

## Антиапоптотична дія синтетичного лей-енкефаліну даларгіну на лейкоцити щурів у моделі холодового стресу *in vivo*

UDC 577.112.5: 591.322.2-148.11: 57.086.13: 576.367

I.I. Shcheniavsky

### Anti-Apoptotic Effect of Synthetic Leu-enkephalin Dalargin on Rat Leukocytes in Cold Stress Model *in Vivo*

**Реферат:** Досліджували захисний вплив синтетичного аналога лей-енкефаліну даларгіну на лейкоцити периферичної крові теплокровних тварин, підданих холодовому стресу. За допомогою конфокальної мікроскопії досліджено вплив даного пептиду і холодового стресу *in vivo* на клітинний склад лейкоконцентрату, життєздатність лейкоцитів і ступінь фрагментації ДНК у лейкоцитах щурів. Встановлено, що у тварин, яким перед початком охолодження вводили даларгін, зниження відносного вмісту лімфоцитів і підвищення вмісту нейтрофілів були значуще менш виражені, ніж у тварин без введення даларгіну. Також показано, що введення даларгіну сприяло підвищенню життєздатності лейкоцитів периферичної крові щурів, підданих холодовому стресу. Попереднє введення тваринам даларгіну статистично значуще знижувало як ступінь фрагментації ДНК, так і відносний вміст у периферичній крові лейкоцитів із фрагментованою ДНК. Одночасне введення тваринам антагоніста опіатних рецепторів налоксону усувало захисну дію агоніста опіатних рецепторів даларгіну. Отримані результати свідчать про опосередковану опіатними рецепторами антиапоптотичну дію даларгіну на лейкоцити периферичної крові в умовах холодового стресу *in vivo*.

**Ключові слова:** нейропептиди, енкефаліни, даларгін, холодний стрес, апоптоз, фрагментація ДНК.

**Abstract:** In this research, a protective effect of synthetic analogue of leu-enkephalin dalargin on peripheral blood leukocytes of cold stress-exposed homeotherms, has been investigated. The impact of this peptide and *in vivo* cold stress on cell composition of leukoconcentrate, leukocyte viability and DNA fragmentation degree in rat leukocytes, has been studied by using confocal microscopy. A decreased relative count of lymphocytes and an increased neutrophil one were established as significantly less pronounced in the animals injected with dalargin before cooling, than in non-handled ones. The dalargin administration was also shown to enhance the viability of peripheral blood leukocytes in rats exposed to cold stress. Preliminary administration of dalargin to animals significantly reduced both the degree of DNA fragmentation and a relative count of leukocytes with fragmented DNA in peripheral blood. Simultaneous introduction of opioid receptor antagonist naloxone to animals eliminated a protective effect of opioid receptor agonist dalargin. Our findings demonstrated the opioid receptor-mediated antiapoptotic effect of dalargin on peripheral blood leukocytes under *in vivo* cold stress.

**Key words:** neuropeptides, enkephalins, dalargin, cold stress, apoptosis, DNA fragmentation.

Відомо, що для більшості клітин гоміотермних тварин апоптоз є однією з причин загибелі в умовах холодового стресу [4, 18, 28, 31]. У той самий час для клітин гетеротермів характерна здатність протистояти апоптозу, який індукується супутнім зимовій сплячці зниженням температури тіла [17].

З літературних джерел відомо, що деякі речовини пептидної природи, отримані з тканин гібернуючих або холодоадаптованих видів, здатні підвищувати стійкість до зниження температури тіла гоміотермів [6, 9, 23]. Значне місце в регуляції зимової сплячки відводиться таким нейропептидам, як лей- і мет-енкефаліни, а також  $\beta$ -ендорфіни [11, 14, 29]. В експериментах із синтетичним лей-енкефаліном, відомим як да-

The apoptosis is now acknowledged to be one of the causes of most cells death in homeotherms under cold stress [10, 16, 26, 29]. At the same time, the heterotherms have the ability to resist the apoptosis, induced by body temperature decrease that accompanies hibernation [9].

Many recent studies have shown some substances of peptide origin, obtained from tissues of hibernating or cold-adapted species, to be able to enhancing the resistance to body temperature decrease in homeotherms [18, 21, 33]. Such neuropeptides as leu- and met-enkephalins, as well as  $\beta$ -endorphins are mainly involved into the regulation of hibernation [3, 6, 27]. Experiments with synthetic leu-enkephalin, known as dalargin [21], have demonstrated its anti-stress effect, manifested, in particular,

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

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

**Адреса для кореспонденції:**

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: ivanhou11@gmail.com

**Address for correspondence:**

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: ivanhou11@gmail.com

Надійшла 19.03.2019

Прийнята до друку 08.02.2021

Received March, 19, 2019

Accepted February, 08, 2021

© 2021 I.I. Scheniavsky. 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.

ларгін [6], продемонстровано його антистресорну дію, яка, зокрема, проявляється у здатності підвищувати холодостійкість гоміотермних організмів. Очевидно, цей ефект даларгіну може бути пояснений його впливом на здатність клітин підтримувати іонний гомеостаз за енергодефіциту, викликаного зниженням продукції АТФ. Відомо, що в умовах нормотермії значна частина АТФ використовується в процесі трансляції білка (25–30%) і на забезпечення функції  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ ази (19–28%) [15]. Для успішного протистояння впливу холодового стресу вирішальною є здатність клітин переорієнтувати метаболізм АТФ на забезпечення активного транспорту іонів. Порушення градієнтів концентрацій  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$  між внутрішньо- і позаклітинним середовищем викликає деполяризацію мембран, через яку відбувається неконтрольований приток  $\text{Ca}^{2+}$  через потенціал-залежні  $\text{Ca}^{2+}$ -канали. Внаслідок цього збільшується внутрішньоклітинна концентрація вільного цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , що призводить до активації  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних фосфоліпаз і протеаз, які ще більше прискорюють деполяризацію клітинної та мітохондріальних мембран, і, врешті-решт, – до апоптозу або некрозу клітин. У клітин, які перебувають у неактивному стані, на забезпечення роботи  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ ази витрачається 20–80% усієї виробленої АТФ [12]. Можливо даларгін, подібно до ендогенних енкефалінів та інших опіатів, пригнічує деякі енергозалежні процеси в клітинах (насамперед, синтез білків), зберігаючи таким чином дефіцитну АТФ для підтримки іонного гомеостазу з залученням активного іонного транспорту. Такий ефект він може надавати як безпосередньо, взаємодіючи з опіатними рецепторами на мембрані самої клітини, так й опосередковано – через нейроендокринну систему і продукуювані нею фактори. Введення шурам даларгіну перед моделюванням стану помірної гіпотермії запобігало активації процесів перекисного окислення ліпідів, зниженню антиоксидантного захисту еритроцитів та сприяло стабілізації структурно-функціонального стану їх мембран [34]. Дослідження ролі опіатних рецепторів та їх лігандів у механізмі протидії апоптозу, індукованому холодовим стресом, є одним із фундаментальних завдань кріобіології. Згідно з наявними літературними даними [2, 10, 22, 24, 32] рецептори до енкефалінів присутні на поверхні не тільки нервових, але й імунокомпетентних клітин.

У зв'язку з вищевикладеним метою даної роботи було вивчення захисної дії синтетичного аналога лей-енкефаліну (препарату «Даларгін») на лейкоцити периферичної крові теплокровних тварин, підданих холодовому стресу.

in the ability to increase the cold resistance of homeothermic organisms. Obviously, this effect of dalargin may be explained by its impact on cell ability to maintain ionic homeostasis in energy deficiency, resulted from a decreased ATP production. It is known, that under normothermy, a significant part of ATP is used during protein translation (25–30%) and to ensure the  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  function (19–28%) [7]. The ability of cells to reorient ATP metabolism for ensuring an active ion transport is crucial for successful resistance to cold stress exposure. A disorder in  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  concentration gradients between intra- and extracellular media causes the membrane depolarization, thus inducing an uncontrolled  $\text{Ca}^{2+}$  influx through potential-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels. As a result, an intracellular concentration of free cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  increases, activating thereby the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phospholipases and proteases, which further accelerate the cell and mitochondrial membrane depolarization and, finally, cell apoptosis or necrosis occur. Cells in inactive state use 20–80% of all produced ATP to ensure the  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  function [43]. Dalargin as endogenous enkephalins and other opioids appears likely inhibit some energy-dependent processes in cells (protein synthesis, primarily), and thus preserves a deficient ATP to maintain ionic homeostasis with active ion transport involvement. Such an effect can be realized both directly, by interacting with opioid receptors on the membrane of cell itself, and indirectly, *i. e.* through the neuroendocrine system and the factors it produces. Dalargin administration to rats before simulating the moderate hypothermia prevented the lipid peroxidation activation, a decrease in erythrocyte antioxidant protection and stabilized the structural and functional state of their membranes [34]. The study of the role of opioid receptors and their ligands in mechanism of counteracting the cold stress-induced apoptosis is among the fundamental tasks in cryobiology. The data [1, 12, 17, 19, 31] reported, that the receptors to enkephalins were present on surface of not only nerve cells but immunocompetent ones as well.

Proceeding from the mentioned above, the objective herein was to investigate a protective effect of synthetic analogue of leu-enkephalin (Dalargin drug) on peripheral blood leukocytes of cold stress-exposed homeotherms.

### Materials and methods

Experiments in animals were carried out in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (№3447-IV of February, 21, 2006) in compliance with the requirements of



## Матеріали та методи

Експерименти на тваринах проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження (№3447-IV від 21.02.2006 р.) із дотриманням вимог комітету з біоетики інституту, узгоджених із положеннями «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

У роботі використовували 6-місячних білих щурів-самців лінії Вістар із середньою масою ( $183 \pm 15$ ) г.

Препарат «Даларгін» («Пептидні технології», Росія) у вигляді 0,25%-го розчину фармацевтичної субстанції вводили щурам внутрішньочеревинно у дозі 100 мкг/кг маси, «Налоксон» («Здоров'я народу», Україна) – у дозі 500 мкг/кг.

Для вивчення антиапоптотичної дії даларгіну на лейкоцити в умовах холодового стресу *in vivo* щурів перед початком експерименту розділили на 4 групи ( $n = 5$  у кожній): 1 (інтактна) – тварини, яким не вводили препарати і яких не піддавали холодовому стресу; 2 (контроль) – тварини, яким вводили фізіологічний розчин і яких піддавали холодовому стресу; група 3 – тварини, яким вводили даларгін і яких піддавали холодовому стресу; 4 – тварини, яким разом із даларгіном внутрішньочеревинно вводили антагоніст опіатних рецепторів налоксон і яких піддавали холодовому стресу.

Для моделювання холодового стресу щурів розміщали у закритих резервуарах (висота 8 см) із сумішшю води і льоду. Температура води в резервуарах становила  $0-2^{\circ}\text{C}$ , рівень води – 5 см. За таких умов тварини протягом усього експерименту стояли на дні резервуара без можливості значно піднятися над рівнем води. Температура в приміщенні становила  $20^{\circ}\text{C}$ . Через кожні 10 хв тварин діставали з води і електронним термометром визначали ректальну температуру на глибині 2 см. При досягненні ректальної температури  $20^{\circ}\text{C}$  тварин діставали з води, ретельно витирали і залишали для саморозігрівання при кімнатній температурі. Через 24 години після цього тварин виводили з експерименту шляхом декапітації. Ректальна температура щурів усіх груп на момент декапітації дорівнювала  $\approx 38^{\circ}\text{C}$  ( $37,8-38,1^{\circ}\text{C}$ ). Після декапітації збирали кров для виділення лейкоцитів, використовуючи в якості антикоагулянту цитратний буфер (3% цитрату натрію, 2% глюкози, рН 7,4). Лейкоконтрат отримували шляхом центрифугування протягом 25 хв при 300g. Загальний вміст і популяційний склад лейкоцитів периферичної крові визначали в мазку крові, фіксованому розчи-

the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, agreed to the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The 6-month-old white male Wistar rats with average body weight of ( $183 \pm 15$ ) g were used in the work.

Rats were injected intraperitoneally with Dalargin drug (Peptidnyye Tekhnologii, Russia) as a 0.25% solution of pharmaceutical substance at a dose of 100  $\mu\text{g}$  / kg body weight, and with Naloxone (Zdorovia Narodu, Ukraine) at a dose of 500  $\mu\text{g}$  / kg.

To study an antiapoptotic effect of dalargin on leukocytes under *in vivo* cold stress, the rats before experiment were divided into 4 groups ( $n = 5$  in each): the group 1 (intact) comprised the animals received neither drugs, nor cold stress; the group 2 (control) was the animals, injected with saline and exposed to cold stress; in the group 3 the rats were administered with dalargin and subjected to cold stress; those animals, injected intraperitoneally with opioid receptor antagonist naloxone together with dalargin, as well as exposed to cold stress, made the group 4.

To simulate the cold stress, the rats were placed in the closed tanks (8 cm height) with water and ice mixture. The water temperature in tanks was  $0-2^{\circ}\text{C}$ , the water level was 5 cm. Under such conditions, the animals were standing at the bottom of the tank, unable to rise far more above the water level throughout the experiment. The room temperature was  $20^{\circ}\text{C}$ . Every 10 min, the animals were removed from the water and a rectal temperature was measured with electronic thermometer at 2 cm depth. When a rectal temperature reached  $20^{\circ}\text{C}$ , the animals were then removed from water, thoroughly wiped and left for self-warming at room temperature. In 24 hours, when a deep hypothermia ( $20^{\circ}\text{C}$ ) was achieved, the animals were sacrificed by decapitation. The rectal temperature of rats of all the groups at the moment of decapitation was  $\approx 38^{\circ}\text{C}$  ( $37.8-38.1^{\circ}\text{C}$ ). After decapitation, the blood was collected for leukocyte isolation using citrate buffer (3% sodium citrate, 2% glucose, pH 7.4) as anticoagulant. Leukoconcentrate was obtained by centrifugation for 25 min at 300 g. The total count and population composition of peripheral blood leukocytes were determined in blood smear fixed with May-Grunwald solution and stained by Romanowsky (both solutions produced by Mini-Med, Russia). The leukogram was counted in 200 cells. The obtained results were interpreted by the total



ном Май-Грюнвальда і забарвленому за Романовським (обидва розчини виробництва «Міні-Мед», Росія). Лейкограму виводили з розрахунку на 200 клітин. Отримані результати інтерпретували за загальним вмістом лейкоцитів, відносним вмістом нейтрофілів і лімфоцитів, а також за їх співвідношенням.

Життєздатність лейкоцитів визначали за допомогою конфокальної мікроскопії, використовуючи методику подвійного забарвлення ядровмісних клітин флуорохромами акридиновим помаранчевим (АП) і бромистим етидієм (БЕ) у кінцевих концентраціях 0,001% [25]. Мікрофотозйомку здійснювали інвертованим конфокальним мікроскопом «LSM 510 META» («Carl Zeiss», Німеччина). Збудження флуорохрому АП проводили аргонним лазером із довжиною хвилі 488 нм, а БЕ – при 543 нм. Емісію АП реєстрували при 530 нм, а БЕ – при 620 нм. Запис зображення здійснювали методом multitrack. Результуюче зображення отримували шляхом накладення двох зображень, зареєстрованих у різних (зеленій і червоній) спектра за допомогою програмного забезпечення «AimImage Examiner» («Carl Zeiss»). Співвідношення кількості живих, апоптотичних і некротичних клітин визначали за співвідношенням у зображенні зелених, помаранчевих і червоних пікселів із використанням пакета програм «ImageJ» («Laboratory for Optical and Computational Instrumentation», США) [33].

Фрагментацію ДНК лейкоцитів визначали за методикою D. P. Evenson [16], модифікованою для клітин, що містять РНК, оскільки АП, зв'язуючись із молекулами РНК, випромінює в тому самому спектрі, що й у разі зв'язування з одноланцюговими фрагментами ДНК. Лейкоконцентрат (0,20 мл) змішували з 0,40 мл буферного розчину, який містив 0,1% Тритону X-100 («Sigma Aldrich», США); 0,15 М NaCl і 0,08 М HCl, pH 1,4. Через 30 с у проби додавали 1,2 мл розчину, який готували шляхом змішування 370 мл 0,1 М цитратного буфера (pH 6,0); 630 мл 0,2 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 мМ EDTA; 0,15 М NaCl та 100 мкг/мл РНК-ази А («Sigma Aldrich», США) та інкубували при 37°C протягом 20 хв. Після інкубації в проби додавали розчин хроматографічно очищеного АП («Polysciences, Inc.», США) у розрахунку 100 мкг/мл і через 3 хв досліджували зразки на конфокальному мікроскопі. Збудження АП проводили аргонним лазером із довжиною хвилі 488 нм, а емісію реєстрували в зеленому (530 нм) і червоному (620 нм) діапазоні спектра. Ядра клітин, які не містили фрагментованої ДНК, забарвлювалися АП і світилися зеленим кольором, а ядра клітин, у яких поряд із нативною знахо-

count of leukocytes, relative count of neutrophils and lymphocytes, and their ratio as well.

Leukocyte viability was measured by using confocal microscopy with dual acridine orange (AO) / ethidium bromide (EB) staining at final concentrations of 0.001% [22]. Photomicrography was performed with an inverted confocal microscope LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany). The AO and EB fluorochromes were excited using argon laser with 488 and 543 nm wavelength, respectively. The AO and EB emissions were recorded at 530 and 620 nm, accordingly. The image was recorded using multitrack technique. The resulting image was obtained via overlaying two images registered in different (green and red) region using AimImage Examiner software (Carl Zeiss). The ratio of living, apoptotic and necrotic cell number was determined by the ratio of green, orange and red pixels in the image using the image-processing program ImageJ (Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, USA) [32].

The DNA fragmentation in leukocytes was determined by the method of D.P. Evenson [8], modified for cells containing significant number of RNA, since the AO, when binding to RNA molecules exhibited fluorescence within the same range as in case of binding to single-stranded DNA fragments. Leukoconcentrate (0.20 ml) was mixed with 0.40 ml of buffer solution, including 0.1% Triton X-100 (Sigma Aldrich, USA); 0.15 M NaCl and 0.08 M HCl, pH 1.4. After 30 s, the specimens were supplemented with 1.2 ml of the solution, prepared by mixing 370 ml of 0.1 M citrate buffer (pH 6.0); 630 ml of 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 mM EDTA; 0.15 M NaCl and 100 µg / ml RNAase A (Sigma Aldrich, USA) and incubated at 37°C for 20 min. After incubation, a chromatographically purified AO (Polysciences, Inc., USA) in an amount of 100 µg / ml was supplemented to specimens and 3 min later they were examined with confocal microscope. The AO excitation was performed using argon laser with 488 nm wavelength, and the emission was recorded in green (530 nm) and red (620 nm) regions. Cell nuclei without fragmented DNA were stained with AO and fluoresced green, but those, having both native and fragmented DNA, were yellow-orange. The number of green and orange pixels of each image was counted using the ImageJ software package (USA). The results obtained after processing the photomicrographs of each sample were summarized and the ratio of green and orange pixels, corresponded to that of native and fragmented DNA in all the cells, was determined. Also, the total number of cells and that with fragmented DNA were visually counted



дилася й фрагментована ДНК, – жовто-помаранчевим кольором. Кількість зелених і помаранчевих пікселів кожного зображення підраховували, використовуючи пакет програм «ImageJ» (США). Отримані після обробки мікрофотознімків кожної проби результати підсумовували і знаходили співвідношення зелених і помаранчевих пікселів, що відповідало співвідношенню нативної і фрагментованої ДНК у всіх клітинах. Також на знімках візуально підраховували загальну кількість клітин і кількість клітин із фрагментованою ДНК для визначення процентного вмісту останніх.

В обох методиках із кожного зразка лейкоконцентрату робили 10 мікрофотознімків, щоб сумарна кількість забарвлених флуорохромами клітин становила не менше 1000.

Статистичну обробку результатів виконували за допомогою комплексної програми «STATA» («StataCorp LLC», США) з використанням Н-критерію Краскела-Уоліса і U-критерію Манна-Уїтні.

### Результати та обговорення

Відомо, що тривалий стресуючий вплив може викликати різні імунні реакції [27]. Встановлено, що у тварин за умов стресу змінюється співвідношення субпопуляцій лімфоцитів у селезінці, лімфатичних вузлах і тимусі [30], у результаті чого підвищується відносний вміст цитотоксичних Т-кілерів (CD8<sup>+</sup>), а також натуральних кілерів. Ці зміни не можуть не позначитися на популяційному складі периферичної крові. Літературні дані показують, що охолодження тіла протягом обмеженого часу стимулює імунну систему, однак занадто тривалий холодний вплив пригнічує її нормальне функціонування [5]. Зокрема відомо, що в разі стресуючого впливу на організм у периферичній крові спостерігаються лімфопенія і нейтрофіліоз [19]. Було встановлено, що холодний вплив викликає підвищення вмісту лейкоцитів у периферичній крові переважно за рахунок різкого збільшення кількості гранулоцитів [20].

Як видно з таблиці, у крові тварин, яким не вводили препарати і яких не піддавали холодному стресу (група 1), містилося 8,5–11,2 тис. лейкоцитів у 1 мл (у середньому (9,6 ± 1,1) тис./мл). При цьому відносний вміст лімфоцитів становив 59–71,5%, а нейтрофілів – 11,7–28,8%. Таке майже трикратне переважання в крові лімфоцитів над нейтрофільними гранулоцитами є характерним для тварин даного виду [7]. У щурів груп, підданих холодному стресу, загальний вміст у периферичній крові лейкоцитів був у межах норми, однак відзначалися значуще зниження відносного вмісту лімфоцитів і підви-

by images to determine the percentage of the latter.

In both techniques, 10 photomicrographs were taken from each sample of leukoconcentrate so that the total number of fluorochrome-stained cells was at least 1000.

The results were statistically processed with STATA software package (StataCorp LLC, USA) using the Kruskal-Wallis H-test and the Mann-Whitney U-test.

### Results and discussion

The prolonged stress is known to induce different immune responses [25]. The ratio of lymphocyte subpopulations in spleen, lymph nodes and thymus was established to change in animals under stress conditions [28], as a result the relative count of cytotoxic T-killers (CD8<sup>+</sup>), as well as natural killers increased. These changes can not but affect the population composition of peripheral blood. The reported data showed the body cooling within a limited time period to stimulate the immune system, but too long cold exposure inhibited its normal functioning [20]. In particular, it is known that in peripheral blood in case of stress exposure to a body, the lymphopenia and neutrophilia may occur [11]. Cold exposure was established to increase the leukocyte count in peripheral blood mainly due to a sharp rise of granulocyte count [13].

The Table demonstrates that in blood of animals, received neither drug nor cold exposure (group 1), there were 8,500 – 11,200 leukocytes in 1 ml (in average (9,600 ± 1,100) / ml). Herewith, the relative count of lymphocytes was 59–71.5%, and for neutrophils it made 11.7–28.8%. This almost threefold predominance of lymphocytes over neutrophilic granulocytes in blood is specific for animals of this species [23]. In rats of groups exposed to cold stress, the total count of peripheral blood leukocytes was within the normal limits, but a significant decrease in the relative count of lymphocytes and an increased count of neutrophils were revealed. In animals of group 3, these indices were significantly different from those in rats of group 1, herewith these changes were significantly less pronounced than in groups 2 and 4 ( $p \leq 0.01$ ).

Preliminary administration of dalargin to rats in 24 hrs after reaching a rectal temperature of 20°C neutralized a negative effect of *in vivo* cold stress on peripheral blood leukocytes (Fig. 1). In animals of all the groups exposed to cold stress, the relative count of viable nucleated cells in leukoconcentrate was lower than in group 1 (Fig. 1A).

щення вмісту нейтрофілів. У тварин групи 3 вказані показники статистично значуще відрізнялися від таких у щурів групи 1, при чому ці зміни були значуще менш виражені, ніж у групах 2 і 4 ( $p \leq 0,01$ ).

Попереднє введення щурам даларгіну через 24 години після досягнення ректальної температури 20°C нівелювало негативний вплив холодового стресу *in vivo* на лейкоцити периферичної крові (рис. 1). Відносний вміст у лейкоконцентраті життєздатних ядерних клітин тварин усіх груп, підданих холодовому стресу, був нижче, ніж у групі 1 (рис. 1, А). Відносний вміст життєздатних клітин у лейкоконцентраті тварин групи 3 був статистично значуще вище, ніж у групах 2 і 4 ( $p \leq 0,01$ ), однак нижче порівняно з групою 1. Відносний вміст у лейкоконцентраті апоптотичних клітин (рис. 1, В) у групах 2 і 4 був статистично значуще вище, ніж у групах 1 і 3 ( $p \leq 0,01$ ). У тварин, підданих холодовому стресу (групи 2–4), відносний вміст у лейкоконцентраті клітин, мембрани яких були проникні для БЕ (некротизованих), був значуще вище, ніж у групі 1 (рис. 1, С).

Слід зазначити, що до «життєздатних» лейкоцитів віднесені всі клітини, забарвлені АП зеленим кольором, незалежно від розмірів ядра. Тобто серед таких клітин були і лейкоцити на стадії пікнозу або фрагментації ядра, але клітинні мембрани яких були непроникні для БЕ. Визначення відносного вмісту в лейкоцитах периферичної крові щурів фрагментованої ДНК і відсотка лейкоцитів із фрагментованою ДНК дозволяє оцінити кількість клітин, що знаходяться на більш ранніх стадіях апоптозу. Як видно з рис. 2 і 3, вплив на дані показники холодового стресу, даларгіну і налоксону був подібний до виявленого за допомогою подвійного забарвлення. У всіх тварин холодовий стрес викликав статистично значуще підвищення як ступеня фрагментації ДНК, так і відносного вмісту в периферичній крові лейкоцитів із фрагментованою ДНК. Попереднє введення тваринам даларгіну статистично значуще знижувало обидва показники, причому ступінь фрагментації ДНК у клітинах знижувався до такого в групі 1. Ведення щурам даларгіну та налоксону усувало описані ефекти першого (див. рис. 1–3).

Таким чином, введення щурам перед початком моделювання холодового стресу даларгіну

Вплив холодового стресу *in vivo* на відносний вміст лімфоцитів (Л) і нейтрофільних гранулоцитів (НГ) у периферичній крові щурів через 24 години після охолодження до 20°C

Impact of *in vivo* cold stress on relative count of lymphocytes (L) and neutrophilic granulocytes (NG) in peripheral blood of rats 24 hrs after cooling down to 20°C

Група Group	Лейкоцити, 10 <sup>9</sup> /л Leukocytes, 10 <sup>9</sup> /l	Л, % L, %	НГ, % NG, %	НГ/Л NG/L
1	9,6 ± 1,1	66,3 ± 4,5	19,6 ± 5,7	0,302 ± 0,048
2	10,1 ± 0,8	47,5 ± 2,3*	37,2 ± 1,1*	0,786 ± 0,022*
3	9,8 ± 0,7	55,2 ± 2,4**	29,2 ± 1,8**	0,531 ± 0,020**
4	9,7 ± 0,8	48,6 ± 2,1*	35,2 ± 2,7*	0,728 ± 0,039*

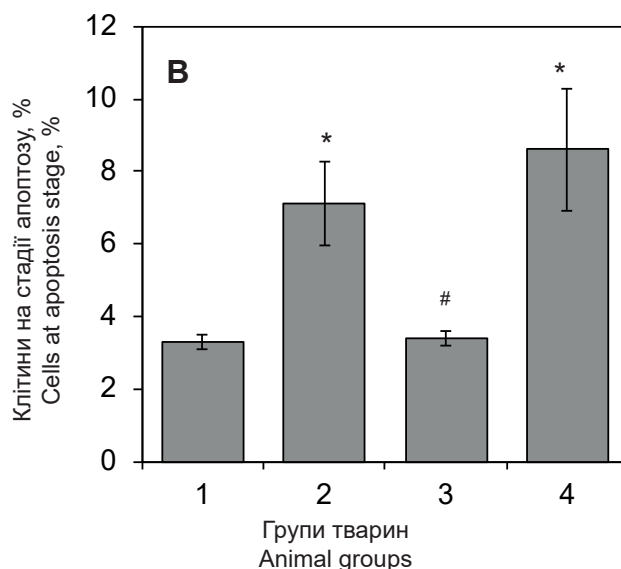
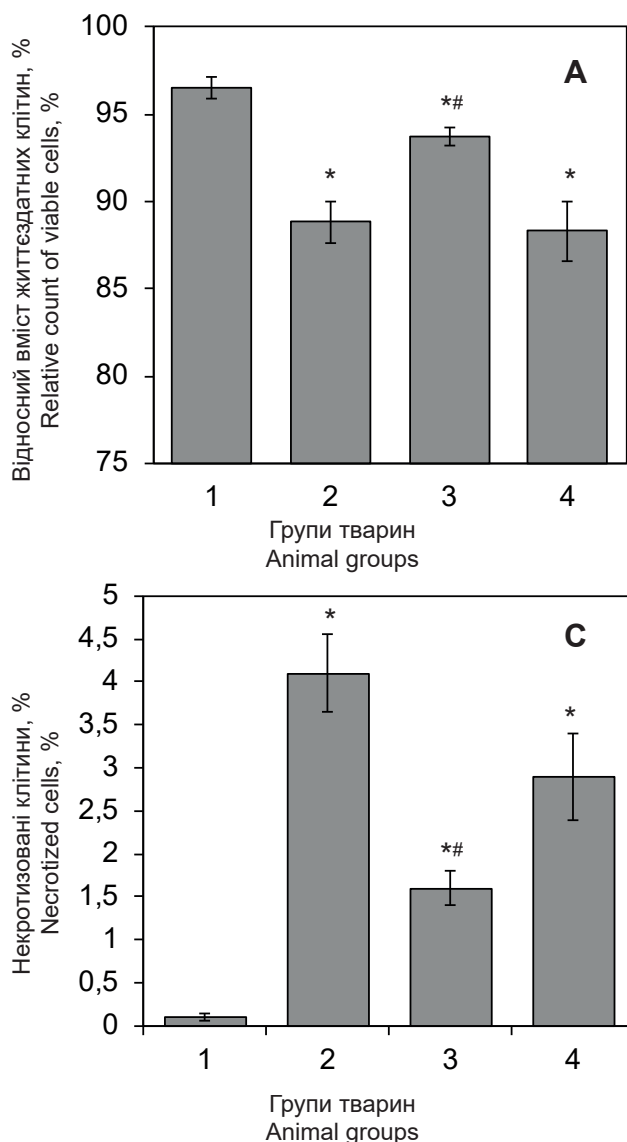
**Примітки:** відмінності статистично значущі порівняно з групою 1(\*) та з групами 2 і 4 (\*),  $p \leq 0,01$ .

**Notes:** differences are significant as compared with group 1 (\*) and groups 2 and 4 (\*),  $p \leq 0.01$ .

The relative count of viable cells in leukoconcentrate of animals from group 3 was significantly higher than in groups 2 and 4 ( $p \leq 0.01$ ), but lower as compared with group 1. The relative count of apoptotic cells in leukoconcentrate (Fig. 1B) in groups 2 and 4 was significantly higher than in groups 1 and 3 ( $p \leq 0.01$ ). In cold stress-exposed animals (groups 2–4), the relative count of cells in leukoconcentrate, whose membranes were permeable for EB (necrotized) was significantly higher than in group 1 (Fig. 1C).

Notably, that the 'viable' leukocytes included all the AO-stained cells which fluoresced green, regardless of the nucleus size. It means that among such cells were leukocytes at pyknosis or nucleus fragmentation stage, but the cell membranes of which were not permeable for EB. Determination of a relative count of fragmented DNA and a percentage of leukocytes with fragmented DNA in peripheral blood leukocytes of rats enables estimating a number of cells, being at earlier stages of apoptosis. The Fig. 2 and 3 show the impact of cold stress, dalargin and naloxone on these indices to be similar to that detected by dual staining. In all the animals, a cold stress caused a significant increase in both the degree of DNA fragmentation and the relative count of peripheral blood leukocytes with fragmented DNA. Preliminary administration of dalargin to animals significantly reduced both indices, moreover the degree of DNA fragmentation in cells decreased to that in group 1. Dalargin and naloxone





**Рис. 1.** Вплив холодного стресу *in vivo* і даларгіну на життєздатність ядровмісних клітин крові щурів: **A** – відносний вміст життєздатних клітин; **B** – відносний вміст клітин на стадії апоптозу; **C** – відносний вміст некротизованих клітин; відмінності значущі порівняно з групою 1 (\*) та з групою 2 (#),  $p \leq 0,01$ .

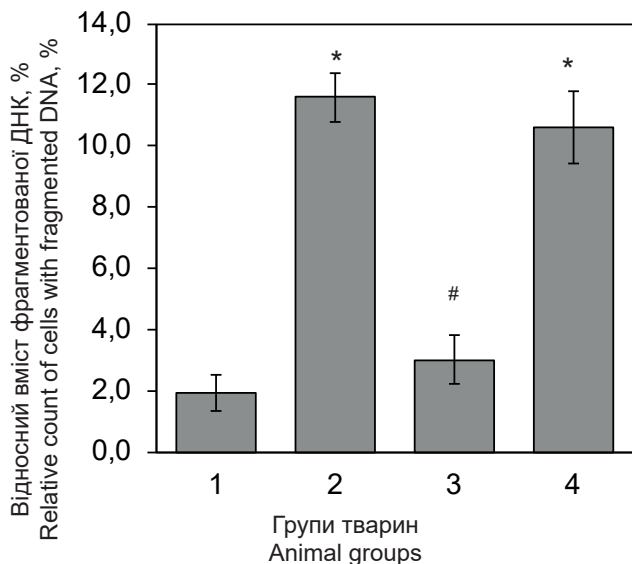
**Fig. 1.** Impact of *in vivo* cold stress and dalargin on nucleated blood cell viability of rats: **A** – relative count of viable cells; **B** – relative count of cells at apoptosis stage; **C** – relative count of necrotized cells; differences are significant relative to group 1 (\*) and group 2 (#),  $p \leq 0.01$ .

чинить антиапоптотичну дію на лейкоцити периферичної крові. При цьому одночасне введення агоніста опіатних рецепторів (даларгіну) та антагоніста (налуксону) усувало цей ефект. Важливо, що налуксон у дозі, яка використовується в нашому експерименті, проявляє себе як неселективний антагоніст опіатних рецепторів [26]. Це свідчить про опосередковану антиапоптотичну дію (через опіатні рецептори) даларгіну на ядровмісні клітини крові щурів при відтворенні холодного стресу *in vivo*. Опіодні  $\mu$ -,  $\kappa$ - і  $\delta$ -рецептори виявлені рядом авторів у мембранах лімфоцитів периферичної крові (головним чином – Т-лімфоцитів) [2, 22, 24, 32]. Вони можуть бути задіяні в імунній реакції на холодний стрес [20]. Однак відомості щодо експресії опіодних рецепторів на мононуклеарних клітинах периферичної крові є неоднозначними [10, 35]. У огляді J.M. Bidlack [10] наведено дані ряду авторів, які за допомогою різних методів встановили

administration to rats eliminated the described effects of the first (See Fig. 1–3).

Thus, the administration of dalargin to rats prior to cold stress simulation had an antiapoptotic effect on peripheral blood leukocytes. Herewith, when opioid receptor agonist (dalargin) and antagonist (naloxone) were introduced simultaneously, this effect was eliminated. Importantly, that naloxone at a dose we used in our experiment acted as a nonselective opioid receptor antagonist [24]. This indicated an indirect antiapoptotic effect (via opioid receptors) of dalargin on nucleated blood cells of rats during cold stress simulation *in vivo*. Some authors have revealed the opioid  $\mu$ -,  $\kappa$ - and  $\delta$ -receptors in membranes of peripheral blood lymphocytes (mainly T-lymphocytes) [12, 17, 19, 31]. They may be involved into immune response to cold stress [13]. However, the information on expression of opioid receptor on peripheral blood mononuclear cells is ambiguous [1, 35]. J.M. Bidlacks [1] in his review reported the data of some scientists who used different methods and established the presence of  $\kappa$ - and  $\delta$ -opioid receptors on T-lymphocyte and macrophage membranes, the expression degree of which depended on differentiation stage. In addition, this review showed the findings indicating



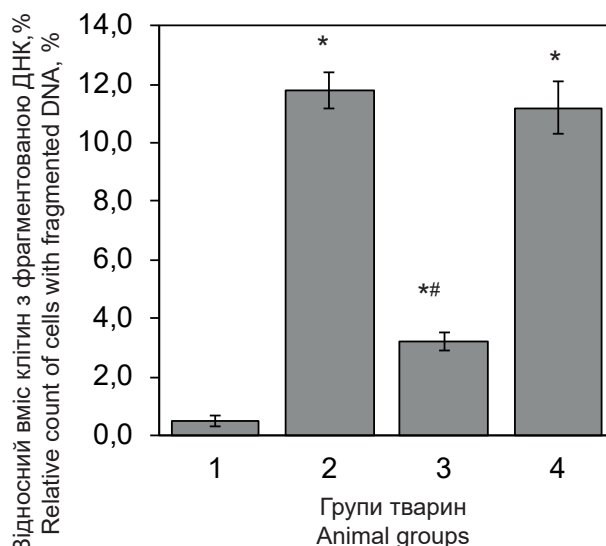


**Рис. 2.** Вплив холодного стресу *in vivo* і даларгіну на відносний вміст фрагментованої ДНК в крові щурів; відмінності значущі порівняно з групою 1(\*) та з групами 2 і 4 (#),  $p \leq 0,01$ .

**Fig. 2.** Effect of *in vivo* cold stress and dalargin on relative count of fragmented DNA in rat blood; differences are as significant compared with group 1 (\*) and groups 2 and 4 (#),  $p \leq 0.01$ .

присутність на мембранах Т-лімфоцитів і макрофагів  $\kappa$ - і  $\delta$ -опіодних рецепторів, ступінь експресії яких залежить від стадії диференціації. Крім того, в цьому огляді наведено результати дослідження, що свідчать про наявність мРНК для  $\mu$ -опіодних рецепторів у лініях Т- і В-клітин людини, CD41, Т-клітинах, моноцитах, макрофагах і гранулоцитах. Однак за даними J.P. Williams та співавт. [35] мононуклеарні клітини периферичної крові людини експресують так звані ноціцептин-орфанінові рецептори (FQ), але не  $\mu$ -,  $\kappa$ - або  $\delta$ -опіодні рецептори. Використовувані в дослідженні методики не дають інформації про розподіл у лейкоконцентраті клітин з ознаками апоптозу за типами – мононуклеарні лейкоцити і поліморфноядерні клітини. Тому не можна однозначно стверджувати, з клітинами якого саме типу взаємодіє препарат. Факт пригнічення антагоністом опіатних рецепторів налоксоном захисної дії даларгіну свідчить про дію останнього саме через опіатні рецептори. Це можуть бути не тільки рецептори власне лейкоцитів периферичної крові, а й відповідні рецептори клітин певних структур нейроендокринної системи, які опосередковано після дії на них енкефалінів впливають на клітини імунної системи. Отже, опіодні пептиди можуть брати участь у регуляції реакції імунної системи на стресуючий вплив як на клітинному, так і на організменому рівнях [3]. На показниках життєздатності лейкоцитів тварин

the presence of mRNA for  $\mu$ -opioid receptors in human T- and B-cell lines, CD41 T-cells, monocytes, macrophages and granulocytes. However, as stated by J.P. Williams *et al.* [35], the human peripheral blood mononuclear cells express the so-called nociceptin-orphanin receptors (FQ), but not  $\mu$ -,  $\kappa$ - or  $\delta$ -opioid ones. The techniques we used here provided no information on distribution in leukoconcentrate of cells with signs of apoptosis by types: mononuclear leukocytes and polymorphonuclear cells. Therefore, we can not categorically affirm which type of cells the drug interacted with. The fact that opioid receptor antagonist naloxone suppresses a protective effect of dalargin indicates the latter to act namely through the opiate receptors. These may be not only the receptors of peripheral blood leukocytes, but also the corresponding cell receptors of neuroendocrine system certain structures, that after enkephalin effect on them, indirectly affect the immune system cells. Therefore, opioid peptides may be involved into regulation of immune system's response to stress impact both at cell and organism levels [14]. The indices of animal leukocyte viability are also affected by the changes in blood formula, observed during exposure to cold. As mentioned earlier (Table), in blood of the rats injected with dalargin before cooling, an increase in neutrophil to lymphocyte ratio was less pronounced, being likely due to stress-induced augmentation of circulating norepinephrine [5]. Fur-



**Рис. 3.** Вплив холодного стресу *in vivo* і даларгіну на відносний вміст клітин з фрагментованою ДНК в крові щурів; відмінності значущі порівняно з групою 1(\*) та з групами 2 і 4 (#),  $p \leq 0,01$ .

**Fig. 3.** Effect of *in vivo* cold stress and dalargin on relative count of cells with fragmented DNA in rat blood; differences are significant relative to group 1 (\*) and group 2 and 4 (#),  $p \leq 0.01$ .



позначаються також і зміни у формулі крові, які спостерігаються під час дії холоду. Як було зазначено раніше (таблиця), у крові щурів, яким перед початком охолодження вводили даларгін, збільшення співвідношення вмісту нейтрофілів до вмісту лімфоцитів було менш виражене, що, ймовірно, є наслідком викликаного стресом підвищення рівня циркулюючого норадреналіну [13]. Крім того відомо, що підвищенню показників життєздатності нейтрофілів сприяють глюкокортикоїди, концентрація яких у плазмі крові у відповідь на стресуючий вплив також збільшується [21]. Тому можливо, що крім прямої дії на клітини крові даларгін впливав на структури нервової системи, що стимулювало захисну нейроендокринну реакцію організму на холодний стрес. Слід враховувати і можливість мембранотропного ефекту даларгіну, який обумовлюється його поверхнево активними властивостями. Ймовірно, даний лей-енкефалін, крім афінності до специфічних опіоїдних рецепторів, має здатність убудовуватися в ліпідний рафт клітинних мембран, змінюючи їх фізико-хімічні властивості та впливаючи на активність іонних насосів і пасивну проникність для різних іонів. Подібні властивості описано для тіроліберину, енкефалінів, окситоцину і деяких інших регуляторних пептидів [1, 8].

Отримані результати свідчать, що енкефаліни відіграють важливу роль у пристосуванні теплокровних тварин до життя в умовах низьких температур. Механізм дії енкефалінів, зокрема на імунокомпетентні клітини крові, потребує подальшого вивчення.

### Висновки

1. Встановлено, що в периферичній крові експериментальних щурів, підданих холодному стресу шляхом охолодження до 20°C, через 24 години після початку розігріву значуще знижується вміст лімфоцитів і підвищується вміст нейтрофілів.

2. У тварин, яким перед охолодженням вводили даларгін, відношення кількості нейтрофілів периферичної крові до кількості лімфоцитів було значуще нижче контрольного.

3. Введення експериментальним щурам перед початком охолодження даларгіну сприяло статистично значущому зниженню показників апоптозу ядровмісних клітин крові.

4. Введення експериментальним тваринам перед початком охолодження налоксону усуває антиапоптотичний ефект даларгіну на лейкоцити периферичної крові, що свідчить про участь в механізмі дії останнього опіоїдних рецепторів.

thermore, the glucocorticoids, which concentration in blood plasma increases in response to stress impact, are known to enhance the neutrophil viability indices as well [15]. Therefore, in addition to direct effect on blood cells, dalargin likely affected the nervous system structures, thus stimulated a protective neuroendocrine response of body to cold stress. The probability of membranotropic effect of dalargin, stipulated by its surface-active properties, should also be taken into account. Presumably, this leu-enkephalin, in addition to affinity to specific opioid receptors, has the ability to incorporate into lipid shelf of cell membranes, by altering their physicochemical properties and affecting the ion pump activity and passive permeability for various ions. Similar properties have been described for tyroliberin, enkephalins, oxytocin, and some other regulatory peptides [2, 30].

Our findings show the enkephalins to play an important role in adaptation of homeotherms to life under low temperatures. The mechanism of enkephalin action, in particular on immune competent blood cells, needs further research.

### Conclusions

1. In peripheral blood of experimental rats exposed to cold stress by cooling down to 20°C, in 24 hrs after warming up, the count of lymphocytes was found to be significantly reduced, and the neutrophil one was increased.

2. In dalargin-injected animals before cooling, the ratio of peripheral blood neutrophils to lymphocytes was significantly lower *versus* the control.

3. The dalargin introduction to experimental rats prior to cooling significantly reduced the apoptosis indices in nucleated blood cells.

4. The administration of naloxone to experimental animals before cooling eliminated an antiapoptotic effect of dalargin on peripheral blood leukocytes, thus indicating the involvement of the latter in the mechanism of action of opioid receptors.

### References

1. Bidlack JM. Detection and function of opioid receptors on cells from the immune system. Clin Diagn Lab Immunol. 2000; 7: 719–23.
2. Bogdanova HG, Lelekova TV, Pal'mina HP. [Effect of the extremely low dose of thyroliberin on microviscosity of the lipid component of biological membranes]. Biull Eksp Biol Med. 2000; 129(1): 38–40. Russian.
3. Borlongan CV, Wang Y, Su TP. Delta opioid peptide (d-ala 2, d-Leu 5) enkephalin: linking hibernation and neuroprotection. Front Biosci. 2004; 9: 3392–8.

## Література

1. Богданова НГ, Лелекова ТВ, Пальмина НП. Действие сверхмалых доз тирوليберина на микровязкость липидного компонента биологических мембран. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2000; 129(1): 38–40.
2. Гейн СВ, Баева ТА, Гейн ОН, и др. Роль моноцитов в реализации эффектов  $\beta$ -эндорфина и селективных агонистов  $\mu$ - и  $\delta$ -опиатных рецепторов на пролиферативную активность лимфоцитов периферической крови. Физиология человека. 2006; 32(3): 111–6.
3. Гейн СВ, Шаравьева ИЛ. Влияние блокады опиатных рецепторов на микробицидный потенциал и продукцию ИЛ-1b, ФНО-А и ИЛ-10 перитонеальными макрофагами в условиях стресса. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2016; 161(3): 313–7.
4. Гулевский АК, Ахатова ЮС, Щенявский ИИ. Особенности апоптоза, индуцированного снижением температуры. Проблемы кріобіології і кріомедицини. 2017; 27(2): 97–109.
5. Леонтьев ОВ, Душенин ВГ, Кахиани ЕИ. Лейкоцитарная реакция крови при комбинированном (холодовом и болевом) воздействии в эксперименте. Вестник российской военно-медицинской академии. 2017; 4(60): 85–90.
6. Лишманов ЮБ, Маслов ЛН, Нарыжная НВ, и др. Эндогенная опиоидная система как звено срочной и долговременной адаптации организма к экстремальным воздействиям. Перспективы клинического применения опиоидных пептидов. Вестник РАМН. 2012; 67(6): 73–82.
7. Ломако ВВ. Вплив різних режимів охолодження (краніоцеребральної та іммерсійної гіпотермії, поверхневих ритмічних і екстремальних холодових впливів) на лейкоцитарні показники крові щурів. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2018; 28(4): 293–310.
8. Рыбальченко ВК, Могилевич БР, Островская ГВ. Роль липидного матрикса плазматической мембраны в процессе передачи информации регуляторными пептидами. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1993; 115(5): 477–8.
9. Сухова ГС, Игнатъев ДА, Ахрименко АК, и др. Кардиотропная, гипометаболическая и гипотермическая активность пептидных фракций из тканей зимоспящих и хлададаптированных животных. Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 1990; 26(5): 623–9.
10. Bidlack JM. Detection and function of opioid receptors on cells from the immune system. Clin Diagn Lab Immunol. 2000; 7(5): 719–23.
11. Borlongan CV, Wang Y, Su TP. Delta opioid peptide (D-Ala 2, D-Leu 5) enkephalin: linking hibernation and neuroprotection. Front Biosci. [Internet]. 2004 Sep 1 [cited Jan 15 2019]; 9: 3392–8. DOI: 10.2741/1490. PMID: 15353366. Available from: <https://www.bioscience.org/2004/v9/af/1490/fulltext.htm>
12. Boutilier RG. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. J Exp Biol. 2001; 204(Pt 18): 3171–81.
13. Brenner IKM, Castellani WJ, Gabaree C, et al. Immune changes in humans during cold exposure: effects of prior heating and exercise. J Appl Physiol. 1999; 87(2): 699–710.
14. Cui Y, Lee TF, Kramarova LI, Wang LC. The modulatory effects of mu and kappa opioid agonists on 5-HT release from hippocampal and hypothalamic slices of euthermic and hibernating ground squirrels. Life Sci. 1993; 53(26): 1957–65.
15. Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadis G, et al. Energy handling in renal tubular epithelial cells of the hamster, a native hibernator, under warm anoxia or reoxygenation. Biomed Rep. 2018; 9(6): 503–10.
16. Evenson DP. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. Anim Reprod Sci. 2016; 169: 56–75.
17. Fleck CC, Carey HV. Modulation of apoptotic pathways in intestinal mucosa during hibernation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005; 289(2): R586–R595.
18. Boutilier R.G. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. J Exp Biol. 2001; 204(Pt 18): 3171–81.
19. Brenner IKM, Castellani WJ, Gabaree C, et al. Immune changes in humans during cold exposure: effects of prior heating and exercise. J Appl Physiol. 1999; 87(2): 699–710.
20. Cui Y, Lee TF, Kramarova LI, Wang LC. The modulatory effects of mu and kappa opioid agonists on 5-HT release from hippocampal and hypothalamic slices of euthermic and hibernating ground squirrels. Life Sci. 1993; 53(26): 1957–65.
21. Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadis G, et al. Energy handling in renal tubular epithelial cells of the hamster, a native hibernator, under warm anoxia or reoxygenation. Biomed Rep. 2018; 9(6): 503–10.
22. Evenson DP. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. Anim Reprod Sci. 2016; 169: 56–75.
23. Fleck CC, Carey HV. Modulation of apoptotic pathways in intestinal mucosa during hibernation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005; 289(2): R586–R595.
24. Fransen J. Synchronized turbo apoptosis induced by cold-shock. Apoptosis. 2011; 16(1): 86–93.
25. Gagnon DD, Gagnon SS, Rintamäki H, et al. The effects of cold exposure on leukocytes, hormones and cytokines during acute exercise in humans. PLoS One. [Internet]. 2014 Oct 22 [cited Jan 15 2019]; 9(10): e110774. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article/comments?id=10.1371/journal.pone.0110774>.
26. Gein SV, Baeva TA, Gein ON, Chereshnev VA. The role of monocytes in the effects of  $\beta$ -endorphin and selective agonists of  $\mu$ - and  $\delta$ -opiate receptors on the proliferative activity of peripheral blood lymphocytes. Human Physiology. 2006; 32(3): 346–50.
27. Gein SV, Sharav'eva IL. Effects of cold stress on the functional activity of mouse peritoneal macrophages in conditions of opiate receptor blockade. Neuroscience and Behavioral Physiology. 2017; 47(5): 524–7.
28. Gein SV, Sharav'eva IL. Effect of opiate receptors blockade on microbicidal potential and production of IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , and IL-10 by peritoneal macrophages under stress conditions. Bull Exp Biol Med. 2016; 161(3): 339–43.
29. Ginsburg GH, Agil A, O'Tool M et al. Effects of a single bout of ultraendurance exercise on lipid levels and susceptibility of lipids to peroxidation in triathletes. JAMA. 1996; 276(3): 221–5.
30. Gulevsky AK., Akhatova YuS, Shchenyavsky II. Features of apoptosis, induced by temperature reduction. Probl Cryobiol Cryomed. 2017; 27(2): 97–109.
31. Hiramatsu M, Kameyama T. Roles of kappa-opioid receptor agonists in learning and memory impairment in animal models. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 1998; 20: 595–9.
32. Ignat'ev DA, Vorob'ev VV, Akhremenko AK. Effects of fractions 1–10 kda from brain of the black bear *Ursus arctos* on rats and mice. J Evol Biochem Physiol. 2004; 40(4): 432–7.
33. Kraus J, Borner C, Lendeckel U, Hollt V. Interferon- $\gamma$  down-regulates transcription of the  $\mu$ -opioid receptor gene in neuronal and immune cells. J Neuroimmunology. 2006; 181: 13–8.
34. Leontyev OB, Dushenin VG, Kahiani EI. [Leukocyte reaction of blood in combined (cold and analgesic) influence in experiment]. Vestnik of Russian Military Medical Academy. 2017; 4(60): 85–90. Russian.
35. Lishmanov YB, Maslov LN, Naryzhnaya NY, et al. [Endogenous opioid system as a mediator of acute and long-term adaptation to stress. Prospects for clinical use of opioid peptides]. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2012; 67(6): 73–82. Russian.
36. Liu K, Liu PC, Liu R, Wu X. Dual AO/EB staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry. Med Sci Monit Basic Res. 2015; 21: 15–20.
37. Lomako VV. Effect of different cooling regimens (cranio-cerebral and immersion hypothermia, surface rhythmic cold exposures



18. Fransen J. Synchronized turbo apoptosis induced by cold-shock. *Apoptosis*. 2011; 16(1): 86–93.
19. Gagnon DD, Gagnon SS, Rintamäki H, et al. The effects of cold exposure on Neukocytes, Neormones and cytokines during acute exercise in humans. *PLoS One* [Internet]. 2014 Oct 22 [cited Jan 15 2019]; 9(10): e110774. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article/comments?id=10.1371/journal.pone.0110774>.
20. Gein SV, Sharav'eva IL. Effects of cold stress on the functional activity of mouse peritoneal macrophages in conditions of opiate receptor blockade. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2017; 47(5): 524–7.
21. Ginsburg GH, Agil A, O'Tool M, et al. Effects of a single bout of ultraendurance exercise on lipid levels and susceptibility of lipids to peroxidation in triathletes. *JAMA*. 1996; 276(3): 221–5.
22. Hiramatsu M, Kameyama T. Roles of kappa-opioid receptor agonists in learning and memory impairment in animal models. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1998; 20: 595–9.
23. Ignat'ev DA, Vorob'ev VV, Akhremenko AK. Effects of fractions 1–10 kDa from brain of the black bear *Ursus arctos* on rats and mice. *J Evol Biochem Physiol*. 2004; 40(4): 432–7.
24. Kraus J, Borner C, Lendeckel U, Holtt V. Interferon- $\gamma$  down-regulates transcription of the  $\mu$ -opioid receptor gene in neuronal and immune cells. *J Neuroimmunology*. 2006; 181: 13–8.
25. Liu K, Liu PC, Liu R, Wu X. Dual AO/EB staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry. *Med Sci Monit Basic Res*. 2015; 21: 15–20.
26. Morris BJ, Millan MJ, Herz A. Antagonist-induced opioid receptor up-regulation. II. Regionally specific modulation of  $\mu$ ,  $\delta$ , and  $\kappa$  binding sites in rat brain revealed by quantitative autoradiography. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988; 247: 729–36.
27. Ndon JA, Snyder AC, Foster C, Wehrenberg WB. Effects of chronic intense exercise training on the leukocyte response to acute exercise. *Int J Sports Med*. 1992; 13(2): 176–82.
28. Neutelings T, Lambert CA, Nussgens BV, Colige AC. Effects of mild cold shock (25°C) followed by warming up at 37°C on the cellular stress response. *PLoS One* [Internet]. 2013 July 23 [cited Jan 15 2019]; 8(7): e69687. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0069687>.
29. Oeltgen PR, Nilekani SP, Nuchols PA, et al. Further studies on opioids and hibernation: delta opioid receptor ligand selectively induced hibernation in summer-active ground squirrels. *Life Sci*. 1988; 43(19): 1565–74.
30. Perna FM, Schneiderman N, LaPerriere A. Psychological stress, exercise and immunity. *Int J Sports Med*. 1997; 18(1): 78–83.
31. Rauen U, Polzar B, Stephan H, et al. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J*. 1999; 13(1): 155–68.
32. Sharp BM. Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling. *Brain Behav Immun*. 2006; 20(1): 9–14.
33. Sibarov DA, Bolshakov AE, Abushik PA, et al. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase functionally interacts with the plasma membrane Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> exchanger to prevent Ca<sup>2+</sup> overload and neuronal apoptosis in excitotoxic stress. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012; 343: 596–607.
34. Tadzhibova LT, Astaeva MD, Ismailova JG, et al. Effects of dalargin on free radical processes in the blood of rats exposed to moderate hypothermia. *Bull Exp Biol Med*. 2011; 150(3): 304–6.
35. Williams JP, Thompson JP, McDonald J, et al. Human peripheral blood mononuclear cells express nociceptin/orphanin FQ, but not mu, delta, or kappa opioid receptors. *Anesth Analg*. 2007; 105: 998–1005.
- and whole body cryostimulation) on leukocyte indices of rat blood. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2018; 28(4): 293–310.
24. Morris BJ, Millan MJ, Herz A. Antagonist-induced opioid receptor up-regulation. II. Regionally specific modulation of  $\mu$ ,  $\delta$ , and  $\kappa$  binding sites in rat brain revealed by quantitative autoradiography. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988; 247: 729–36.
25. Ndon JA, Snyder AC, Foster C, Wehrenberg WB. Effects of chronic intense exercise training on the leukocyte response to acute exercise. *Int J Sports Med*. 1992; 13(2): 176–82.
26. Neutelings T, Lambert CA, Nussgens BV, Colige AC. Effects of mild cold shock (25°C) followed by warming up at 37°C on the cellular stress response. *PLoS One* [Internet]. 2013 July 23 [cited Jan 15 2019]; 8(7): e69687. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0069687>.
27. Oeltgen PR, Nilekani SP, Nuchols PA, et al. Further studies on opioids and hibernation: delta opioid receptor ligand selectively induced hibernation in summer-active ground squirrels. *Life Sci*. 1988; 43(19): 1565–74.
28. Perna FM, Schneiderman N, LaPerriere A. Psychological stress, exercise and immunity. *Int J Sports Med*. 1997; 18(1): 78–83.
29. Rauen U, Polzar B, Stephan H, et al. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J*. 1999; 13(1): 155–68.
30. Rybal'chenko VK, Mogilevich BR, Ostrovskaia GV. [Role of the lipid matrix of plasma membranes in the process of transmission of information by regulatory peptides]. *Bull Eksp Biol Med*. 1993; 115(5): 477–8. Russian.
31. Sharp BM. Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling. *Brain Behav Immun*. 2006; 20(1): 9–14.
32. Sibarov DA, Bolshakov AE, Abushik PA, et al. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase functionally interacts with the plasma membrane Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> exchanger to prevent Ca<sup>2+</sup> overload and neuronal apoptosis in excitotoxic stress. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012; 343: 596–607.
33. Sukhova GS, Ignat'ev DA, Akhremenko AK, et al. [The cardiotropic, hypometabolic and hypothermic activity of peptide fractions from the tissues of hibernating cold-adapted animals]. *Zh Evol Biokhim Fiziol*. 1990; 26(5): 623–9. Russian.
34. Tadzhibova LT, Astaeva MD, Ismailova JG, et al. Effects of dalargin on free radical processes in the blood of rats exposed to moderate hypothermia. *Bull Exp Biol Med*. 2011; 150(3): 304–6.
35. Williams JP, Thompson JP, McDonald J, et al. Human peripheral blood mononuclear cells express nociceptin/orphanin FQ, but not mu, delta, or kappa opioid receptors. *Anesth Analg*. 2007; 105: 998–1005.