навіть протилежного ефекту при концентрації нейропептиду 10000 мкг/кг (Vasilyev et al, 2014).

Приймаючи до уваги все вищесказане, в проведених дослідженнях проводили оцінку впливу синтетичного нейропептиду на апоптоз, некроз та проліферативний потенціал фібробластів в умовах холодового стресу у залежності від його концентрації у культуральному середовищі.

Відомо, що перебування живих клітин в гіпотермічних умовах, тобто при температурах нижче фізіологічної норми, супроводжується рядом метаболічних змін та структурних ушкоджень (Al-Fageeh et al, 2006), що призводить до ініціації апоптозу і некрозу (Khar et al, 2003; Rauven et al, 1999). Тому вивчення механізмів холодових пошкоджень та холодової акліматії неможливе без урахування апоптичних і некротичних процесів. У більшості еукаріот традиційно виділяють три стадії розвитку апоптозу: сигнальну або індукційну, ефекторну і термінальну або деградаційну. Серед морфологічних змін, що відбуваються в апоптотичній клітині, більшість дослідників виділяють наступні: зміна форми клітини, зміна об'єму клітини (в залежності від фази апоптозу), конденсація хроматину в ядрі, фрагментація ядра, конденсація цитоплазми і формування апоптотичних тілець на пізніх стадіях апоптозу для полегшення **ФАГОЦИТОЗУ І ТА ІН.** (Elmore, 2007). Як з'ясувалося, здебільшого ці ознаки пошкоджень при низьких температурах наступають на етапі повернення клітин в нормотермічні умови, а сам цикл перебування в умовах понижених температур з наступним поверненням у нормотермічні умови можна визначити як холодовий стрес. Збільшення об'єму клітин, розпад мембрани з вивільненням цитоплазматичного вмісту та каріолізис є маркерами некротичних ознак (Kurychenko and Kovalenko, 2010).

Приймаючи до уваги все вищесказане, на першому етапі досліджень оцінювали вплив холодового стресу і синтетичного лей-енкефаліну у залежності від концентрації (10–100–

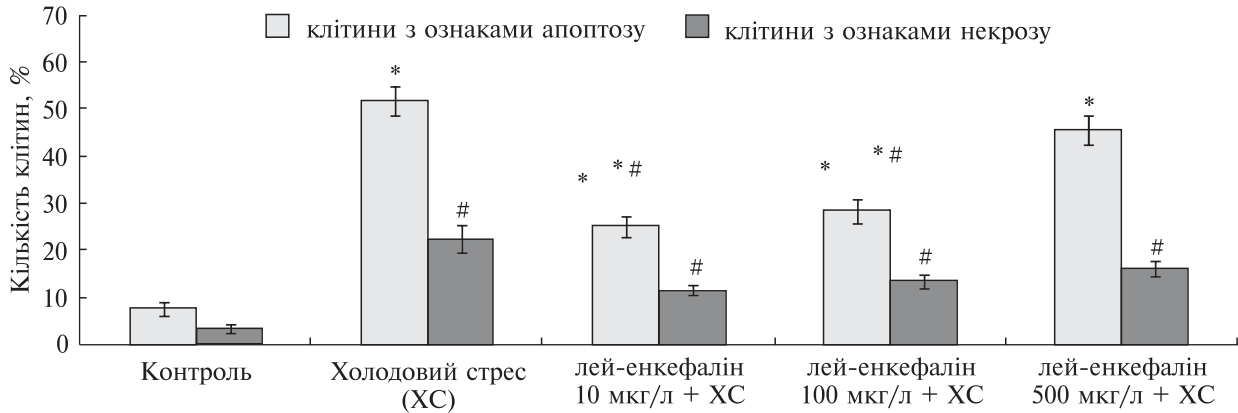


Рис. 1. Вплив попередньої інкубації фібробластів L929 з синтетичним нейропептидом у концентраціях (10–100–500 мкг/л) на кількість клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу після холодового стресу за даними світлової мікроскопії. Контроль (культура клітин, яку не піддавали дії холоду). За 100 % приймали 200 клітин. *, # – відмінності достовірні ($p < 0,05$) у порівнянні з відповідними значеннями контролю, *# – відмінності достовірні ($p < 0,05$) у порівнянні з холодним стресом

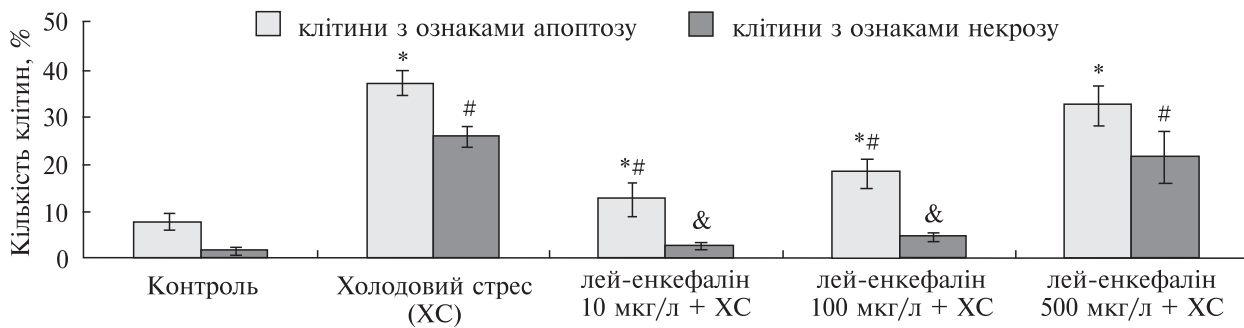


Рис. 2. Вплив попередньої інкубації фібробластів L929 з синтетичним нейропептидом у концентрації (10–100–500 мкг/л) на кількість клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу після холодового стресу за даними флуоресцентної мікроскопії (забарвлення Ноехст 33342 та PI). Контроль (культура клітин, яку не піддавали дії холоду). За 100 % приймали 200 клітин. *, # – відмінності достовірні ($p < 0,05$) у порівнянні з відповідними значеннями контролю, *#, & – відмінності достовірні ($p < 0,05$) у порівнянні з холодним стресом

500 мкг/л) на кількість клітин з морфологічними ознаками апоптозу (блебінг, фрагментація ядра, пікноз клітин) і некрозу (набухання клітин, розрив мембран) в суспензії перещеплюваної лінії фібробластів L929 за допомогою метода світлової мікроскопії (рис. 1). Встановлено, що холодний стрес сприяє збільшенню кількості клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу на 43,9 і 19,1 % відповідно, у порівнянні з контролем (рис. 1). Додавання лей-енкефаліну до інкубаційного середовища клітин в концентраціях 10 і 100 мкг/л призводило до достовірного ($p < 0,05$) зменшення кількості апоптотичних і некротичних клітин,

на 26,5 та 23,3 %, відповідно. При збільшенні концентрації лей-енкефаліну до 500 мкг/л достовірного ($p < 0,05$) зменшення клітин з ознаками апоптозу і некрозу в умовах холодового стресу не відбувалось.

Відомо, що фізіологічна загибель клітини характеризується різноманітними морфологічними і біохімічними змінами ядра і проникності мембран клітин. Зокрема, під впливом ендонуклеаз відбувається фрагментація ДНК, яка вважається біохімічним маркером апоптозу, при некрозі клітин порушується проникність мембран для барвників (Collins et al, 1997). Тому на наступному етапі досліджень

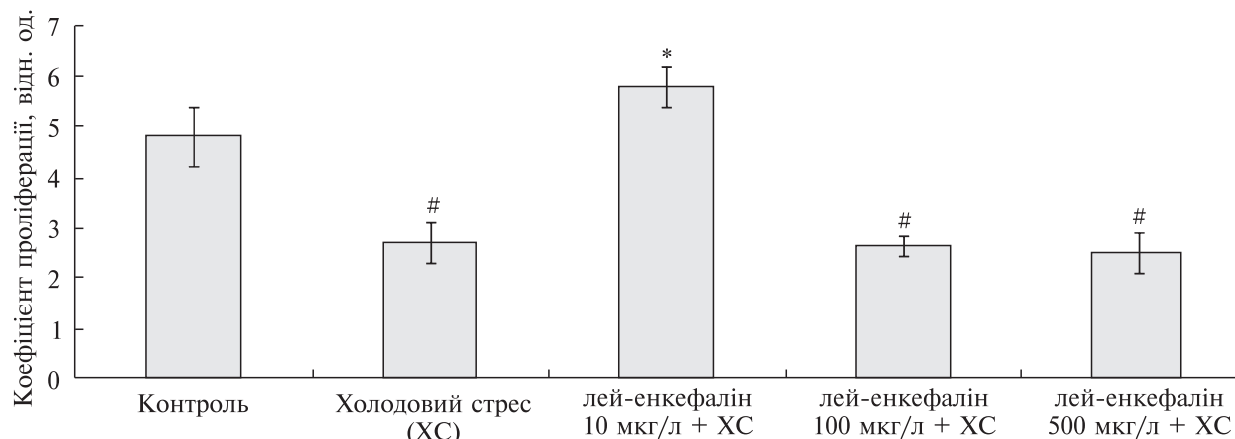


Рис. 3. Вплив синтетичного нейропептиду у концентрації (10–100–500 мкг/л) на коефіцієнт проліферації (КП) фібробластів L929, підданих холодовому стресу, при моношаровому культивуванні (48 год). Контроль (культура клітин, яку не піддавали дії холоду). * – відмінності достовірні ($p < 0,05$) у порівнянні з КП клітин після холодового стресу; # – відмінності достовірні ($p < 0,05$) у порівнянні з КП клітин в контролі

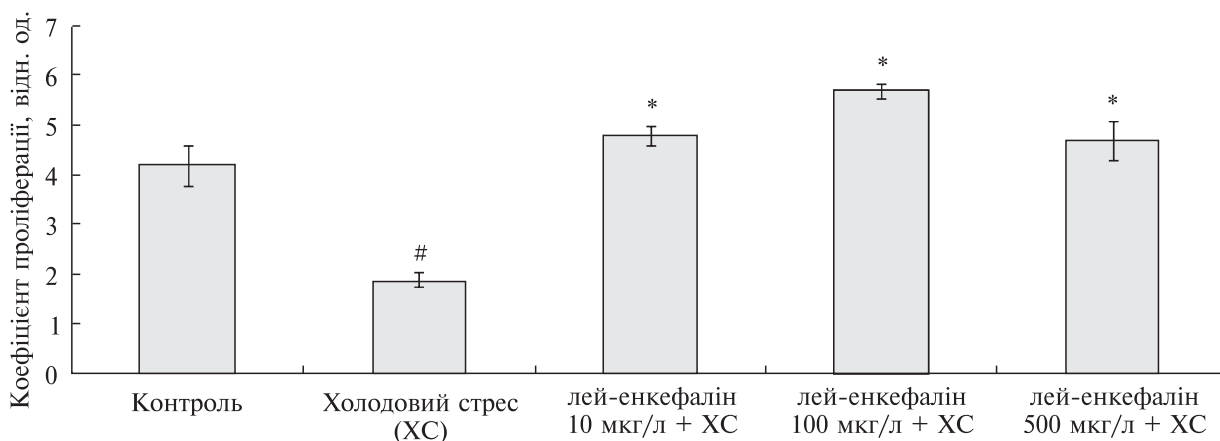


Рис. 4. Вплив синтетичного лей-енкефаліну у концентрації (10–100–500 мкг/л) на коефіцієнт проліферації (КП) фібробластів L929, підданих холодовому стресу та механічному ушкодженню моношару, при моношаровому культивуванні (48 год). Контроль (культура клітин, яку не піддавали дії холоду). * – відмінності достовірні ($p < 0,05$) у порівнянні з КП клітин після холодового стресу та механічного ушкодження моношару; # – відмінності достовірні ($p < 0,05$) у порівнянні з КП клітин в контролі

для більш ретельного аналізу кількості апоптотичних і некротичних клітин використовували флуоресцентні барвники Hoechst 33342 та PI за допомогою яких виявляли фрагментацію ДНК і порушення проникності мембран в умовах холодового стресу (рис. 2). Встановлено, що після холодового стресу і додавання лей-енкефаліну у діапазоні концентрацій (10–100–500 мкг/л) зміни кількості апоптотичних та некротичних клітин були ідентичними з результатами, представленими на рис. 2.

На подальшому етапі досліджень проводили оцінку впливу синтетичного нейропептиду на коефіцієнт проліферації (КП) в моношарі клітин в умовах холодового стресу у залежності від концентрації в культуральному середовищі (рис. 3). Встановлено, що після холодового стресу в моношарі фібробластів L929 КП клітин зменшується у 2 рази відносно контролю. Стимулюючий ефект синтетичного лей-енкефаліну на проліферативний потенціал клітин спостерігався лише при концентрації 10 мкг/л, в той

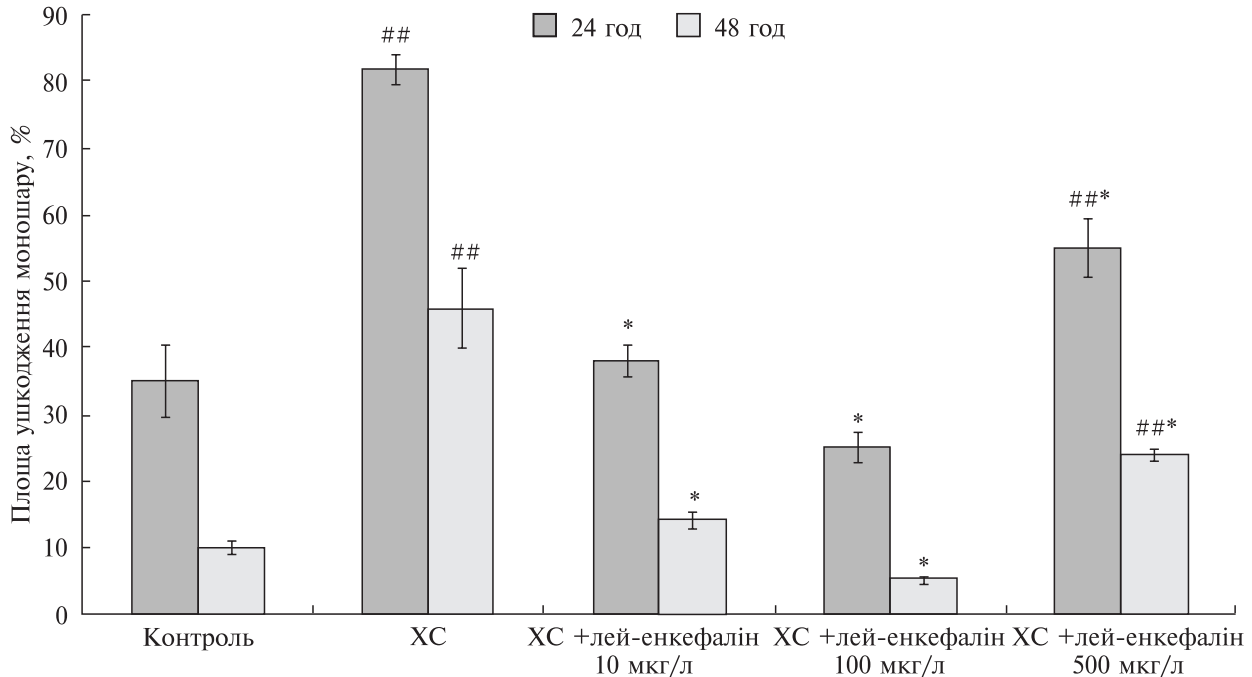


Рис. 5. Площа пошкодження моношару клітин L 929 після предінкубації з лей-енкефаліном у концентрації (10–100–500 мкг/л) та наступною дією холодового стресу: контроль – (культура клітин, яку не піддавали дії холоду); холодовий стрес (ХС). ## – відмінності достовірні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем; * – відмінності достовірні ($p < 0,05$) у порівнянні з холодовим стресом (ХС)

час як зразки з концентрацією синтетичного нейропептиду 100 та 500 мкг/л достовірно ($p < 0,05$) не відрізнялись від значень після холодового стресу. Ймовірно, таке нівелювання проліферації клітин в моношарі без ушкодження при збільшенні дози препарату нейропептиду до 100 і 500 мкг/л може бути наслідком надлишку препарату в середовище культивування клітин і включенню інших його механізмів.

В багатьох дослідженнях було доведено, що метаболічна і проліферативна активність фібробластів в умовах ранозагоєння суттєво відрізняється від аналогічних процесів в неушкодженій дермі (Addis et al, 2020; Salas-Oropeza et al, 2020). Однак питання щодо проліферативного потенціалу клітин, підданих холодовому стресу в умовах ранозагоєння в присутності опіюйдних пептидів залишається відкритим. В роботі (Salas-Oropeza et al, 2020) було показано, що одним із тестів на проліферативну і міграційну активність клітин в умовах ранозагоєння *in vitro* є модель «ранової поверхні». Приймаючи до уваги вище сказане, на наступному етапі

експериментів проводили дослідження впливу синтетичного нейропептиду на проліферацію клітин після механічного ушкодження в умовах холодового стресу. Виходячи з результатів, представлених на рис. 4, встановлено, що коефіцієнт проліферації клітин в умовах холодового стресу достовірно ($p < 0,05$) зменшувався після механічного ушкодження у порівнянні з контролем у 2,2 рази (рис. 4).

Додавання в культуральне середовище синтетичного лей-енкефаліну у концентрації 10 мкг/л сприяло достовірно ($p < 0,05$) збільшенню КП в 2,5 рази у порівнянні з результатами після холодового стресу. При збільшенні дози синтетичного нейропептиду до 100 і 500 мкг/л спостерігалась аналогічна тенденція щодо коефіцієнта проліферації клітин (рис. 4). Таким чином, додавання синтетичного лей-енкефаліну у культуральне середовище до клітинного моношару з рановою поверхнею, сприяло підвищенню проліферативного потенціалу клітин, підданих холодовому стресу незалежно від його концентрації (10, 100 і 500 мкг/л). Ймо-

вірно така відмінність показників проліферативної активності фібробластів в умовах механічного ушкодження моношару відносно неушкодженого пов'язана з механізмами ранозагоєння на клітинному рівні.

Відомо, що на моделі механічного ушкодження одним з інформативних показників проліферації і міграції клітин є оцінка площі ушкодження моношару. (Addis et al, 2020) Для з'ясування впливу нейропептиду лей-енкефаліну на площу загоєння моношару клітин в умовах холодового стресу нейропептид додавали в концентраціях (10–100–500 мкг/л) до моменту моделювання холодового стресу і після 24 год культивування. Площу загоєння «рани» оцінювали через 24 і 48 год після механічного пошкодження (рис. 5). Встановлено, що після холодового стресу площа ушкодження в моношарі протягом 24 і 48 год культивування складала $82 \pm 2,2$ і $46 \pm 6,1$ % відповідно, що достовірно ($p < 0,05$) перевищувала контрольні значення (моношар в умовах нормотермії через 24 і 48 год) $35 \pm 5,5$ і $10 \pm 0,5$ %, відповідно (рис. 5). Додавання до культурального середовища лей-енкефаліну в діапазоні концентрацій (10–100–500 мкг/л) призводило до достовірного ($p < 0,05$) зменшення площі ушкодження в моношарі вже через 24 культивування клітин, підданих холодовому стресу: у 2,1; 3,2 і 1,5 рази, відповідно, у порівнянні зі значеннями площі після холодового стресу. Через 48 год культивування, тенденція вірогідного з меншення площі ушкодження після додавання нейропептиду, у порівнянні з холодним стресом зберігалась незалежно від їхньої концентрації в середовищі. Однак, необхідно визначити, той факт, що після додавання нейропептиду у концентрації 100 мкг/л площа ушкодження складала ($5 \pm 0,05$ %), що достовірно ($p < 0,05$) було менше значень даного параметру при концентраціях нейропептиду 10 мкг/л ($14 \pm 1,2$ %) і 500 мкг/л ($24 \pm 0,9$ %). В цілому динаміка зміни площі ранозагоєння на моделі механічного ушкодження моношару корелює з приведеними вище результатами щодо індексу проліферації.

Виявлена в дослідженнях протекторна дія синтетичного нейропептиду в умовах холодового стресу на процеси проліферації клітин після механічного ушкодження, може бути по-

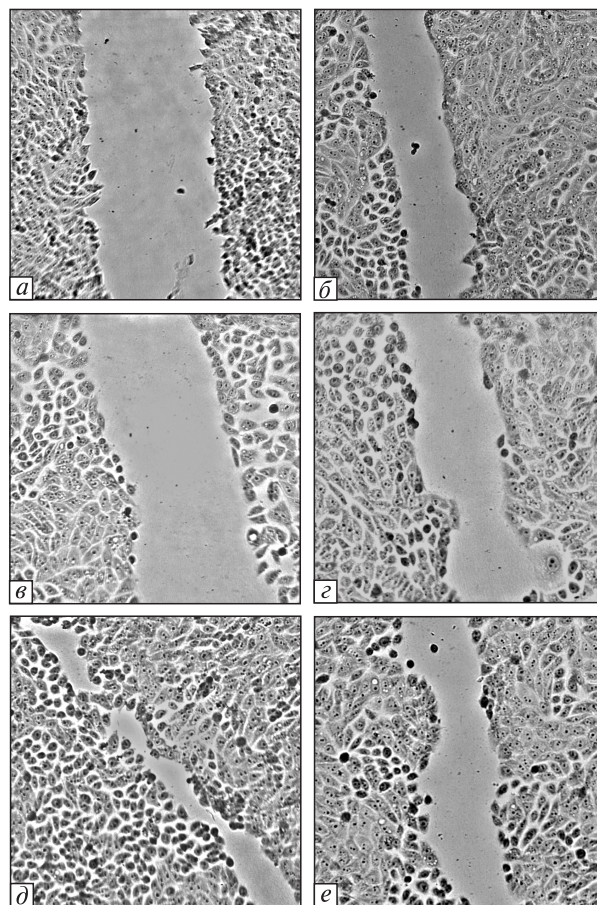


Рис. 6. Мікрофотографії моношару клітин L929 після механічного пошкодження і додавання до культурального середовища синтетичного нейропептиду в концентраціях (10–100–500 мкг/л) та наступною дією холодового стресу через 24 год культивування: а – 0 год після ушкодження ; б – контроль, в – холодовий стрес; г – концентрація нейропептиду 10 мкг/л; д – концентрація нейропептиду 100 мкг/л; е – концентрація нейропептиду 500 мкг/л. 3б. $\times 200$

в'язана з його впливом на метаболізм і як наслідок функціональну активність клітин.

Таким чином, в результаті проведених досліджень було встановлено дозозалежний протекторний вплив синтетичного нейропептиду на процеси проліферації в неушкодженому моношарі і після моделювання ранової поверхні в умовах холодового стресу.

Підсумовуючи отримані експериментальні результати, а також приймаючи до уваги дослідження (Tang et al, 2011), можна припустити, що антиапоптотична дія синтетичного лей-

енкефаліну в умовах холодового стресу може бути пов'язана з активацією δ -опіоїдних рецепторів, яка призводить до стабілізації потенціалу мітохондріальної мембрани і запобігає ініціації апоптозу клітин. Тому в основі пояснення збільшення проліферативного потенціалу клітин в умовах холодового стресу у присутності синтетичного нейропептиду в ушкодженому і неушкодженому моношарі фібробластів L929 може бути його антиапоптотична дія. Також, одним із механізмів протекторної дії синтетичного лей-енкефаліну може бути стримання стрес-індукованих вільнорадикальних процесів і підвищення біоенергетичного стану клітин і їхньої метаболічної активності. Для пояснень дозозалежної протекторної дії синтетичного лей-енкефаліну в умовах холодового стресу можливо долучити той факт, що під його впливом в клітинах активується NO-синтаза і утворюється оксид азоту NO, який суттєво впливає на проліферацію клітин у залежності від концентрації (Животова та ін, 2012). Наприклад, на клітинній лінії PC12 було показано, що при низьких концентраціях NO стимулює проліферацію, а при високих навпаки, пригнічує (Bal-Price et al, 2006). Тобто, виходячи з вище приведених результатів, концентрація NO, який утворюється під дією синтетичного лей-енкефаліну при використанні високих концентрацій, може пояснювати відсутність стимулюючого ефекту нейропептиду на проліферацію клітин в моношарі без механічного пошкодження. Дещо інша тенденція була визначена в моношарі з механічним ушкодженням: стимулюючий вплив синтетичного нейропептиду на процеси проліферації клітин спостерігається при всіх використаних в експерименті концентраціях (10, 100 і 500 мкг/л). Пояснень щодо дозозалежної протекторної дії синтетичного лей-енкефаліну в умовах «ранової поверхні» і неушкодженого моношару, підданих холодовому стресу, на основі отриманих даних недостатньо, тому для обґрунтованої відповіді необхідні додаткові дослідження.

Таким чином, в результаті проведених досліджень встановлено, що холодовий стрес ініціює апоптоз, некроз та уповільнює проліферацію клітин в ушкодженому і неушкодженому моношарі фібробластів лінії L929. Доведено, що протекторна дія синтетичного лей-енке-

фаліну є дозозалежною і найбільша ефективність синтетичного нейропептиду щодо запобігання апоптозу клітин і стимуляції проліферативного потенціалу в умовах холодового стресу спостерігається в концентрації 10–100 мкг/л. Доведено, що протекторна дія синтетичного лей-енкефаліну суттєво відрізняється у залежності від дози в умовах холодового стресу при ранозагоєнні і в неушкодженому моношарі. Для поглибленого з'ясування впливу синтетичного лей-енкефаліну на апоптоз, некроз і проліферативну активність клітин в умовах холодового стресу і ранозагоєнні необхідні подальші дослідження.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить результатів будь-яких досліджень за участю людей і тварин в якості об'єктів досліджень.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Роботу виконано у рамках держбюджетної теми 0116U003499 НАН України.

PREINCUBATION OF L929 LINE FIBROBLASTS WITH SYNTHETIC LEU-ENKEPHALIN TYR-D-ALA-GLY-PHE-LEU-ARG (DALARGIN) PRESERVES THEIR PROLIFERATIVE POTENTIAL UNDER COLD STRESS

O.K. Gulevskyy, N.M. Moisieieva,
O.L. Gorina, O.S. Sidorenko

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Perejaslavskaya str., 23, Kharkiv, 61016, Ukraine

E-mail: profgulevskyy@gmail.com,
ukrainanataliy@gmail.com, ogorina2603@gmail.com

The effect of synthetic leu-enkephalin on apoptosis, necrosis and proliferative properties of fibroblasts L929 cell line in the monolayer without damage and with a «wound surface» under cold stress was studied. It is proved that cold stress initiates apoptosis, necrosis and slows down cell proliferation in the damaged and undamaged monolayer of L929 fibroblasts. Preincubation of cells with synthetic leu-enkephalin before modeling for cold stress leads to a probable ($p < 0,05$) decrease in the number of fibroblasts with morphological signs of necrosis and apoptosis and a probable ($p < 0,05$) increase in the proliferative potential of cells in intact monolayer and with a wound surface. It has been found that the protective effect of synthetic leu-enkephalin is dose-

dependent and differs significantly under conditions of cold stress during wound healing. The greatest effectiveness of synthetic leu-enkephalin to prevent cell apoptosis and stimulate cell proliferation under cold stress is observed at a concentration of 10 and 100µg/l.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Addis R, Cruciani S, Santaniello S et al. (2020) Fibroblast Proliferation and Migration in Wound Healing by Phytochemicals: Evidence for a Novel Synergic Outcome Int J Med Sci 17(8):1030–1042. doi: 10.7150/ijms.43986
- Al-Fageeh MB, Smales MC. (2006) Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems J Biochem 397(2): 247–259. doi: 10.1042/BJ20060166
- Bal-Price A, Gartlon J, Browna GC. (2006) Nitric oxide stimulates PC12 cell proliferation via cGMP and inhibits at higher concentrations mainly via energy depletion Nitric Oxide 14(3):238–246. doi: 10.1016/j.niox.2005.10.002
- Collins JA, Schandi CA, Young KK et al. (1997) Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis J Histochem Cytochem 45(7):923–934. doi: 10.1177/002215549704500702
- Denker SP, Barber DL. (2002) Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1 J Cell Biol 159(6):1087–1096. doi: 10.1083/jcb.200208050
- Elmore S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 35(4):495–516. doi: 10.1080/01926230701320337
- Gulevskyy AK, Moiseyeva NN, Gorina OL. (2019) Antiapoptotic effect of leu-enkephalin neuropeptide on donor blood leukocytes under cold stress. (Article in Ukrainian). Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine 4:94–100. doi: 10.15407/dopovidi2019.04.094
- Jaber T Mayahi Mohammed, Ismailova JG, Astayeva MD, Klichkhanov NK. (2012) Dalargin effect on free radical processes in rat's blood at hypothermia. Problems of Cryobiology 22(3):302
- Kyrychenko AM, Kovalenko OG. (2010) Genetically programmed cell death: the base of homeostasis and form of phytoimmunity response. (Article in Ukrainian) Cytol Genet 44(4):70–81
- Khar AB, PardhasaradhiVV, Ali AM, Kumari AL. (2003) Protection conferred by Bcl-2 expression involves reduced oxidative stress and increased glutathione production during hypothermia-induced apoptosis in AK-5 tumor cells Free Radic Biol Med 35(8):949–957. doi: 10.1016/S0891-5849(03)00469-6
- Millan MJ, Morris BJ. (1988) Long-term blockade of mu-opioid receptors suggests a role in control of ingestive behaviour, body weight and core temperature in the rat Brain Res 450(1–2):247–258. doi: 10.1016/0006-8993(88)91564-8
- Neutelings T, Lambert CA, Nussgens BV, Colige AC. (2013) Effects of mild cold shock (25 °C) followed by warming up at 37 °C on the cellular stress response PLoS One 8(7):e69687. doi: 10.1371/journal.pone.0069687
- Oeltgen PR, Nilekani SP, Nuchols PA et al. (1988) Further studies on opioids and hibernation: delta opioid receptor ligand selectively induced hibernation in summer-active ground squirrels Life Sci 43(19):1565–1574. doi: 10.1016/0024-3205(88)90406-7
- Pan'kova TD, Timoshin SS. (1990) Proof of stimulating effect of dalargin of the process of cell division through opiate receptors. (Article in Russian) Biull Eksp Biol Med 110(7):96–98
- Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H. (1999) Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species FASEB J 13(1):155–168. doi: 10.1096/fasebj.13.1.155
- Salas-Oropeza J, Jimenez-Estrada M, Perez-Torres A et al. (2020) Wound Healing Activity of the Essential Oil of *Bursera morelensis*, in Mice Mol 25(8):1795. doi: 10.3390/molecules25081795
- Slepko NG, Kozlova MV. (1992) The effect of the synthetic leu-enkephalin analog dalargin on the proliferative activity of glioma C6 cells and on the intensity of their DNA synthesis (Article in Russian) Tsitologiya 34(1):66–73
- Tadzhibova LT, Astaeva MD, Ismailova JG et al. (2011) Effects of Dalargin on Free Radical Processes in the Blood of Rats Exposed to Moderate Hypothermia Bull Exp Biol Med 150:304–306. doi: 10.1007/s10517-011-1128-z
- Tang B, Zhang Y, Liang R et al. (2011) 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 28(6):1077–1085. doi: 10.3892/ijmm.2011.784
- Vasilyev AV, Bukharova TB, Volkov AV. (2014) Effects of Dalarginum on proliferation of multipotent mesenchymal stromal cells, dermal fibroblasts, and human osteosarcoma cells in vitro (Article in Russian) Genes and Cells 9(4):76–80
- Zhivotova EYu, Lebedko OA, Timoshin SS. (2012) Effect of leu-enkephalin analogues on the process of DNA synthesis and free radical oxidation in gastric mucous lining of albino rats (Article in Russian) Dalnevostoch Med J 1:103–106

Надійшла в редакцію 27.03.21
Після доопрацювання 24.12.21
Прийнята до друку 18.07.22