

Цитопротективный эффект неопиатных аналогов лей-энкефалина на фоне воздействия ингибитора орнитиндекарбоксилазы

Е.Н. Сазонова^{1, 2}, О.Г. Репа³, Ю.Б. Малофей¹

¹ Дальневосточный государственный медицинский университет Минздрава России
680000, г. Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского, 35

² Хабаровский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания –
НИИ охраны материнства и детства
680022, г. Хабаровск, ул. Воронежская, 49

³ Территориальный консультативно-диагностический центр
681000, г. Комсомольск-на-Амуре, ул. Димитрова, 12

Резюме

Целью исследования явилась оценка вовлечения системы полиаминов в реализацию цитопротективного действия неопиатных аналогов лей-энкефалина в условиях окислительного стресса. **Материал и методы.** Пульмональные фибробласты крыс инкубировали с пептидом НАЛЭ (Phe–D-Ala–Gly–Phe–Leu–Arg, 0,1 мкМ) и его структурным аналогом пептидом G (Phe–D-Ala–Gly–Phe–Leu–Gly, 0,1 мкМ), некоторые серии – с диформетилорнитиним (ДФМО, 2 мМ). Окислительный стресс моделировали добавлением в культуральную среду H₂O₂ (100 мкМ). На монослоях изучали морфометрические параметры нуклео-нуклеолярного аппарата фибробластов, пролиферативную активность клеток, особенности экспрессии p53. **Результаты.** Инкубирование фибробластов с H₂O₂ приводит к стресс-реакции клеток, о чем свидетельствуют полное отсутствие митотической активности, достоверное уменьшение плотности клеточной культуры, увеличение площади ядер и повышение доли p53-позитивных фибробластов. Инкубирование с блокатором синтеза орнитиндекарбоксилазы ДФМО вызывало ухудшение состояния клеточной культуры: снижался митотический индекс, еще более значительно увеличивалось количество фибробластов, экспрессирующих p53. Предварительное инкубирование (до добавления H₂O₂) с пептидами НАЛЭ и G уменьшало, но не исключало полностью негативное воздействие H₂O₂ на клеточную культуру. Предварительное совместное инкубирование клеточных монослоев с пептидами и ДФМО показывало более выраженный цитопротективный эффект при окислительном стрессе. Так, в серии с НАЛЭ доля p53-позитивных фибробластов, плотность культуры, размер ядер фибробластов не имели отличий от контрольных параметров; регистрировалось достоверное увеличение суммарной площади ядрышек в ядрах клеток. В серии с пептидом G доля p53-позитивных фибробластов, размер их ядер, количество и суммарная площадь ядрышек были аналогичны контрольным показателям, выявлено достоверное возрастание плотности клеточной культуры по сравнению с контролем. **Заключение.** Результаты проведенного исследования указывают на прямое цитопротективное действие пептидов – неопиатных аналогов лей-энкефалина, в том числе в условиях блокады системы полиаминов.

Ключевые слова: аналоги лей-энкефалина, окислительный стресс, блокатор орнитиндекарбоксилазы, пульмональные фибробласты, цитопротективный эффект.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено за счет бюджетных средств государственного задания «Регуляторные олигопептиды как потенциальные корректоры изменений при типовых патологических процессах» (номер государственного учета 124022900081-9).

Автор для переписки: Малофей Ю.Б., e-mail: malofey2009@mail.ru

Для цитирования: Сазонова Е.Н., Репа О.Г., Малофей Ю.Б. Цитопротективный эффект неопиатных аналогов лей-энкефалина на фоне воздействия ингибитора орнитиндекарбоксилазы. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2024;44(6):155–161. doi: 10.18699/SSMJ20240615

Cytoprotective effect of non-opiate leu-enkephalin analogues against the background of ornithine decarboxylase inhibitor exposure

E.N. Sazonova^{1,2}, O.G. Repa³, Yu. B. Malofey¹

¹ Far Eastern State Medical University of Minzdrav of Russia
680000, Khabarovsk, Murav'yeva-Amurskogo st., 35

² Far Eastern Scientific Center for Physiology and Pathology of Respiration –
Research Institute for the Protection of Motherhood and Childhood
680022, Khabarovsk, Voronezhskaya st., 49

³ Territorial Consultative and Diagnostic Center
681000, Komsomolsk-na-Amure, Dimitrova st., 12

Abstract

The purpose of the study was to assess the involvement of the polyamine system in the implementation of the cytoprotective effect of non-opiate analogues of leu-enkephalin under conditions of oxidative stress. **Material and methods.** Rat pulmonary fibroblasts were incubated with the NALE peptide (Phe-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg, 0.1 μ M) and its structural analogue peptide G (Phe-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Gly, 0.1 μ M), some series - with difluoromethylornithine (DFMO, 2 mM). Oxidative stress was modeled by adding H_2O_2 (100 μ M) to the culture medium. The morphometric parameters of the nucleole-nucleolar apparatus of fibroblasts, the proliferative activity of cells, and the features of p53 expression were studied on monolayers. **Results.** Incubation of fibroblasts with hydrogen peroxide leads to a stress response of cells, as evidenced by the complete absence of mitotic activity, a significant decrease in cell culture density, an increase in the area of nuclei and an increase in the proportion of p53 + fibroblasts. Incubation with the ornithine decarboxylase synthesis blocker DFMO caused a deterioration in the condition of the cell culture: the mitotic index decreased, and the number of p53 + fibroblasts increased even more significantly. Pre-incubation (before adding H_2O_2) with NALE and G peptides reduced, but did not completely eliminate, the negative effect of hydrogen peroxide on cell culture. Preliminary co-incubation of cell monolayers with peptides and DFMO showed a more pronounced cytoprotective effect in OS. Thus, in the series with NALE, the indicators of the proportion of p53 + fibroblasts, culture density, and size of fibroblast nuclei did not differ from the control parameters; a significant increase in the total area of nucleoli in cell nuclei was recorded. In the series with peptide G, the indicators of the proportion of p53 + fibroblasts, the size of fibroblast nuclei, the number and total area of nucleoli were similar to the control indicators, and a significant increase in the cell culture density was revealed, compared to the control. **Conclusions.** The results of the study indicate a direct cytoprotective effect of peptides - non-opiate analogues of leu-enkephalin, including conditions of blockade of the polyamine system.

Key words: leu-enkephalin analogues, oxidative stress, ornithine decarboxylase blocker, pulmonary fibroblasts, cytoprotective effect.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The study was carried out at the expense of budgetary funds of the state task "Regulatory oligopeptides as potential correctors of changes in typical pathological processes" (state registration number 124022900081-9)

Correspondence author: Malofey Yu.B., e-mail: malofey2009@mail.ru

Citation: Sazonova E.N., Repa O.G., Malofey Yu. B. Cytoprotective effect of non-opiate leu-enkephalin analogues against the background of ornithine decarboxylase inhibitor exposure. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2024;44(6):155–161. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20240615

Введение

Неопиатные аналоги лей-энкефалина обладают прямым цитопротективным действием. Инкубирование первичной культуры фибробластов с пептидами этого семейства снижает неблагоприятное влияние окислительного стресса (ОС), индуцированного добавлением в культуральную среду перекиси водорода [1]. Одним из внутриклеточных факторов защиты от влияния ОС является система полиаминов [2]. Описана способ-

ность полиаминов оказывать стабилизирующее действие на мембранные структуры и конформацию РНК и ДНК, оказывать антиоксидантный эффект [3]. Цитопротективные и антиоксидантные эффекты биологически активных веществ могут быть опосредованы стимуляцией орнитиндекарбоксилазы и активацией синтеза полиаминов в клетках [4].

Целью работы было оценить вовлечение системы полиаминов в реализацию цитопро-

тективного действия неопиатных аналогов лей-энкефалина в условиях ОС.

Материал и методы

Первичную культуру пульмональных фибробластов получали из ткани легких новорожденных белых крыс Wistar (всего в эксперименте использован клеточный материал от 12 крыс 2–3-суточного возраста). Фрагменты ткани легкого перед выделением клеток инкубировали при комнатной температуре в течение 4 ч в питательной среде DMEM с высокой концентрацией антибиотиков (гентамицин («Биолот», Россия), 0,5 мг/мл; амфотерицин В («Биолот»), 25 мкг/мл), фрагментировали и обрабатывали коллагеназой панкреаса краба («Биолот», 750 Ед/мл) в течение 5 мин при температуре 37 °С. Полученную суспензию клеток после двукратной промывки раствором Хенкса помещали в среду DMEM/F12 («Биолот») с добавлением 10 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота («Биолот»). Культивирование клеток осуществляли при 5%-м содержании CO₂ в воздухе CO₂-инкубатора.

Фибробласты пятого пассажа инкубировали в течение 16 ч с исследуемыми неопиатными аналогами лей-энкефалина: пептидом НАЛЭ (Phe–D-Ala–Gly–Phe–Leu–Arg) и его структурным аналогом пептидом G (Phe–D-Ala–Gly–Phe–Leu–Gly) (Atagenix, Китай). Концентрация изучаемых пептидов в культуральной среде составляла 0,1 мкМ. В отдельных сериях эксперимента клетки инкубировали в течение 16 ч с необратимым ингибитором ключевого фермента синтеза полиаминов орнитиндекарбоксилазы дифторметилорнитинном (ДФМО, Sigma-Aldrich, США) в концентрации 2 мМ. По данным литературы, инкубирование клеток с 1–10 мМ ДФМО подавляет образование полиаминов без цитотоксического эффекта [5]. Для индукции ОС фибробласты инкубировали в течение двух часов в растворе H₂O₂ 100 мкМ [6].

Формировали следующие экспериментальные серии монослоев пульмональных фибробластов: «Контроль» – интактные клетки, не подвергнутые каким-либо воздействиям; «ОС» – клетки, инкубированные в растворе H₂O₂ 100 мкМ в течение 2 ч; «N + ОС» – клетки, инкубированные в растворе пептида НАЛЭ 0,1 мкМ в течение 16 ч с добавлением H₂O₂ 100 мкМ в заключительные 2 ч инкубирования; «N + D + ОС» – клетки, инкубированные в растворе пептида НАЛЭ 0,1 мкМ и ДФМО 2 мМ в течение 16 ч с добавлением H₂O₂ 100 мкМ в заключительные 2 ч инкубирования; «G + ОС» – клетки, инкубированные в растворе пептида G 0,1 мкМ в течение 16 ч с H₂O₂ 100 мкМ в заключительные 2 ч инкубирования;

«G + D + ОС» – клетки, инкубированные в растворе пептида G 0,1 мкМ и ДФМО 2 мМ в течение 16 ч с добавлением H₂O₂ 100 мкМ в заключительные 2 ч инкубирования; «D» – клетки, инкубированные в растворе ДФМО 2 мМ в течение 16 ч.

Фибробласты, адгезированные к предметному стеклу, фиксировали 95%-м раствором этанола и окрашивали азотнокислым серебром по методике AgNOR [7]. В полученных монослоях оценивали пролиферативную активность клеток по количеству митотических фигур (митотический индекс, %) и плотности клеток (количество клеток в поле зрения светового микроскопа МИКМЕД-6 (АО «ЛОМО», Россия) при увеличении 10×40). Площадь поля зрения составляла 100 000 мкм². Для определения плотности клеток просматривали не менее 20 полей зрения в разных участках монослоя. Исследовали показатели нуклео-нуклеолярного аппарата клеток: размер (площадь, мкм²) ядер фибробластов, суммарную площадь ядрышкового материала (мкм²), количество ядрышек. Известно, что ядрышки являются стрессовым сенсором клетки [8]. Морфометрию нуклео-нуклеолярного аппарата проводили на компьютерной установке «МЕКОС-Ц» (ООО «МЕКОС», Россия). В каждой экспериментальной серии осуществляли морфометрию 250 клеток.

В клеточных монослоях исследовали долю фибробластов, экспрессирующих белок p53. Для этого их подвергали тепловой демаскировке с цитратным буфером pH 6 (Leica Biosystems, США) в гистопроцессоре HISTOS 5 (Milestone, Италия). Последующее иммуногистохимическое окрашивание проводили с помощью набора Novocastra™ Novolink™ Polymer Detection System (Leica Biosystems, США) согласно протоколу производителя. Использовали первичные моноклональные антитела мыши к p53 (клон DO-7, RTU, Leica Biosystems, США), время инкубирования – 40 мин. Вторичные антитела из набора Novocastra™ Novolink™ Polymer Detection System – антитела кролика к IgG мыши. Подсчитывали количество клеток при световой микроскопии (увеличение 10×100): анализировали долю клеток, имеющих коричневое окрашивание ядер при просмотре 2500 фибробластов каждой экспериментальной серии.

Результаты исследования анализировали с использованием программы Statistica 6.0. После проверки каждой выборки на нормальность распределения рассчитывали арифметический средний показатель и стандартную ошибку среднего показателя ($M \pm m$); для сравнения контрольной и опытной серий использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок; различия между

контрольной и опытными сериями считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

На проведение исследования получено разрешение этического комитета ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 1 от 15.11.2021).

Результаты

Установлено, что 16-часовое инкубирование с блокатором синтеза орнитиндекарбоксилазы ДФМО (серия «D») вызывало достоверное снижение митотического индекса по сравнению с контрольным параметром ($0,402 \pm 0,127$ и $1,103 \pm 0,180$ % соответственно, $p = 0,04$). Воздействие H_2O_2 (серия «OC») приводило к полной блокаде клеточного деления: митотические фигуры в моно слоях фибробластов этой серии не выявлены (митотический индекс равен нулю). Блокирующее действие H_2O_2 на митотическую активность клеток не удалось предотвратить предварительным инкубированием с исследуемыми пептидами, все серии экспериментов с добавлением H_2O_2 («N + OC», «N + D + OC», «G + OC», «G + D + OC») характеризовались отсутствием митотических фигур в моно слоях.

При исследовании экспрессии белка p53 обнаружено выраженное (в 2,9 раза) повышение доли p53-позитивных фибробластов после воздействия H_2O_2 (серия «OC») (таблица), еще более значительное (в 6,5 раза) увеличение мы наблюдали после 16-часового инкубирования с ДФМО (серия «D»). В серии клеток, культивируемых с пептидом НАЛЭ с последующим воздействием H_2O_2 («N + OC»), мы отмечали статистически значимое возрастание количества фибробластов,

экспрессирующих p53 (в 1,9 раза больше контрольного значения). Вместе с тем показатель был достоверно (на 34,0 %) меньше, чем в серии «OC», что свидетельствует о цитопротективном влиянии пептида НАЛЭ на фибробласты. Инкубирование первичной культуры фибробластов с пептидом НАЛЭ на фоне блокады синтеза полиаминов обеспечивало нивелирование негативного воздействия на исследуемый показатель как H_2O_2 , так и ДФМО: количество p53-позитивных фибробластов в серии «N + D + OC» не имело отличий от контроля. Пептид G также оказывал выраженный цитопротективный эффект: клетки, предварительно инкубированные с пептидом G, не реагировали на воздействие H_2O_2 возрастанием экспрессии p53 (серия «G + OC»). Цитопротективный эффект пептида G не изменялся сопутствующей блокадой системы полиаминов: в серии «G + D + OC» количество фибробластов, экспрессирующих p53, не отличалось от контрольного значения.

Интегральную характеристику процессов пролиферации и апоптоза в клеточной культуре может дать показатель плотности клеток в моно слоях, определяемый как среднее число фибробластов в поле зрения микроскопа (увеличение 10×40). Воздействие H_2O_2 (серия «OC») вызывало достоверное снижение (на 47,8 %) количества клеток в поле зрения (см. таблицу). Присутствие H_2O_2 в культуре клеток, инкубированных с НАЛЭ (серия «N + OC»), не приводило к уменьшению их количества. Более того, плотность культуры в этой экспериментальной серии была значительно выше, чем в контроле. Воздействие H_2O_2 на фибробласты, инкубированные с НАЛЭ на фоне блокады синтеза полиаминов (серия «N + D + OC»), не изменяло их количество в поле

Доля p53-позитивных фибробластов, плотность клеток в моно слоях, размер ядер фибробластов и морфометрические показатели нуклеолярного аппарата фибробластов исследованных серий

The proportion of p53⁺ fibroblasts, cell density in monolayers, size of fibroblast nuclei and morphometric parameters of the nucleolar apparatus of fibroblasts in the studied series

Группа	Доля p53-позитивных клеток, %	Плотность клеток	Площадь ядра, мкм ²	Суммарная площадь ядрышек, мкм ²	Количество ядрышек
Контроль	$2,98 \pm 0,29$	$41,3 \pm 3,2$	$153,41 \pm 1,80$	$12,447 \pm 0,199$	$2,788 \pm 0,034$
ДФМО	$19,41 \pm 0,79^*$	$52,8 \pm 5,1$	$155,27 \pm 3,07$	$18,749 \pm 0,398^*$	$2,840 \pm 0,040$
OC	$8,67 \pm 0,49^*$	$21,6 \pm 4,3^*$	$165,26 \pm 2,97^*$	$12,126 \pm 0,295$	$2,652 \pm 0,041$
N + OC	$5,72 \pm 0,44^\#$	$70,2 \pm 6,8^{*\#}$	$169,71 \pm 2,08^*$	$14,259 \pm 0,229^*$	$2,418 \pm 0,032^*$
N + D + OC	$2,68 \pm 0,32^{\#,\wedge}$	$49,9 \pm 5,0^\#$	$155,05 \pm 2,40$	$18,148 \pm 0,274^*$	$2,798 \pm 0,035$
G + OC	$3,26 \pm 0,36^\#$	$70,5 \pm 7,4^{*\#}$	$182,85 \pm 2,02^{*\#}$	$24,947 \pm 0,392^*$	$2,613 \pm 0,043$
G + D + OC	$3,46 \pm 0,34^{\#,\wedge}$	$67,7 \pm 6,9^{*\#}$	$154,12 \pm 1,76$	$12,459 \pm 0,194$	$2,587 \pm 0,035^*$

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей:
* – серии «K», # – серии «OC», ^ – серии «D».

зрения микроскопа по сравнению с контролем. Воздействие другого исследованного неопиатного аналога лей-энкефалина, пептида G, приводило к достоверному увеличению плотности клеток в монослое по отношению к контролю. Эффект проявлялся как после предварительного инкубирования с пептидом на фоне блокады синтеза полиаминов (серия «G + D + ОС»), так и безДФМО (серия «G + ОС»).

На следующем этапе исследования был проведен анализ морфометрических показателей нуклео-нуклеолярного аппарата культивируемых фибробластов. Размер (площадь) ядра и суммарная площадь ядрышек являются «чувствительными» параметрами, позволяющими выявить ранние стрессовые изменения состояния клетки. Воздействие ОС индуцировало достоверное увеличение площади ядер фибробластов (на 7,8 %, см. таблицу), которое также регистрировалось в сериях клеток, предварительно инкубированных с пептидом НАЛЭ (серия «N + ОС») и с пептидом G (серия «G + ОС»). При этом увеличение ядер фибробластов в серии «G + ОС» было достоверно больше, чем в серии «ОС». Интересно, что после инкубирования клеточных монослоев с исследуемыми пептидами на фоне блокады орнитиндекарбоксилазы H_2O_2 не вызывала изменения размеров ядер фибробластов (серии «N + D + ОС», «G + D + ОС»). Инкубирование с ДФМО (серия «D») также не приводило к изменению размеров ядер фибробластов.

При анализе показателей нуклеолярного аппарата фибробластов (количества и размеров ядрышек) не выявлено достоверных изменений этих параметров после воздействия H_2O_2 (см. таблицу). В экспериментальной серии «N + ОС» зарегистрировано статистически значимое уменьшение количества ядрышек (на 13,3 %) по отношению к контрольному параметру; при этом суммарная площадь ядрышек в ядрах клеток, культивируемых в присутствии пептида НАЛЭ с последующим воздействием ОС, оказалась на 14,6 % больше контроля. Стимулирующее влияние на нуклеолярный аппарат пептид НАЛЭ оказывал и при воздействии на фоне блокады синтеза полиаминов: в клетках серии «N + D + ОС» выявлено возрастание суммарной площади ядрышек на ядро на 45,8 % по отношению к контролю. В экспериментальной серии «G + ОС» мы наблюдали значительное – более чем в 2 раза – превышение суммарной площади ядрышкового материала при отсутствии изменения количества ядрышек. Эффект не регистрировался, если воздействие пептида G осуществлялось на фоне ДФМО (серия «G + D + ОС»). Интересно, что 16-часовое инкубирование клеток с блокатором ключевого фермента синтеза полиаминов стати-

стически значимо (на 50,6 %) увеличивало суммарную площадь ядрышек фибробластов.

Обсуждение

Зарегистрированные нами эффекты воздействия H_2O_2 отражают повреждающее влияние ОС на культуру клеток. Мы отмечали полную блокаду митотической активности клеточной культуры, которая наблюдалась во всех экспериментальных сериях, подвергнутых воздействию H_2O_2 , независимо от предшествующего влияния исследуемых веществ. В ранее проведенных исследованиях мы также неоднократно регистрировали выраженное снижение пролиферативной активности клеточной культуры при воздействии H_2O_2 [9]. Вероятно, прекращение деления клеток в условиях ОС является важным протективным механизмом, предупреждающим окислительное повреждение наследственного аппарата клеток. Кроме того, в этой экспериментальной серии мы регистрировали почти двукратное уменьшение количества клеток в монослоях клеточной культуры, что, возможно, свидетельствует о клеточной гибели под влиянием H_2O_2 . В пользу этого предположения свидетельствует значительное увеличение экспрессии проапоптотического белка p53 в культуре фибробластов. Изменений суммарной площади и количества ядрышек в клетках серии «ОС» не выявлено. Инкубирование культуры пульмональных фибробластов с H_2O_2 в течение двух часов приводило к увеличению площади ядра фибробластов. Этот эффект отличался от полученных нами ранее: в предшествующих исследованиях мы регистрировали уменьшение площади ядра фибробластов при воздействии H_2O_2 [10]. Можно предположить, что увеличение размеров ядер фибробластов в данном эксперименте обусловлено отеком ядра из-за увеличения ядерных пор под влиянием активных форм кислорода. Повышение размеров ядер фибробластов в сочетании с возрастанием экспрессии белка p53 характерно для фенотипа клеточного старения [11].

Предварительное 16-часовое инкубирование культуры фибробластов с пептидами снижало негативные изменения, индуцированные ОС. Культивирование клеток с пептидом НАЛЭ (серия «N + ОС») не отменяло блокирование митотической активности клеточной культуры, вызванное воздействием H_2O_2 . Фибробласты этой экспериментальной серии, так же как и клетки серии «ОС», характеризовались увеличенным размером клеточного ядра. Вместе с тем инкубирование с пептидом НАЛЭ уменьшало индуцированное ОС возрастание числа p53-положительных клеток: показатель был достоверно (в 1,5 раза) меньше

параметра серии «ОС», хотя и оставался статистически значимо больше контроля. Кроме того, в данной серии зарегистрировано значительное количество клеток в монослоях, существенно превышающее показатели серии не только «ОС», но и контрольной. Это позволяет предположить выраженное цитопротективное действие пептида на клеточную культуру. При анализе ядрышек клеток данной экспериментальной серии зарегистрировано возрастание суммарной площади ядрышек на 14,6 % при уменьшении их количества на 13,3 %. Эффект может быть обусловлен переходом клеток в покоящееся состояние (фазу G0). В целом можно заключить, что предварительное инкубирование с пептидом НАЛЭ уменьшало, но не исключало полностью негативное воздействие H_2O_2 на клеточную культуру.

Эффект 16-часового инкубирования клеток с пептидом G (серия «G + ОС») был аналогичным. В этой экспериментальной серии мы также регистрировали отсутствие пролиферативной активности клеток и значительное увеличение размеров клеточных ядер. При этом мы выявили нормализацию количества p53-позитивных фибробластов, значительное увеличение количества клеток в монослое, почти двукратное возрастание суммарной площади ядрышек в ядрах клеток. Таким образом, пептид G также обладал цитопротективным эффектом в условиях ОС.

Инкубирование клеток с блокатором ключевого фермента синтеза полиаминов орнитиндекарбоксилазы ДФМО приводило к уменьшению митотической активности клеток и многократному возрастанию количества фибробластов, экспрессирующих p53. Полученные результаты соответствуют данным литературы об угнетающем влиянии ДФМО на процессы пролиферации [12, 13]. Вместе с тем мы не наблюдали изменения количества клеток в поле зрения по сравнению с контролем, не зарегистрировано влияния ДФМО на размер ядер клеток и количество ядрышек. По данным M. Grossi et al., ДФМО в концентрации до 5 мМ не имеет выраженного влияния на морфологию клеток, что свидетельствует об отсутствии цитотоксического эффекта. Парадоксальным кажется зарегистрированный нами эффект увеличения суммарной площади ядрышек в клетках, инкубированных с ДФМО. По данным литературы, увеличение размера ядрышек прямо коррелирует с увеличением синтеза полиаминов [14].

Предварительное совместное инкубирование клеточных монослоев с пептидами и ДФМО показывало выраженный цитопротективный эффект при ОС. Защитное действие пептидов на фоне блокады синтеза полиаминов не только не уменьшалось, но было даже более выраженным.

В серии «N + D + ОС» доля p53-позитивных фибробластов, количество клеток в поле зрения (плотность культуры), размеры ядер фибробластов не имели отличий от контрольных параметров, регистрировалось достоверное увеличение суммарной площади ядрышек в ядрах клеток. В серии «G + D + ОС» доля p53-позитивных фибробластов, размеры их ядер, количество и суммарная площадь ядрышек были аналогичны контрольным значениям, в то время как плотность клеточной культуры – больше. По данным литературы, ДФМО уменьшает индуцированное H_2O_2 повреждение HL-60 клеток в культуре. Цитотоксичность H_2O_2 в этих условиях была на 50 % меньше, чем в группе сравнения. Это связывают с меньшим потреблением клетками ионов железа и меньшим повреждением лизосом при ОС [15].

Заключение

Таким образом, прямое цитопротективное действие пептидов – неопиатных аналогов лей-энкефалина – реализуется и в условиях блокады системы полиаминов.

Список литературы / References

1. Сазонова Е.Н., Лебедько О.А., Пинаева О.Г., Цимбалест Н.А., Куприянова Д.А., Тарасов П.К., Малофей Ю.Б. Роль аминокислоты аргинин и оксида азота в реализации цитопротективного действия неопиатного аналога лей-энкефалина *in vitro*. *Клеточ. технол. в биол. и мед.* 2021;(3):194–200. doi: 10.47056/1814-3490-2021-3-194-200
2. Sazonova E.N., Lebed'ko O.A., Pinaeva O.G., Tsimbalist N.A., Kupriyanova D.A., Tarasov P.K., Malofey Yu.B. Role of amino acid arginine and nitric oxide in mechanisms of cytoprotective effect of non-opiate leu-enkephalin analogue *in vitro*. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2021;172(2):270–275. doi: 10.1007/s10517-021-05374-2
3. Rider J.E., Hacker A., Mackintosh C.A., Pegg A.E., Woster P.M., Casero R.A.Jr. Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *Amino Acids.* 2007;33(2):231–240. doi: 10.1007/s00726-007-0513-4
4. Егоров О.С., Борисова Н.Ю., Борисова Е.Я., Режаббаев М.Л., Афанасьева Е.Ю., Арзамасцев Е.В. Структура и биологическое действие аналогов и производных биогенных полиаминов. *Тонкие химические технологии.* 2021;16(4):287–306. doi: 10.32362/2410-6593-2021-16-4-287-306
5. Egorov O.S., Borisova N.Yu., Borisova E.Ya., Rezhabbayev M.L., Afanas'eva E.Yu., Arzamastsev E.V. Structure and biological action of analogs and derivatives of biogenic polyamines. *Tonkiye khimicheskiye tekhnologii = Fine Chemical Technologies.* 2021;16(4):287–306. [In Russian]. doi: 10.32362/2410-6593-2021-16-4-287-306

4. Tong F., Liu S., Yan B., Li X., Ruan S., Yang S. Endogenous ornithine decarboxylase/polyamine system mediated the antagonist role of insulin/PEG-CMCS preconditioning against heart ischemia/reperfusion injury in diabetes mellitus. *Int. J. Nanomedicine*. 2018;13:2507–2520. doi: 10.2147/ijn.s160848
5. Grossi M., Phanstiel O., Rippe C., Swärd K., Alajbegovic A., Albinsson S., Forte A., Persson L., Hellstrand P., Nilsson B.O. Inhibition of polyamine uptake potentiates the anti-proliferative effect of polyamine synthesis inhibition and preserves the contractile phenotype of vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol.* 2016;231(6):1334–1342. doi: 10.1002/jcp.25236
6. Самохвалов В.А., Сметанина М.Д., Мусейкина Н.Ю., Мельников Г.В., Федотова О.В., Игнатов В.В. Влияние низкой концентрации перекиси водорода на метаболизм клеток крови. *Биомед. химия*. 2003;49(2):122–127.
- Samokhvalov V.A., Smetanina M.D., Museykina N.Yu., Melnikov G.V., Fedotova O.V., Ignatov V.V. The influence of low doses of hydrogen peroxide on metabolism of blood cells. *Biomeditsinskaya khimiya = Bio-medical Chemistry*. 2003;49(2):122–127. [In Russian].
7. Морфологическая диагностика. Подготовка материала для гистологического исследования и электронной микроскопии: руководство. Ред. Д.Э. Коржевский. СПб.: СпецЛит, 2013. 127 с.
- Morphological diagnosis. Preparation of material for histological examination and electron microscopy: a guide. Ed. D.Je. Korzhevsky. Saint-Petersburg: SpetsLit, 2013. 127 p. [In Russian].
8. Lewinska A., Wnuk M., Grzelak A., Bartosz G. Nucleolus as an oxidative stress sensor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Rep.* 2010;15(2):87–96. doi: 10.1179/174329210x12650506623366
9. Сазонова Е.Н., Кузнецова М.С., Васильева Е.А., Мищенко Н.П., Цимбалист Н.А., Лебедько О.А. Цитопротективный эффект Эхинохрома А в первичной культуре пульмональных фибробластов белых крыс в условиях окислительного стресса. *Клеточ. технол. в биол. и мед.* 2020;(2):125–128.
- Sazonova E.N., Kuznetsova M.S., Lebed'ko O.A., Tsimbalist N.A., Vasileva E.A., Mishchenko N.P. Cytoprotective effect of Echinochrome A in primary culture of pulmonary fibroblasts from albino rats under conditions of oxidative stress. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2020;169(4):582–585. doi: 10.1007/s10517-020-04933-3
10. Сазонова Е.Н., Лебедько О.А., Денисюк Г.А., Жмеренецкий К.В., Добрых В.А. Цитопротективный эффект неопиатного аналога лей-энкефалина в первичной культуре пульмональных фибробластов в условиях окислительного стресса. *Казан. мед. ж.* 2019;100(1):153–157. doi: 110.17816/KMJ2019-153
- Sazonova E.N., Lebed'ko O.A., Denisyuk G.A., Zhmerenetskiy K.V., Dobrykh V.A. Cytoprotective effect of non-opioid leu-enkephalin analogue in primary culture of pulmonary fibroblasts in oxidative stress. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*. 2019;100(1):153–157. [In Russian]. doi: 110.17816/KMJ2019-153
11. Yoon K.B., Park K.R., Kim S.Y., Han S.Y. Induction of nuclear enlargement and senescence by sirtuin inhibitors in glioblastoma cells. *Immune Netw.* 2016;16(3):183–188. doi: 10.4110/in.2016.16.3.183
12. Zou C., Vlastos A.T., Yang L., Wang J., Nishioka K., Follen M. Effects of difluoromethylornithine on growth inhibition and apoptosis in human cervical epithelial and cancerous cell lines. *Gynecol. Oncol.* 2002;85(2):266–273. doi: 10.1006/gyno.2002.6599
13. Grossi M., Persson L., Swärd K., Turczyńska K.M., Forte A., Hellstrand P., Nilsson B.O. Inhibition of polyamine formation antagonizes vascular smooth muscle cell proliferation and preserves the contractile phenotype. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2014;115(5):379–388. doi: 10.1111/bcpt.12237
14. Brooks W.H. Viral impact in autoimmune diseases: expanding the “X Chromosome-Nucleolus Nexus” hypothesis. *Front. Immunol.* 2017;8:1657. doi: 10.3389/fimmu.2017.01657
15. Shim H.W., Moon M.S., Shin K.S., Cho H.J., Yoo B.S., Kim I.G. Alpha-difluoromethylornithine, ornithine decarboxylase inhibitor, antagonizes H₂O₂-induced cytotoxicity in HL-60 leukemia cells: regulation of iron-dependent lysosomal damage. *Cell. Biol. Toxicol.* 2003;19(6):393–405. doi: 10.1023/b:cbto.0000013355.63593.35

Сведения об авторах:

Сазонова Елена Николаевна, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0002-8668-492X, e-mail: sazen@mail.ru
 Репа Ольга Геннадьевна, e-mail: potrekeevna96@mail.ru
 Малофей Юлия Борисовна, к.б.н., ORCID: 0000-0001-5698-3665, e-mail: malofey2009@mail.ru

Information about the authors:

Elena N. Sazonova, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-8668-492X, e-mail: sazen@mail.ru
 Olga G. Repa, e-mail: potrekeevna96@mail.ru
 Yuliya B. Malofey, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0001-5698-3665, e-mail: malofey2009@mail.ru

Поступила в редакцию 04.07.2024
 После доработки 04.10.2024
 Принята к публикации 04.11.2024

Received 04.07.2024
 Revision received 04.10.2024
 Accepted 04.11.2024