



УДК 57.085.23

EDN ТИВQV

<https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-2-225-234>

Стимулирующее влияние коротких пептидов на клеточную пролиферацию в органотипической культуре тканей

Н. И. Чалисова^{✉1}, П. Н. Иванова¹, Е. С. Егозова², Е. А. Никитина^{1,2}

¹ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

² Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена, 191186, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. р. Мойки, д. 48

Сведения об авторах

Наталья Иосифовна Чалисова, SPIN-код: [2139-7608](#), ORCID: [0000-0002-2371-0043](#), e-mail: ni_chalisova@mail.ru

Полина Николаевна Иванова, SPIN-код: [9552-5350](#), ORCID: [0000-0001-7112-0673](#), e-mail: ivanovapolina19@mail.ru

Екатерина Сергеевна Егозова, ORCID: [0000-0002-0055-3778](#), e-mail: ekaterina_egozova@mail.ru

Екатерина Александровна Никитина, SPIN-код: [7844-8621](#), Scopus AuthorID: [56603106300](#), ResearcherID: [L-5761-2014](#), ORCID: [0000-0003-1897-8392](#), e-mail: 21074@mail.ru

Для цитирования: Чалисова, Н. И., Иванова, П. Н., Егозова, Е. С., Никитина, Е. А. (2023) Стимулирующее влияние коротких пептидов на клеточную пролиферацию в органотипической культуре тканей. *Интегративная физиология*, т. 4, № 2, с. 225–234. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-2-225-234> EDN ТИВQV

Получена 5 мая 2023; прошла рецензирование 6 июня 2023; принята 7 июня 2023.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Государственной программы РФ 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019–2030) (тема 0134-2019-0004).

Права: © Н. И. Чалисова, П. Н. Иванова, Е. С. Егозова, Е. А. Никитина. (2023). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

Аннотация. Актуальной проблемой современной физиологии и медицины является выявление биологически активных молекул, влияющих на клеточные процессы пролиферации и апоптоза. В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии разработана технология выделения ряда полипептидных комплексов из различных органов и тканей телят, оказывающих стимулирующее влияние в культуре разных тканей организма на клеточную пролиферацию. В составе полипептидных комплексов содержатся короткие пептиды, имеющие сходную с полипептидами биологическую активность. Целью настоящего исследования было выявление действия коротких пептидов на клеточную пролиферацию в органотипической культуре тканей коры головного мозга, селезенки, печени молодых (3-месячных) и старых (18-месячных) крыс. При исследовании влияния в эффективных концентрациях трипептидов Glu-Asp-Arg, Glu-Asp-Pro, Glu-Asp-Leu и дипептидов Asp-Ser, Asp-Leu, Asp-Ala, Asp-Gly, Asp-Arg, Ala-Gly установлено, что эти пептиды статистически достоверно ($p < 0,05$) стимулируют клеточную пролиферацию в эксплантатах коры головного мозга, печени, селезенки, как молодых, так и старых крыс. Полученные данные о коротких пептидах, стимулирующих клеточную пролиферацию в культивируемых тканях коры головного мозга, печени, селезенки молодых и старых организмов, создают базу для целенаправленной разработки новых лекарственных препаратов, том числе геропротекторов.

Ключевые слова: пролиферация, короткие пептиды, органотипическая культура тканей, кора головного мозга, селезенка, печень

The stimulating effect of short peptides on cellular proliferation in organotypic tissue culture

N. I. Chalisova^{✉1}, P. N. Ivanova¹, E. S. Egozova², E. A. Nikitina^{1,2}

¹ Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

² Herzen State Pedagogical University of Russia, 48 Moika River Emb., Saint Petersburg 191186, Russia

Authors

Natalia I. Chalisova, SPIN: 2139-7608, ORCID: 0000-0002-2371-0043, e-mail: ni_chalisova@mail.ru

Polina N. Ivanova, SPIN: 9552-5350, ORCID: 0000-0001-7112-0673, e-mail: ivanovapolina19@mail.ru

Ekaterina S. Egozova, ORCID: 0000-0002-0055-3778, e-mail: ekaterina_egozova@mail.ru

Ekaterina A. Nikitina, SPIN: 7844-8621, Scopus AuthorID: 56603106300, ResearcherID: L-5761-2014, ORCID: 0000-0003-1897-8392, e-mail: 21074@mail.ru

For citation: Chalisova, N. I., Ivanova, P. N., Egozova, E. S., Nikitina, E. A. (2023) The stimulating effect of short peptides on cellular proliferation in organotypic tissue culture. *Integrative Physiology*, vol. 4, no. 2, pp. 225–234. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-2-225-234> EDN TIIBQV

Received 5 May 2023; reviewed 6 June 2023; accepted 7 June 2023.

Funding: This study was supported by the State Programme 47 GP ‘Scientific and Technological Development of the Russian Federation’ (2019-2030), Topic No. 0134-2019-0004.

Copyright: © N. I. Chalisova, P. N. Ivanova, E. S. Egozova, E. A. Nikitina. (2023). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under [CC BY-NC License 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Abstract. Proliferation and apoptosis present an important research topic in modern physiology and medicine. Saint Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology developed the technology of extracting polypeptide complexes from different organs and tissues of the calf. These polypeptides stimulate cellular proliferation in culture of different tissues. A polypeptide complex contains short peptides that can possess the same biological activity. The goal of this investigation was to discover the effect of short peptides on cellular proliferation in organotypic culture of brain cortex, liver and spleen tissues of young (3 months) and old (18 months) rats. It was established that effective concentrations of peptides Glu-Asp-Arg, Glu-Asp-Pro, Glu-Asp-Leu and Asp-Ser, Asp-Leu, Asp-Ala, Asp-Gly, Asp-Arg, Ala-Gly stimulate statistically significant ($p < 0.05$ as compared with controls) cellular proliferation in explants of brain cortex, liver and spleen tissues of young and old rats. The obtained data create the basis for the development of new medicinal drugs, including geroprotectors.

Keywords: proliferation, short peptides, organotypic tissue culture, brain cortex, spleen, liver

Введение

Исследование механизмов регулирования многоклеточных систем и сложного равновесного состояния между двумя основными физиологическими процессами, пролиферацией и апоптозом, является актуальной задачей современной физиологии и медицины. В регуляции этих процессов немаловажную роль играют низкомолекулярные вещества пептидной природы, что создает предпосылки для их терапевтического применения (Katsamakos et al. 2017; Wang et al. 2018; Wu et al. 2020). В России создание лекарственных препаратов на основе коротких пептидов начало активно развиваться с 1970-х гг. в Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова. Затем оно продолжилось в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии, где была разработана техноло-

гия выделения ряда полипептидных комплексов (ППК) из различных органов и тканей телят, оказывающих стимулирующее влияние на клеточную пролиферацию в органотипической культуре соответствующих тканей экспериментальных животных (Хавинсон и др. 2013). ППК принимают участие в сигнальной трансдукции между различными типами клеток и регуляции физиологических процессов в организме.

Методами масс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) было показано, что в составе полипептидных комплексов могут содержаться короткие пептиды, имеющие сходную с ними биологическую активность. Короткие пептиды являются минорными активными компонентами исследованных препаратов полипептидных комплексов. Относительное содержание коротких пептидов составляет не более 0,6 мг/г. На основе

анализа аминокислотного состава экстрагированных ППК, а также с применением метода ВЭЖХ, был сконструирован и синтезирован ряд коротких пептидов — ди- и трипептидов (Козлов и др. 2016; Хавинсон и др. 2013). Биорегуляторные пептиды, содержащиеся практически во всех тканях и органах, выполняют не только сигнальную роль, но и непосредственно участвуют в регуляции физиологических процессов, от отдельных специализированных функций до сложных поведенческих актов (Хавинсон и др. 2019; Zalomaeva et al. 2020). В связи с этим актуальными являются исследования влияния ППК на ткани организма в различные возрастные периоды. Для быстрого скрининга биологической активности исследуемых веществ используется эффективный метод органотипического культивирования различных тканей организма (Концевая и др. 2012). В предпринятом ранее скрининговом исследовании сравнительного действия ди-, три- и тетрапептидов и аминокислот, входящих в их состав, на развитие органотипических культур тканей животных, было выявлено, что ди- и трипептиды занимали промежуточное положение между аминокислотами и тетрапептидами в отношении активного воздействия на процессы клеточной пролиферации и апоптоза (Хавинсон и др. 2015). В этой связи мы решили сосредоточиться на рассмотрении именно ди- и трипептидов.

Целью исследования было выявление действия коротких пептидов на клеточную пролиферацию в культивируемых тканях коры головного мозга, селезенки, печени крыс различного возраста.

Материалы и методы

Работа проведена на крысах линии Вистар массой 200–250 г из ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем». Экспериментальный протокол утвержден Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И. П. Павлова РАН (№ 12/12 от «12» декабря 2022 г.); работу проводили в соответствии с международными принципами биомедицинских исследований с использованием животных. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище и световом режиме 12:12 ч.

Проведено органотипическое культивирование тканей коры головного мозга, селезенки, печени в присутствии коротких пептидов — трипептидов Glu-Asp-Arg, Glu-Asp-Pro, Glu-

Asp-Leu и дипептидов Asp-Ser, Asp-Leu, Asp-Ala, Asp-Gly, Asp-Arg, Ala-Gly. Культивировали ткани молодых (2–3-месячных) и старых (18-месячных) крыс. В экспериментах использовано 300 эксплантатов тканей коры головного мозга, 350 эксплантатов селезенки и 300 эксплантатов печени крыс.

Для выделения и препарирования ткани использовали бинокулярный стереоскопический микроскоп МБС-10. Для взятия материала и его препаровки применяли набор инструментов для глазной хирургии. Отпрепарированные в стерильных условиях фрагменты тканей крыс разделяли на более мелкие части величиной около 1 мм³, которые помещали в чашки Петри с полилизинным покрытием дна. На дно одной чашки помещали 18–20 эксплантатов на расстоянии 3 мм друг от друга. Для прикрепления эксплантатов к подложке герметически закрытые чашки Петри с эксплантатами помещали в термостат при температуре 36,8 °С на 30 минут и заливали 3 мл питательной среды. Используемая культуральная среда (рН = 7,2) содержала 35% раствора Хенкса, 35% среды Игла, 25% фетальной сыворотки теленка, глюкозу (0,6%), инсулин (0,5 ЕД/мл), гентамицин (100 ЕД/мл).

К каждой ткани добавляли те короткие пептиды, которые были синтезированы на основе ППК соответствующих тканей. В культуральную среду добавляли исследуемые пептиды в эффективных концентрациях — 1 нг/мл. В чашки Петри с экспериментальными эксплантатами добавляли 3 мл питательной среды с короткими пептидами в исследуемой концентрации, в чашки Петри с контрольными эксплантатами — 3 мл питательной среды. Таким образом, эксплантаты экспериментальной и контрольной групп развивались в одинаковых объемах питательной среды. Культивирование эксплантатов тканей происходило в термостате при температуре 37 ± 0,1 °С, 5% CO₂ в течение трех суток.

Рост эксплантатов ткани в органотипической культуре исследовали прижизненно с помощью фазово-контрастного микроскопа. Для количественной оценки влияния исследуемых препаратов использовали морфометрический метод и пакет программ «PhotoM 1.2». Рассчитывали индекс площади (ИП) как отношение площади всего эксплантата, включая периферическую зону роста, к площади центральной зоны. За условную единицу площади принимали квадрат окуляр-сетки микроскопа. Сторона квадрата при увеличении 3,5 × 10 равнялась 150 мкм. Значения ИП выражали в процентах по сравнению со значениями ИП контрольных эксплан-

татов, которые принимали за 100%. Достоверность различий ИП контрольных и экспериментальных образцов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента ($p < 0,05$). Для проверки нормальности распределения применяли критерий Шапиро — Уилка.

Результаты и обсуждение

При исследовании влияния в эффективных концентрациях трипептидов Glu-Asp-Arg, Glu-Asp-Pro, Glu-Asp-Leu и дипептидов Asp-Ser, Asp-Leu, Asp-Ala, Asp-Gly, Asp-Arg, Ala-Gly на ткани крысы установлено, что эти пептиды статистически достоверно ($p < 0,05$ по сравнению с контролем) стимулируют клеточную пролиферацию в эксплантатах коры головного мозга, печени, селезенки, как молодых, так и старых крыс.

Так, при добавлении в культуральную среду пептидов Glu-Asp-Arg и Asp-Ser ИП эксплан-

татов коры головного мозга молодых крыс увеличивался на 23–25%, ИП эксплантатов старых крыс увеличивался на 19,5–20% по сравнению с контролем (табл. 1).

При добавлении в культуральную среду пептидов Glu-Asp-Leu и Asp-Leu ИП эксплантатов печени молодых крыс увеличивался на 22–28%, ИП эксплантатов старых крыс увеличивался на 20–21% по сравнению с контролем (табл. 2).

При добавлении в культуральную среду пептидов Glu-Asp-Pro, Asp-Ala, Asp-Gly, Asp-Arg, Ala-Gly ИП эксплантатов селезенки молодых крыс увеличивался на 20–29%, ИП эксплантатов старых крыс увеличивался на 19,5–23% по сравнению с контролем (табл. 3).

Таким образом получена целостная картина влияния ди- и трипептидов, стимулирующих развитие клеточной пролиферации в тканях коры головного мозга, печени, селезенки крыс. ИП эксплантатов тканей от молодых крыс в целом был несколько выше (20–29%), чем ИП

Табл. 1. Влияние пептидов Glu-Asp-Arg и Asp-Ser на клеточную пролиферацию в эксплантатах коры головного мозга

Пептиды	Кора головного мозга	
	Индекс площади (ИП, %)	
	Молодые крысы	Старые крысы
Glu-Asp-Arg	25 ± 3%*	20 ± 1%*
Asp-Ser	23 ± 5%*	19,5 ± 1%*

Примечание: * — отличия по сравнению с индексом площади в контроле ($p < 0,05$).

Table 1. Effect of Glu-Asp-Arg and Asp-Ser peptides on cellular proliferation in cortical explants

Peptides	Brain cortex	
	Area index (AI, %)	
	Young rats	Old rats
Glu-Asp-Arg	25 ± 3%*	20 ± 1%*
Asp-Ser	23 ± 5%*	19.5 ± 1%*

Note: * — differences against the area index in the control group ($p < 0.05$).

Табл. 2. Влияние пептидов Glu-Asp-Leu и Asp-Leu на клеточную пролиферацию в эксплантатах печени

Пептиды	Печень	
	Индекс площади (ИП, %)	
	Молодые крысы	Старые крысы
Glu-Asp-Leu	28 ± 5%*	21 ± 3%*
Asp-Leu	22 ± 3%*	20 ± 1%*

Примечание: * — отличия по сравнению с индексом площади в контроле ($p < 0,05$).

Table 2. Effect of Glu-Asp-Leu and Asp-Leu peptides on cellular proliferation in liver explants

Peptides	Liver	
	Area index (AI, %)	
	Young rats	Old rats
Glu-Asp-Leu	28 ± 5%*	21 ± 3%*
Asp-Leu	22 ± 3%*	20 ± 1%*

Note: * — differences against the area index in the control group ($p < 0.05$).

Табл. 3. Влияние пептидов Glu-Asp-Pro, Asp-Ala, Asp-Gly, Asp-Arg, Ala-Gly на клеточную пролиферацию в эксплантатах селезенки

Пептиды	Селезенка	
	Индекс площади (ИП, %)	
	Молодые крысы	Старые крысы
Glu-Asp-Pro	29 ± 7%*	23 ± 3%*
Asp-Ala	20 ± 1%*	19,5 ± 1%*
Asp-Gly	25 ± 5%*	21 ± 3%*
Asp-Arg	21 ± 3%*	20 ± 1%*
Ala-Gly	27 ± 5%*	22 ± 3%*

Примечание: * — отличия по сравнению с индексом площади в контроле (p < 0,05).

Table 3. Effect of Glu-Asp-Pro, Asp-Ala, Asp-Gly, Asp-Arg, Ala-Gly peptides on cellular proliferation in splenic explants

Peptides	Spleen	
	Area index (AI, %)	
	Young rats	Old rats
Glu-Asp-Pro	29 ± 7%*	23 ± 3%*
Asp-Ala	20 ± 1%*	19.5 ± 1%*
Asp-Gly	25 ± 5%*	21 ± 3%*
Asp-Arg	21 ± 3%*	20 ± 1%*
Ala-Gly	27 ± 5%*	22 ± 3%*

Note: *—differences against the area index in the control group (p < 0.05).

эксплантатов тканей старых крыс (19,5–23%). Однако достоверных различий не обнаружено, что может свидетельствовать о положительном влиянии исследуемых веществ на клеточную пролиферацию вне зависимости от возраста.

Ранее нами было показано, что действие на селезенку трипептида Glu-Asp-Arg в условиях ослабления магнитного поля (ОМП) вызывало угнетение клеточного роста. Очевидно одновременное влияние двух стимулирующих факторов (ОМП + пептид) приводит к их синергическому эффекту, и в культивируемых тканях происходят процессы контактного торможения, т. е. угнетения клеточной пролиферации (Иванова и др. 2021). Этот факт необходимо учитывать при разработке схем терапевтического воздействия, включающих сочетанное действие факторов.

В данной работе нами был сделан акцент на исследование максимально коротких пептидов, содержащих две или три аминокислоты. Отмечается, что именно состав аминокислот определяет свойства белковых молекул (Aftabuddin 2007). В предыдущих работах при исследовании влияния кодируемых аминокислот в органотипической культуре тканей крыс

(Чалисова и др. 2011; 2021) было показано, что стимулирующее влияние на клеточную пролиферацию коры головного мозга оказывает аспарагиновая кислота (aspartic acid, Asp), которая содержится во всех исследованных трипептидах и подавляющем большинстве дипептидов. В качестве предшественника для синтеза нуклеотидов аспарагиновая кислота необходима для пролиферации клеток. Это согласуется с литературными данными, свидетельствующими, что аспарат стимулирует пролиферацию клеток. Сигнальные пути, посредством которых изменяется биосинтез аспартата для контроля роста клеток, остаются преимущественно неизвестными, хотя в последнее время выявлено, что HIF1α подавляет образование аспартата путем изменения метаболизма глутамин (Meléndez-Rodríguez et al. 2019). Это вполне созвучно новым данным китайских исследователей, показавших, что аспарат способствует пролиферации и дифференцировке путем регуляции метаболизма и динамики митохондрий (Wang et al. 2022). В настоящее время признано, что биосинтез аспартата в значительной степени регулируется митохондриальным метаболизмом, включая дыхание и обмен глутамин в раковых

клетках. Поэтому в условиях подавления митохондриального метаболизма (мутации, гипоксия или химические ингибиторы) аспарат может стать ограничивающим фактором для роста опухоли и выживания раковых клеток. Примечательно, что доступность аспартата связана с чувствительностью или устойчивостью к различным терапевтическим препаратам (Helenius et al. 2021).

В состав исследуемых трипептидов также входит глутаминовая кислота (glutamic acid, Glu). Известно, что глутамат способствует пролиферации клеток путем активации двух различных сигнальных путей, связанных с селективными подтипами глутаматных рецепторов. Гарсиа с соавторами показали, что глутамат стимулирует пролиферацию клеток пигментного эпителия сетчатки (retinal pigment epithelium, RPE), а также фосфорилирование ERK и CREB (García et al. 2008). Однако сочетание с другими аминокислотами в составе дипептидов приводит к обратному эффекту. Так, дипептиды глутамилсерин, глутамилпролин и глутамилтриптофан проявляют выраженную антипролиферативную активность в линии раковых клеток WiDr (Silveira-Dorta et al. 2015). Очевидно, действие отдельных аминокислот и содержащих их коротких пептидов может носить разнонаправленный характер.

Важно отметить, что все изученные трипептиды характеризуются сочетанием аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты. В нашем исследовании эти трипептиды стимулировали клеточную пролиферацию в различных культурах тканей. На первый взгляд, это противоречит имеющимся данным, что комбинация аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты приводит к повышенной антипролиферативной активности и ингибированию Akt фосфорилирования (Kobayashi et al. 2015; Yamaguchi et al. 2016). Данная комбинация может быть полезна для индукции гибели опухолевых клеток и использована в качестве терапевтического агента для лечения рака. Однако необходимо учитывать, что в составе исследуемых трипептидов аспарагиновая и глутаминовая кислоты сочетались с третьей аминокислотой — пролином, лейцином или аргинином. Это может влиять на характер воздействия данных веществ на клеточную пролиферацию. Дипептиды Asp-Leu и Asp-Arg также проявляли пролиферативную активность. Относительно действия отдельных аминокислот имеются данные, что лейцин может усиливать пролиферацию клеток через PI3K/Akt/GSK-3 α/β -катениновый путь (Coëffier et al. 2011), а также посредством активации mTORC1

сигнального пути (Dai et al. 2015). Показано увеличение клеточной пролиферации и под влиянием пролина (Ding et al. 2020; Westbrook et al. 2022). К подобным эффектам приводило и добавление аргинина к культурам различных клеток, включая иммунные (Crowther et al. 2022) и клетки эндометрия (Greene et al. 2013). Интересны новые данные португальских исследователей, обнаруживших, что отсутствие одновременно лейцина и аргинина снижает пролиферацию эмбриональных стволовых клеток мыши посредством остановки клеточного цикла (Correia et al. 2022).

Таким образом, содержащиеся в полипептидных комплексах ди- и трипептиды могут усиливать клеточную пролиферацию за счет различных сочетаний ряда аминокислот. Очевидно, именно сочетание аминокислот определяет характер действия коротких пептидов, что обуславливает необходимость изучения их физиологических эффектов.

Заключение

Прогресс клинической медицины во многом зависит от исследований, проводимых на уровне биологически активных молекул (Менджеричкий и др. 2012; Fedoreyeva et al. 2011). Установлено, что синтезированные короткие пептиды обладают свойствами природных пептидных биорегуляторов. Многолетние клинические исследования показали, что индивидуальный подбор пептидных биорегуляторов позволяет осуществлять эффективную профилактику, лечение различных заболеваний и значительно улучшать качество жизни (Трофимова, Трофимова 2015). Более того, короткие пептиды оказывают специфическое действие в значительно более низких концентрациях по сравнению с пептидными экстрактами, не вызывая побочных эффектов, как и кодируемые аминокислоты. В то же время показано, что аминокислоты и их производные способны разнонаправленно влиять на клеточную пролиферацию (Chalisova et al. 2019). В связи с этим полученные данные о коротких пептидах, стимулирующих клеточную пролиферацию культивируемых тканей коры головного мозга, печени, селезенки молодых и старых организмов, создают базу для целенаправленной разработки новых лекарственных препаратов, том числе геропротекторов (Хавинсон 2020). Эти препараты могут быть использованы для усиления регенеративных процессов при патологии тканей печени, нервной и иммунной систем.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

Соответствие принципам этики

Работа была проведена в соответствии с международными принципами биомедицинских исследований с использованием животных. Экспериментальный протокол утвержден Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И. П. Павлова РАН (№ 12/12 от «12» декабря 2022 г.).

Ethics Approval

The study was carried out in accordance with international principles of biomedical research using animals. The experimental protocol was approved by the Commission on Humane Treatment of Animals of the Pavlov Institute of Physiology RAS (No. 12/12, 12 December 2022).

Вклад авторов

- а) Чалисова Наталья Иосифовна — планирование эксперимента, написание статьи;
- б) Иванова Полина Николаевна — постановка эксперимента, математическая обработка данных;
- в) Егозова Екатерина Сергеевна — постановка эксперимента, математическая обработка данных, подготовка иллюстративного материала;
- г) Никитина Екатерина Александровна — планирование эксперимента, обсуждение результатов, написание статьи.

Author Contributions

- а) Natalia I. Chalisova planned the experiment, drafted the article;
- б) Polina N. Ivanova conducted the experiment, performed mathematical data processing;
- в) Ekaterina S. Egozova conducted the experiment, performed mathematical data processing, prepared the figures;
- д) Ekaterina A. Nikitina planned the experiment, discussed the results, drafted the article.

Литература

- Иванова, П. Н., Заломаева, Е. С., Сурма, С. В. и др. (2021) Влияние ослабленного магнитного поля Земли на органотипическую культуру тканей различного генеза. *Молекулярная медицина*, т. 19, № 4, с. 47–51. <https://doi.org/10.29296/24999490-2021-04-08>
- Козлов, К. Л., Болотов, И. И., Линькова, Н. С. и др. (2016) Молекулярные аспекты действия вазопротекторного пептида *KED* при атеросклерозе и рестенозе. *Успехи геронтологии*, т. 29, № 4, с. 646–650.
- Концевая, Е. А., Линькова, Н. С., Чалисова, Н. И. и др. (2012) Влияние аминокислот на экспрессию сигнальных молекул в органотипической культуре селезенки. *Клеточные технологии в биологии и медицине*, № 2, с. 102–105.
- Менджеричкий, А. М., Карантыш, Г. В., Абрамчук, В. А., Рыжак, Г. А. (2012) Влияние короткого пептида на нейродегенеративные процессы у крыс, перенесших пренатальную гипоксию. *Нейрохимия*, т. 29, № 3, с. 229–234.
- Трофимова, А. В., Трофимова, С. В. (2015) 15-летний опыт применения молекулярно-генетического исследования в клинической практике. *Врач*, № 6, с. 66–68.
- Хавинсон, В. Х. (2020) Лекарственные пептидные препараты: прошлое, настоящее, будущее. *Клиническая медицина*, т. 98, № 3, с. 165–177. <https://doi.org/10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177>
- Хавинсон, В. Х., Кузник, Б. И., Рыжак, Г. А. (2013) Пептидные биорегуляторы — новый класс геропротекторов. Сообщение 2. Результаты клинических исследований. *Успехи геронтологии*, т. 26, № 1, с. 20–37.
- Хавинсон, В. Х., Рывкин, А., Трофимова, С. В. и др. (2019) Персонализированная профилактика возрастной патологии как одно из условий оздоровления населения России. *Врач*, т. 7, с. 18–22. <https://doi.org/10.29296/25877305-2019-07-03>
- Хавинсон, В. Х., Чалисова, Н. И., Линькова, Н. С. и др. (2015) Зависимость тканеспецифического действия пептидов от количества аминокислот, входящих в их состав. *Фундаментальные исследования*, № 2, с. 497–503.
- Чалисова, Н. И., Концевая, Е. А., Войцеховская, М. А., Комашня, А. В. (2011) Регуляторное влияние кодируемых аминокислот на основные клеточные процессы у молодых и старых животных. *Успехи геронтологии*, т. 24, № 2, с. 189–197.

- Чалисова, Н. И., Никитина, Е. А., Александрова, М. Л., Золотоверхая, Е. А. (2021) Влияние кодируемых L-аминокислот на органотипическую культуру тканей различного генеза. *Интегративная физиология*, т. 2, № 2, с. 196–204. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-2-196-204>
- Aftabuddin, Md., Kundu, S. (2007) Hydrophobic, hydrophilic, and charged amino acid networks within protein. *Biophysical Journal*, vol. 93, no. 1, pp. 225–231. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.098004>
- Chalisova, N. I., Ivanova, P. N., Zalomaeva, E. S. et al. (2019) Effect of tryptophan and kynurenine on cell proliferation in tissue culture of the cerebral cortex in young and old rats. *Advances in Gerontology*, vol. 9, no. 2, pp. 186–189. <https://doi.org/10.1134/S2079057019020073>
- Coëffier, M., Claeysens, S., Bensifi, M. et al. (2011) Influence of leucine on protein metabolism, phosphokinase expression, and cell proliferation in human duodenum 1, 2, 3, 4. *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 93, no. 6, pp. 1255–1262. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.013649>
- Correia, B., Sousa, M. I., Branco, A. F. et al. (2022) Leucine and arginine availability modulate mouse embryonic stem cell proliferation and metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 22, article 14286. <https://doi.org/10.3390/ijms232214286>
- Crowther, R. R., Schmidt, S. M., Lange, S. M. et al. (2022) Cutting edge: L-Arginine transfer from antigen-presenting cells sustains CD4⁺ T cell viability and proliferation. *The Journal of Immunology*, vol. 208, no. 4, pp. 793–798. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100652>
- Dai, J.-M., Yu, M.-X., Shen, Z.-Y. et al. (2015) Leucine promotes proliferation and differentiation of primary preterm rat satellite cells in part through mTORC1 signaling pathway. *Nutrients*, vol. 7, no. 5, pp. 3387–3400. <https://doi.org/10.3390/nu7053387>
- Ding, Z., Ericksen, R. E., Escande-Beillard, N. et al. (2020) Metabolic pathway analyses identify proline biosynthesis pathway as a promoter of liver tumorigenesis. *Journal of Hepatology*, vol. 72, no. 4, pp. 725–735. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.10.026>
- Fedoreyeva, L. I., Kireev, I. I., Khavinson, V. Kh., Vanyushin, B. F. (2011) Penetration of short fluorescence-labeled peptides into the nucleus in HeLa cells and *in vitro* specific interaction of the peptides with deoxyribonucleotides and DNA. *Biochemistry*, vol. 76, no. 11, pp. 1210–1219. <https://doi.org/10.1134/S0006297911110022>
- García, S., López, E., López-Colomé, A. M. (2008) Glutamate accelerates RPE cell proliferation through ERK1/2 activation via distinct receptor-specific mechanisms. *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 104, no. 2, pp. 377–390. <https://doi.org/10.1002/jcb.21633>
- Greene, J. M., Feugang, J. M., Pfeiffer, K. E. et al. (2013) L-arginine enhances cell proliferation and reduces apoptosis in human endometrial RL95-2 cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 11, article 15. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-15>
- Helenius, I. T., Madala, H. R., Yeh, J.-R. J. (2021) An Asp to strike out cancer? Therapeutic possibilities arising from aspartate's emerging roles in cell proliferation and survival. *Biomolecules*, vol. 11, no. 11, article 1666. <https://doi.org/10.3390/biom11111666>
- Katsamakos, S., Chatzisideri, T., Thysiadis, S., Sarli, V. (2017) RGD-mediated delivery of small-molecule drugs. *Future Medicinal Chemistry*, vol. 9, no. 6, pp. 579–604. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0008>
- Kobayashi, H., Motoyoshi, N., Itagaki, T. et al. (2015) Effect of the replacement of aspartic acid/glutamic acid residues with asparagine/glutamine residues in RNase He1 from *Herichium erinaceus* on inhibition of human leukemia cell line proliferation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 79, no. 2, pp. 211–217. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.972327>
- Meléndez-Rodríguez, F., Urrutia, A. A., Lorendeau, D. et al. (2019) HIF1 α suppresses tumor cell proliferation through inhibition of aspartate biosynthesis. *Cell Reports*, vol. 26, no. 9, pp. 2257–2265.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.106>
- Silveira-Dorta, G., Martín, V. S., Padrón, J. M. (2015) Synthesis and antiproliferative activity of glutamic acid-based dipeptides. *Amino Acids*, vol. 47, no. 8, pp. 1527–1532. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1987-0>
- Wang, D., Kuang, Y., Wan, Z. et al. (2022) Aspartate alleviates colonic epithelial damage by regulating intestinal stem cell proliferation and differentiation via mitochondrial dynamics. *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 66, no. 24, article e2200168. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202200168>
- Wang, X., Chen, C., Zhou, G. et al. (2018) Sepia ink oligopeptide induces apoptosis of lung cancer cells via mitochondrial pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 45, no. 5, pp. 2095–2106. <https://doi.org/10.1159/000488046>
- Westbrook, R. L., Bridges, E., Roberts, J. et al. (2022) Proline synthesis through PYCR1 is required to support cancer cell proliferation and survival in oxygen-limiting conditions. *Cell Reports*, vol. 38, no. 5, article 110320. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110320>
- Wu, L., Hu, X., Xu, L., Zhang, G. (2020) Cod skin oligopeptide inhibits human gastric carcinoma cell growth by inducing apoptosis. *Nutrition and Cancer*, vol. 72, no. 2, pp. 218–225. <https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1622740>
- Yamaguchi, Y., Yamamoto, K., Sato, Y. et al. (2016) Combination of aspartic acid and glutamic acid inhibits tumor cell proliferation. *Biomedical Research*, vol. 37, no. 2, pp. 153–159. <https://doi.org/10.2220/biomedres.37.153>

Zalomaeva, E. S., Ivanova, P. N., Chalisova, N. I. et al. (2020) Effects of weak static magnetic field and oligopeptides on cell proliferation and cognitive functions in different animal species. *Technical Physics*, vol. 65, no. 10, pp. 1585–1590. <https://doi.org/10.1134/S1063784220100254>

References

- Aftabuddin, Md., Kundu, S. (2007) Hydrophobic, hydrophilic, and charged amino acid networks within protein. *Biophysical Journal*, vol. 93, no. 1, pp. 225–231. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.098004> (In English)
- Chalisova, N. I., Ivanova, P. N., Zalomaeva, E. S. et al. (2019) Effect of tryptophan and kynurenine on cell proliferation in tissue culture of the cerebral cortex in young and old rats. *Advances in Gerontology*, vol. 9, no. 2, pp. 186–189. <https://doi.org/10.1134/S2079057019020073> (In English)
- Chalisova, N. I., Kontsevaya, E. A., Voytzechovskaya, M. A., Komashnya, A. V. (2011) Regulatornoe vliyanie kodiruemykh aminokislot na osnovnye kletochnye protsessy u molodykh i starykh zhivotnykh [The regulated effect of the coded amino acids on the basic cellular processes in young and old animals]. *Uspekhi gerontologii — Advances in Gerontology*, vol. 24, no. 2, pp. 189–197. (In Russian)
- Chalisova, N. I., Nikitina, E. A., Alexandrova, M. L., Zolotoverkhaja, E. A. (2021) Vliyanie kodiruemykh L-aminokislot na organotipicheskuyu kulturu tkaney razlichnogo geneza [The effect of coded L-amino acids on the organotypic culture of tissues of different genesis]. *Integrativnaya fiziologiya — Integrative Physiology*, vol. 2, no. 2, pp. 196–204. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-2-196-204> (In Russian)
- Coëffier, M., Claeysens, S., Bensifi, M. et al. (2011) Influence of leucine on protein metabolism, phosphokinase expression, and cell proliferation in human duodenum 1, 2, 3, 4. *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 93, no. 6, pp. 1255–1262. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.013649> (In English)
- Correia, B., Sousa, M. I., Branco, A. F. et al. (2022) Leucine and arginine availability modulate mouse embryonic stem cell proliferation and metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 22, article 14286. <https://doi.org/10.3390/ijms232214286> (In English)
- Crowther, R. R., Schmidt, S. M., Lange, S. M. et al. (2022) Cutting edge: γ -Arginine transfer from antigen-presenting cells sustains CD4⁺ T cell viability and proliferation. *The Journal of Immunology*, vol. 208, no. 4, pp. 793–798. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100652> (In English)
- Dai, J.-M., Yu, M.-X., Shen, Z.-Y. et al. (2015) Leucine promotes proliferation and differentiation of primary preterm rat satellite cells in part through mTORC1 signaling pathway. *Nutrients*, vol. 7, no. 5, pp. 3387–3400. <https://doi.org/10.3390/nu7053387> (In English)
- Ding, Z., Ericksen, R. E., Escande-Beillard, N. et al. (2020) Metabolic pathway analyses identify proline biosynthesis pathway as a promoter of liver tumorigenesis. *Journal of Hepatology*, vol. 72, no. 4, pp. 725–735. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.10.026> (In English)
- Fedoreyeva, L. I., Kireev, I. I., Khavinson, V. Kh., Vanyushin, B. F. (2011) Penetration of short fluorescence-labeled peptides into the nucleus in HeLa cells and *in vitro* specific interaction of the peptides with deoxyribonucleotides and DNA. *Biochemistry*, vol. 76, no. 11, pp. 1210–1219. <https://doi.org/10.1134/S0006297911110022> (In English)
- García, S., López, E., López-Colomé, A. M. (2008) Glutamate accelerates RPE cell proliferation through ERK1/2 activation via distinct receptor-specific mechanisms. *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 104, no. 2, pp. 377–390. <https://doi.org/10.1002/jcb.21633> (In English)
- Greene, J. M., Feugang, J. M., Pfeiffer, K. E. et al. (2013) L-arginine enhances cell proliferation and reduces apoptosis in human endometrial RL95-2 cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 11, article 15. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-15> (In English)
- Helenius, I. T., Madala, H. R., Yeh, J.-R. J. (2021) An Asp to strike out cancer? Therapeutic possibilities arising from aspartate's emerging roles in cell proliferation and survival. *Biomolecules*, vol. 11, no. 11, article 1666. <https://doi.org/10.3390/biom11111666> (In English)
- Ivanova, P. N., Zalomaeva, E. S., Surma, S. V. et al. (2021) Vliyanie oslablennogo magnitnogo polya Zemli na organotipicheskuyu kulturu tkaney razlichnogo geneza [Impact of weakened geomagnetic field on the organotypic cell culture of various genesis]. *Molekulyarnaya meditsina — Molecular Medicine*, vol. 19, no. 4, pp. 47–51. <https://doi.org/10.29296/24999490-2021-04-08> (In Russian)
- Katsamakos, S., Chatzisdieri, T., Thysiadis, S., Sarli, V. (2017) RGD-mediated delivery of small-molecule drugs. *Future Medicinal Chemistry*, vol. 9, no. 6, pp. 579–604. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0008> (In English)
- Khavinson, V. Kh. (2020) Lekarstvennye peptidnye preparaty: proshloe, nastoyashchee, budushchee [Peptide medicines: Past, present, future]. *Klinicheskaya meditsina — Clinical Medicine*, vol. 98, no. 3, pp. 165–177. <https://doi.org/10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177> (In Russian)
- Khavinson, V. Kh., Chalisova, N. I., Linkova, N. S. et al. (2015) Zavisimost' tkanespetsificheskogo dejstviya peptidov ot kolichestva aminokislot, vkhodyashchikh v ikh sostav [The dependence of tissue-specific peptides activity on the number of amino acids in the peptides]. *Fundamental'nye issledovaniya — Fundamental Research*, no. 2, pp. 497–503. (In Russian)
- Khavinson, V. Kh., Kuznik, B. I., Ryzhak, G. A. (2013) Peptidnye bioregulyatory — novyj klass geroprotektorov. Soobshchenie 2. Rezul'taty klinicheskikh issledovanij [Peptide bioregulators: The new class of geroprotectors.

- Message 2. Clinical studies results]. *Uspekhi gerontologii — Advances in Gerontology*, vol. 26, no. 1, pp. 20–37. (In Russian)
- Khavinson, V. Kh., Ryvkin, A., Trofimova, S. et al. (2019) Personalizirovannaya profilaktika vozrastnoj patologii kak odno iz uslovij ozdorovleniya naseleniya Rossii [Personalized prevention of age-related pathology as one of health improvement conditions in Russian population]. *Vrach — The Doctor*, vol. 7, pp. 18–22. <https://doi.org/10.29296/25877305-2019-07-03> (In Russian)
- Kobayashi, H., Motoyoshi, N., Itagaki, T. et al. (2015) Effect of the replacement of aspartic acid/glutamic acid residues with asparagine/glutamine residues in RNase He1 from *Hericium erinaceus* on inhibition of human leukemia cell line proliferation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 79, no. 2, pp. 211–217. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.972327> (In English)
- Kontsevaya, E. A., Linkova, N. S., Chalisova, N. I. et al. (2012) Vliyanie aminokislot na ekspressiyu signal'nykh molekul v organotipicheskoy kul'ture selezhenki [Effect of amino acids on the expression of signaling molecules in organotypic culture of the spleen]. *Kletochnyye tekhnologii v biologii i meditsine*, no. 2, pp. 102–105. (In Russian)
- Kozlov, K. L., Bolotov, I. I., Linkova, N. S. et al. (2016) Molekulyarnye aspekty dejstviya vasoprotekornogo peptida *KED* pri ateroskleroze i restenoze [Molecular aspects of vasoprotective peptide *KED* activity during atherosclerosis and restenosis]. *Uspekhi gerontologii — Advances in Gerontology*, vol. 29, no. 4, pp. 646–650. (In Russian)
- Meléndez-Rodríguez, F., Urrutia, A. A., Lorendeau, D. et al. (2019) HIF1 α suppresses tumor cell proliferation through inhibition of aspartate biosynthesis. *Cell Reports*, vol. 26, no. 9, pp. 2257–2265.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.106> (In English)
- Menzheritskij, A. M., Karantysh, G. V., Abramchuk, V. A., Ryzhak, G. A. (2012) Vliyanie korotkogo peptida na nejrodegenerativnye protsessy u krysa, perenesshikh prenatal'nyu gipoksiyu [Effect of short peptide on neurodegenerative processes in rats undergoing prenatal hypoxia]. *Nejrokhimiya*, vol. 29, no. 3, pp. 229–234. (In Russian)
- Silveira-Dorta, G., Martín, V. S., Padrón, J. M. (2015) Synthesis and antiproliferative activity of glutamic acid-based dipeptides. *Amino Acids*, vol. 47, no. 8, pp. 1527–1532. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1987-0> (In English)
- Trofimova, A. V., Trofimova, S. V. (2015) 15-letnij opyt primeneniya molekulyarno-geneticheskogo issledovaniya v klinicheskoy praktike [15-years experience with molecular genetic examination used in clinical practice]. *Vrach — The Doctor*, no. 6, pp. 66–68. (In Russian)
- Wang, D., Kuang, Y., Wan, Z. et al. (2022) Aspartate alleviates colonic epithelial damage by regulating intestinal stem cell proliferation and differentiation via mitochondrial dynamics. *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 66, no. 24, article e2200168. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202200168> (In English)
- Wang, X., Chen, C., Zhou, G. et al. (2018) Sepia ink oligopeptide induces apoptosis of lung cancer cells via mitochondrial pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 45, no. 5, pp. 2095–2106. <https://doi.org/10.1159/000488046> (In English)
- Westbrook, R. L., Bridges, E., Roberts, J. et al. (2022) Proline synthesis through PYCR1 is required to support cancer cell proliferation and survival in oxygen-limiting conditions. *Cell Reports*, vol. 38, no. 5, article 110320. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110320> (In English)
- Wu, L., Hu, X., Xu, L., Zhang, G. (2020) Cod skin oligopeptide inhibits human gastric carcinoma cell growth by inducing apoptosis. *Nutrition and Cancer*, vol. 72, no. 2, pp. 218–225. <https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1622740> (In English)
- Yamaguchi, Y., Yamamoto, K., Sato, Y. et al. (2016) Combination of aspartic acid and glutamic acid inhibits tumor cell proliferation. *Biomedical Research*, vol. 37, no. 2, pp. 153–159. <https://doi.org/10.2220/biomedres.37.153> (In English)
- Zalomaeva, E. S., Ivanova, P. N., Chalisova, N. I. et al. (2020) Effects of weak static magnetic field and oligopeptides on cell proliferation and cognitive functions in different animal species. *Technical Physics*, vol. 65, no. 10, pp. 1585–1590. <https://doi.org/10.1134/S1063784220100254> (In English)