



УДК 57.085.23

EDN ЕТТНОР

<https://doi.org/10.33910/2687-1270-2024-5-2-186-195>

## Влияние сочетаний аминокислот и дипептидов на жизнеспособность культур тканей нервной и иммунной систем молодых и старых крыс

Н. И. Чалисова<sup>✉1,2</sup>, Г. А. Рыжак<sup>2</sup>, Е. А. Никитина<sup>1,3</sup>, А. В. Рубинский<sup>4</sup>

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

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии, 197110, Россия, г. Санкт-Петербург, пр. Динамо, д. 3

<sup>3</sup> Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена, 191186, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. р. Мойки, д. 48

<sup>4</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8

### Сведения об авторах

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

Галина Анатольевна Рыжак, SPIN-код: [5543-5974](#), ORCID: [0000-0003-2536-1438](#), e-mail: [galina@gerontology.ru](mailto:galina@gerontology.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](mailto:21074@mail.ru)

Артемий Владимирович Рубинский, SPIN-код: [3020-0781](#), ORCID: [0000-0003-1041-8745](#), e-mail: [rubinskiyav@1spbmgmu.ru](mailto:rubinskiyav@1spbmgmu.ru)

**Для цитирования:** Чалисова, Н. И., Рыжак, Г. А., Никитина, Е. А., Рубинский, А. В. (2024) Влияние сочетаний аминокислот и дипептидов на жизнеспособность культур тканей нервной и иммунной систем молодых и старых крыс. *Интегративная физиология*, т. 5, № 2, с. 186–195. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2024-5-2-186-195> EDN ЕТТНОР

**Получена** 27 марта 2024; прошла рецензирование 3 апреля 2024; принята 4 апреля 2024.

**Финансирование:** Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН (№1021062411629-7-3.1.4).

**Права:** © Н. И. Чалисова, Г. А. Рыжак, Е. А. Никитина, А. В. Рубинский (2024). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях [лицензии](#) CC BY-NC 4.0.

**Аннотация.** Одно из приоритетных направлений в современной биологии и медицине — изучение регуляторных механизмов повышения жизнеспособности многоклеточных систем. Многие из 20 кодируемых аминокислот стимулируют клеточную пролиферацию в органотипической культуре различных тканей экспериментальных животных. Также известно, что в основе физической жизнеспособности лежит скорость восстановления организма путем стимуляции клеток к пролиферации или апоптозу, осуществляемой под влиянием цитокинов и/или пептидов. В Санкт-Петербургском Институте биорегуляции и геронтологии была разработана технология выделения из различных органов и тканей телат полипептидных комплексов, влияющих на органотипическую культуру тканей экспериментальных животных. В состав полипептидных комплексов входят короткие пептиды — тетра-, три- и дипептиды, которые, являясь минорными компонентами исследованных полипептидных комплексов, обладают высокой биологической активностью. На основе этих данных может быть осуществлена разработка новых лекарственных препаратов, предназначенных для лечения и профилактики общих гериатрических синдромов (например, старческой астении), а также заболеваний различных органов с учетом принципа тканеспецифичности. Целью работы было исследование эффекта различных комбинаций L-аминокислот и дипептидов на жизнеспособность клеток в органотипической культуре ткани нервной и иммунной систем у крыс разного возраста.

**Ключевые слова:** аминокислоты, дипептиды, жизнеспособность, органотипическая культура ткани, нервная система, иммунная система

# The effect of amino acid and dipeptide combinations on the viability of nervous and immune tissue cultures in young and old rats

N. I. Chalisova<sup>✉1,2</sup>, G. A. Ryzhak<sup>2</sup>, E. A. Nikitina<sup>1,3</sup>, A. V. Rubinskiy<sup>4</sup>

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

<sup>2</sup> Saint Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, 3 Dynamo Ave., Saint Petersburg 197110, Russia

<sup>3</sup> Herzen State Pedagogical University of Russia, 48 Moika Emb., Saint Petersburg 191186, Russia

<sup>4</sup> Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 6-8 Lva Tolstogo Str., Saint Petersburg 197022, Russia

## Authors

Natalia I. Chalisova, ORCID: SPIN: 2139-7608, 0000-0002-2371-0043, e-mail: [ni\\_chalisova@mail.ru](mailto:ni_chalisova@mail.ru)

Galina A. Ryzhak, SPIN: 5543-5974, ORCID: 0000-0003-2536-1438, e-mail: [galina@gerontology.ru](mailto:galina@gerontology.ru)

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

Artemiy V. Rubinskiy, SPIN: 3020-0781, ORCID: 0000-0003-1041-8745, e-mail: [rubinskiyav@lspbmgmu.ru](mailto:rubinskiyav@lspbmgmu.ru)

**For citation:** Chalisova, N. I., Ryzhak, G. A., Nikitina, E. A., Rubinskiy, A. V. (2024) The effect of amino acid and dipeptide combinations on the viability of nervous and immune tissue cultures in young and old rats. *Integrative Physiology*, vol. 5, no. 2, pp. 186–195. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2024-5-2-186-195> EDN ETTHOP

**Received** 27 March 2024; reviewed 3 April 2024; accepted 4 April 2024.

**Funding:** The study was supported by the State funding allocated to the Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences (№1021062411629-7-3.1.4).

**Copyright:** © N. I. Chalisova, G. A. Ryzhak, E. A. Nikitina, A. V. Rubinskiy (2024). 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.** One of the priority areas of contemporary biology and medicine is the investigation of regulatory mechanisms that enhance the viability of multicellular systems. Many of the 20 coding amino acids are known to stimulate cell proliferation in organotypic cultures of various tissues in experimental animals. Additionally, the processes of recovery — whether through stimulation of cell proliferation or apoptosis, mediated by cytokines and/or peptides — are closely linked to cell viability. In this context, Saint Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology has developed a method to extract polypeptide complexes from various organs and tissues of young cattle. These complexes contain tetra-, tri-, and dipeptides, which, despite being minor components of the complexes, exhibit high biological activity. Based on these findings, novel therapeutic agents may be developed for the treatment and prevention of common geriatric syndromes, such as senile asthenia syndrome, as well as for addressing age-related pathologies with a focus on tissue specificity. The aim of this study was to evaluate the effects of different combinations of L-amino acids and dipeptides on cell viability in organotypic nervous and immune tissue cultures in rats of different ages.

**Keywords:** amino acids, dipeptides, viability, organotypic culture, nervous system, immune system

## Введение

Процесс выделения и определения биологической активности как самих пептидов, так и входящих в их состав аминокислот является чрезвычайно трудоемким, требует оценки активности многих сотен образцов, что практически сложно осуществимо в течение короткого периода времени. Определение активности необходимо, так как в последние годы научные данные позволяют предполагать, что и аминокислоты, и низкомолекулярные пептиды способствуют жизнеспособности после стресса. Однако механизмы их действия не изучены. Так, β-аланин может приводить к повышению рабо-

тоспособности и улучшению здоровья (Fedoreyeva et al. 2011), хотя аналогичным действием обладает и дипептид карнозин (Calabrese et al. 2020), в составе которого одна из двух аминокислот — β-аланин. Также установлено, что аминокислота метионин опосредует эпигенетическую модуляцию экспрессии и способствует резистентности к социальному стрессу (Bisset, Howlen 2022). Дипептиды активно изучают в качестве протекторов ишемии головного мозга (Vasconcelos et al. 2015), а также для улучшения когнитивных (Masuoka et al. 2021) и физических (Ostfeld, Hoffman 2023) возможностей человека. Однако в ряде публикаций для профилактики старческой астении и увеличения

продолжительности жизни рекомендуют диеты с ограничением потребления комплексов (Bilen et al. 2020) или отдельных групп аминокислот (например, аминокислот с разветвленной цепью (Richardson et al. 2021)). Установлено согласованное действие коротких пептидов и составляющих их аминокислот в качестве эпигенетических модуляторов (Vanyushin, Khavinson 2016). Однако информации о влиянии дипептидов на процессы старения и снижения жизнеспособности крайне недостаточно (Anisimov, Khavinson 2010).

В связи с этим, важной остается задача изучения влияния синтетических пептидов на процессы старения и возрастной жизнеспособности, что требует быстрого получения биологически активных пептидов с различными свойствами, но без использования дорогостоящего сырья и длительных методов очистки. В Санкт-Петербургском Институте биорегуляции и геронтологии для их получения был применен новый методический подход (Журкович и др. 2020). На основе анализа аминокислотного состава экстрагированных природных пептидных комплексов, а также с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) были сконструированы и синтезированы короткие пептиды (Чалисова и др. 2011). После аминокислотного анализа комплекса полипептидных фракций какой-либо ткани млекопитающих отбирали аминокислоты, присутствующие в соответствующих препаратах в наибольшем количестве. При конструировании первичной структуры пептида учитывали данные расчетов энергетически выгодных конформаций для ионизированной молекулы. Такой подход позволил разработать технологию получения пептидных регуляторов функциональной активности различных тканей. Способность влиять на скорость основных клеточных процессов — пролиферацию и апоптоз, и, как следствие, вызывать изменение количества клеток, по сравнению с контролем, является одним из общих свойств пептидов млекопитающих, а также 20 кодируемых аминокислот (Хавинсон и др. 2015). Пептиды участвуют в регуляции физиологических процессов во всех тканях и органах на разных уровнях, от отдельных клеточных функций до сложного функционирования целостного организма, включая поведение (Zalomaeva et al. 2020). Известно, что процессы регуляции жизнедеятельности претерпевают изменения с возрастом. В этой связи изучение влияния полипептидных комплексов (ППК) на ткани организма в раз-

личные возрастные периоды крайне востребовано.

Целью настоящей работы было исследование эффекта различных комбинаций L-аминокислот и дипептидов на жизнеспособность клеток в органотипической культуре ткани нервной и иммунной систем у крыс разного возраста. В задачи исследования входил сравнительный анализ пролиферативной активности тканей коры и подкорковых структур головного мозга, а также селезенки молодых и старых крыс при сочетанном действии аминокислот и дипептидов.

## Материалы и методы

Для решения поставленных задач в работе использовали метод органотипического культивирования тканей коры, подкорковых структур и селезенки молодых (5-месячных) и старых (18-месячных) крыс линии Wistar 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; 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.

В экспериментах использовано 450 эксплантатов коры головного мозга, 400 эксплантатов подкорковых структур головного мозга (нервная система) и 350 эксплантатов ткани селезенки (иммунная система). К каждой ткани добавляли дипептиды, синтезированные на основе ППК соответствующих тканей.

Питательная среда с pH = 7,2 содержала 35% раствора Хенкса, 35% среды Игла, 25% фетальной бычьей сыворотки с добавлением глюкозы (0,6%), инсулина (0,5 ед/мл) и гентамицина (100 ед/мл). Отпрепарированные в стерильных условиях фрагменты тканей крыс разделяли на более мелкие части величиной около 1 мм, которые помещали в чашки Петри. L-аминокислоты (Sigma, США) вводили в культуральную среду в концентрациях 0,05 нг/мл. В чашки Петри с экспериментальными эксплантатами добавляли 1 мл питательной среды с аминокислотами исследуемой концентрации. Чашки Петри помещали в термостат при температуре 36,8 °С и через трое суток просматривали под фазово-контрастным микроскопом. При прижизненном

наблюдении с помощью микроскопа уже через 24 часа культивирования в эксплантатах тканей можно было выделить две зоны: более плотную — центральную, а также периферическую в виде ореола вокруг эксплантата из пролиферирующих и мигрирующих клеток.

Для количественной оценки влияния исследуемых препаратов использовали морфометрический метод и пакет программ PhotoM 1.2. Индекс площади (ИП) рассчитывали 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  $3,5 \times 10$  равнялась 150 мкм. Значения ИП выражали в процентах по сравнению со значениями ИП контрольных эксплантатов, которые принимали за 100%. Достоверность различий ИП контрольных и экспериментальных образцов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента ( $p < 0,05$ ). Статистическую обработку производили с помощью пакета программ Microsoft Excel. Для проверки нормальности распределения применяли критерий Шапиро–Уилка.

### Результаты исследования

Стимулирующее влияние на ИП эксплантатов коры головного мозга молодых крыс до  $+ 41 \pm 2\%$  ( $p < 0,05$ ) оказывал дипептид Asp-Ser, что со-

гласуется с ранее полученными данными (Чалисова и др. 2023). При сочетании со стимулирующей до  $+ 25 \pm 5\%$  аминокислотой лейцином ИП увеличивался до  $+ 55 \pm 8\%$ , т. е. на 14%. В эксплантатах коры головного мозга старых крыс это сочетание дипептида с аминокислотой увеличивало ИП на 19% (табл. 1).

Стимулирующее влияние на ИП эксплантатов подкорковых структур головного мозга молодых крыс до  $+ 27 \pm 2\%$  ( $p < 0,05$ ) оказывал дипептид Glu-Asp, но при сочетании со стимулирующей до  $+ 23 \pm 5\%$  аминокислотой триптофаном ИП увеличивался до  $+ 47 \pm 4\%$ , т. е. на 20%. В эксплантатах подкорковых структур головного мозга старых крыс сочетание дипептида Glu-Asp с триптофаном увеличивало ИП на 28% (табл. 2).

Стимулирующее влияние на ИП эксплантатов селезенки молодых крыс до  $+ 42 \pm 9\%$  ( $p < 0,05$ ) оказывал дипептид Asp-Trp, но при сочетании со стимулирующей до  $+ 36 \pm 5\%$  аминокислотой аспарагином ИП увеличивался до  $+ 47 \pm 4\%$ , т. е. на 13%. В эксплантатах селезенки старых крыс сочетание дипептида Asp-Trp с аспарагином увеличивало ИП на 28% (табл. 3).

В целом ИП эксплантатов тканей молодых крыс был несколько выше, чем ИП эксплантатов тканей старых крыс (табл. 1–3). Однако статистически достоверных различий не выявлено, что позволяет говорить о стимулирующем влиянии исследуемых веществ на клеточную пролиферацию независимо от возраста.

Табл. 1. Влияние дипептида Asp-Ser и его сочетания с аминокислотой Leu на ИП (%) эксплантатов коры головного мозга крыс

Пептид / аминокислота	Кора головного мозга	
	Индекс площади (ИП, %)	
	Молодые крысы	Старые крысы
Дипептид Asp-Ser	$+ 41 \pm 2^*$	$+ 32 \pm 7^*$
Аминокислота Leu	$+ 25 \pm 5^*$	$+ 20 \pm 2^*$
Дипептид Asp-Ser + аминокислота Leu	$+ 55 \pm 8^*$	$+ 51 \pm 7^*$

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

Table 1. Effect of Asp-Ser dipeptide and its combination with Leu amino acid on the AI (%) of rat cortical explants

Peptide / amino acid	Brain cortex	
	Area index (AI, %)	
	Young rats	Old rats
Asp-Ser dipeptide	$+ 41 \pm 2^*$	$+ 32 \pm 7^*$
Leu amino acid	$+ 25 \pm 5^*$	$+ 20 \pm 2^*$
Asp-Ser dipeptide + Leu amino acid	$+ 55 \pm 8^*$	$+ 51 \pm 7^*$

Note: \* — differences compared to the area index of the control group ( $p < 0.05$ ).

Табл. 2. Влияние дипептида Glu-Asp и его сочетания с аминокислотой Trp на ИП (%) эксплантатов подкорковых структур головного мозга крыс

Пептид / аминокислота	Подкорковые структуры головного мозга	
	Индекс площади (ИП, %)	
	Молодые крысы	Старые крысы
Дипептид Glu-Asp	+ 27 ± 2*	+ 25 ± 7*
Аминокислота Trp	+ 23 ± 5*	+ 18 ± 2*
Дипептид Glu-Asp + аминокислота Trp	+ 47 ± 4*	+ 53 ± 7*

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

Table 2. Effect of Glu-Asp dipeptide and its combination with Trp amino acid on the AI (%) of subcortical structure explants in rats

Peptide / amino acid	Subcortical brain structures	
	Area index (AI, %)	
	Young rats	Old rats
Glu-Asp dipeptide	+ 27 ± 2*	+ 25 ± 7*
Trp amino acid	+ 23 ± 5*	+ 18 ± 2*
Glu-Asp dipeptide + Trp amino acid	+ 47 ± 4*	+ 53 ± 7*

Note: \* — differences compared to the area index of the control group (p < 0.05).

Табл. 3. Влияние дипептида Asp-Trp и его сочетания с аминокислотой Asn на ИП (%) эксплантатов селезенки крыс

Пептид / аминокислота	Селезенка	
	Индекс площади (ИП, %)	
	Молодые крысы	Старые крысы
Дипептид Asp-Trp	+ 42 ± 9*	+ 23 ± 7*
Аминокислота Asn	+ 36 ± 5*	+ 20 ± 2*
Дипептид Asp-Trp + аминокислота Asn	+ 55 ± 8*	+ 45 ± 7*

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

Table 3. Effect of Asp-Trp dipeptide and its combination with Asn amino acid on the AI (%) of spleen explants in rats

Peptide / amino acid	Spleen	
	Area index (AI, %)	
	Young rats	Old rats
Asp-Trp dipeptide	+ 42 ± 9*	+ 23 ± 7*
Asn amino acid	+ 36 ± 5*	+ 20 ± 2*
Asp-Trp dipeptide + Asn amino acid	+ 55 ± 8*	+ 45 ± 7*

Note: \* — differences compared to the area index of the control group (p < 0.05).

### Обсуждение результатов

Исследование механизмов регулирования многоклеточных систем в тканях организма с помощью пептидов и аминокислот, их влияния на процессы старения является актуальной за-

дачей современной молекулярной биологии и медицины (Gao et al. 2021). Прогресс клинической медицины во многом зависит от исследований, проводимых на уровне биологически активных молекул. В связи с увеличением средней продолжительности жизни и доли пожилых

людей в общей численности населения, особое внимание специалисты в области физиологии, биохимии и медицины уделяют исследованию закономерностей развития возрастной патологии и разработке новых геропротекторных препаратов. Идет постоянный поиск биологически активных веществ, которые позволят направленно корректировать структурные изменения и функциональную активность клеток, снижающиеся при возрастной патологии. При старении организма происходит замедление регенерации, связанное с нарушениями процессов клеточной пролиферации. Поэтому восстановление органов и тканей организма на клеточном уровне при их геронтологической дисфункции является актуальной задачей. Регуляторные пептиды, влияющие на процессы клеточного роста и развития, широко распространены в живых организмах и выделяются различными клетками и тканями как эндокринные и аутокринные носители информации о локальном состоянии функций органа или ткани. Кроме того, они образуются в результате ограниченного протеолиза высокомолекулярных белков, находящихся в гуморальной среде. Эти низкомолекулярные олигопептиды (до 10 аминокислотных остатков) обладают широким спектром биологического действия и координируют выполнение биологических функций различными органами и тканями. Одна из функций биорегуляторных пептидов — регуляторное действие на репаративные процессы в тканях организма за счет стимуляции или торможения клеточной пролиферации. Пептиды в свою очередь гидролизуются до аминокислот, также обладающих регуляторными свойствами в отношении клеточной пролиферации (Рыжак и др. 2015).

Необходимо учитывать, что именно состав аминокислот определяет свойства белковых молекул (Aftabuddin, Kundu 2007). В предыдущих работах при исследовании влияния кодируемых аминокислот в органотипической культуре тканей крыс (Чалисова и др. 2021) было показано, что лейцин и аспарагин оказывают стимулирующее влияние на клеточную пролиферацию селезенки, а лейцин — и на пролиферацию коры головного мозга. Большая восприимчивость ткани селезенки к действию различных аминокислот может быть связана с ее высоким регенерационным потенциалом. Ранее выявлено наибольшее усиление пролиферации в селезенке по сравнению с тканями экто- и энтодермального генеза как при действии внешних стрессорных факторов, так и биорегуляторных пептидов (Ivanova et al. 2018; Zalomaeva et al. 2020).

Полученные результаты согласуются с литературными данными, свидетельствующими, что лейцин стимулирует пролиферацию клеток. Известно, что аминокислоты с разветвленной цепью, особенно лейцин, оказывают регуляторное влияние на белковый и углеводный обмен, биогенез рибосом и экспрессию генов. В фибробластах, обработанных лейцином, выявлено увеличение активности щелочной фосфатазы, синтеза белка и пролиферации (Gonçalves, Gomes-Marcondes 2010). Согласно недавним исследованиям, лейцин регулирует белковый метаболизм в эпителиальных клетках молочной железы, способствуя синтезу белка посредством стимуляции сигнального пути mTOR и ингибирования убиквитин-протеасомного пути (Rezaei, Wu 2022). Это подтверждает более ранние данные о снижении активности протеасом в слизистой двенадцатиперстной кишки при энтеральном введении лейцина и усилении пролиферации клеток по пути PI3K/Akt/GSK-3 $\alpha$ / $\beta$ -катенин (Coëffier et al. 2011), а также о том, что лейцин может усиливать активацию mTORC1, способствуя пролиферации и дифференцировке первичных сателлитных клеток крыс (Dai et al. 2015). Синтез лейцина увеличивается в фазе G1 клеточного цикла, достигая пика во время репликации ДНК, и связан с активацией TOR на ранних стадиях клеточного цикла у дрожжей. Таким образом, то, как клетки координируют свой метаболизм с делением, определяет скорость их пролиферации (Blank et al. 2023).

Пролиферотропное действие показано и для аспарагина. Дефицит аспарагина снижает пролиферацию клеток и подавляет рост опухоли в клетках рака желудка (Yu et al. 2016), а также в клетках мышечной саркомы аспарагинсинтетазы (Nishikawa et al. 2022). L-глутамин и L-аспарагин стимулируют пролиферацию энтероцитов тощей кишки свиньи (Kandil et al. 1995). В отсутствие глутамина аспарагин обеспечивает выживание и пролиферацию клеток, а также поддерживает экспрессию c-Myc (Chiodi et al. 2021).

В этой связи крайне интересно взаимодействие лейцина и триптофана. Избыток лейцина в пище влияет на метаболизм триптофана, приводя к пеллаграгенному эффекту (Bender 1983). Ранее нами показано угнетающее действие триптофана на клеточную пролиферацию коры головного мозга и селезенки (Чалисова и др. 2021; Chalisova et al. 2019). Выявленное в настоящей работе усиление пролиферотропного действия на подкорковые структуры дипептида Glu-Asp при добавлении триптофана, очевидно, связано с тканеспецифичным и сочетанным

действием ряда аминокислот на клеточную пролиферацию. Также при анализе пролиферативной активности тканей подкорковых структур головного мозга крыс разного возраста обнаружено снижение на 6% эффекта сочетанного воздействия дипептида Glu-Asp и триптофана у молодых крыс по сравнению с таковым у старых. Это снижение не имело статистической значимости, однако воздействия комбинаций дипептидов и аминокислот были более выражены в культурах тканей коры головного мозга и селезенки молодых крыс. Этот факт позволяет выдвинуть предположение о тканеспецифичном характере пролиферативной активности подкорковых структур, механизмы которого на данный момент неясны и требуют пристального исследования.

### Заключение

Выявление с использованием метода органотипического культивирования тканей пролиферотропного влияния сочетаний кодируемых аминокислот с дипептидами показало, что сочетанное действие дипептидов и аминокислот увеличивало стимулирующее влияние на ИП эксплантатов селезенки, коры и подкорковых структур головного мозга как молодых крыс, так и старых крыс, по сравнению с отдельным действием компонентов.

Эти данные создают базу для разработки и быстрого тестирования препаратов, содержащих аминокислоты и дипептиды и предназначенных для лечения пациентов с патологическими процессами в органах нервной и иммунной систем, в том числе при гериатрической патологии. Установленное при исследовании сочетаний стимулирующих клеточную пролиферацию аминокислот и дипептидов увеличение ИП эксплантатов нервной ткани старых крыс на 19% и 28%, а в культуре селезенки старых крыс — на 13%, создает базу для целенаправленной разработки геропротекторных препаратов при патологии органов нервной и иммунной систем.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

### Литература

- Журкович, И. К., Ковров, Н. Г., Рыжак, Г. А. и др. (2020) Идентификация коротких пептидов в составе полипептидных комплексов, выделенных из органов животных. *Успехи современной биологии*, т. 140, № 2, с. 140–148. <https://doi.org/10.31857/S004213242002012X>
- Рыжак, Г. А., Чалисова, Н. И., Линькова, Н. С. и др. (2015) Влияние полипептидов на регенерацию клеток в культуре разных тканей молодых и старых крыс. *Успехи геронтологии*, т. 28, № 1, с. 97–103.

### 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 for biomedical research involving animals. The experimental protocol was approved by the Commission on Humane Treatment of Animals of the Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences (No. 12/12, 12 December 2022).

### Вклад авторов

- а. Чалисова Наталья Иосифовна — планирование эксперимента, написание статьи;
- б. Рыжак Галина Анатольевна — дизайн эксперимента, обработка данных, обсуждение результатов;
- в. Никитина Екатерина Александровна — планирование эксперимента, обсуждение результатов, написание статьи;
- г. Рубинский Артемий Владимирович — постановка эксперимента, математическая обработка данных.

### Author Contributions

- a. Natalia I. Chalisova — experimental planning, manuscript writing;
- b. Galina A. Ryzhak — experimental design, data processing, discussion of results;
- c. Ekaterina A. Nikitina — experimental planning, discussion of results, manuscript writing;
- d. Artemiy V. Rubinskiy — experimentation, statistical data analysis.

- 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*, № 2-3, с. 497–503.
- Чалисова, Н. И., Иванова, П. Н., Егорова, 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>
- 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, M., 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>
- Anisimov, V. N., Khavinson, V. Kh. (2010) Peptide bioregulation of aging: Results and prospects. *Biogerontology*, vol. 11, no. 2, pp. 139–149. <https://doi.org/10.1007/s10522-009-9249-8>
- Bender, D. A. (1983) Effects of a dietary excess of leucine on the metabolism of tryptophan in the rat: A mechanism for the pellagrigenic action of leucine. *British Journal of Nutrition*, vol. 50, no. 1, pp. 25–32. <https://doi.org/10.1079/bjn19830068>
- Bilen, M., Ibrahim, P., Barmo, N. et al. (2020) Methionine mediates resilience to chronic social defeat stress by epigenetic regulation of NMDA receptor subunit expression. *Psychopharmacology*, vol. 237, no. 10, pp. 3007–3020. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05588-8>
- Bisset, E. S., Howlett, S. E. (2022) The use of dietary supplements and amino acid restriction interventions to reduce frailty in pre-clinical models. *Nutrients*, vol. 14, no. 14, article 2806. <https://doi.org/10.3390/nu14142806>
- Blank, H. M., Reuse, C., Schmidt-Hohagen, K. et al. (2023) Branched-chain amino acid synthesis is coupled to TOR activation early in the cell cycle in yeast. *EMBO Reports*, vol. 24, no. 9, article e57372. <https://doi.org/10.15252/embr.202357372>
- Calabrese, V., Scuto, M., Salinaro, A. T. et al. (2020) Hydrogen sulfide and carnosine: Modulation of oxidative stress and inflammation in kidney and brain axis. *Antioxidants*, vol. 9, no. 12, article 1303. <https://doi.org/10.3390/antiox9121303>
- 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>
- Chiodi, I., Perini, C., Berardi D., Mondello, C. (2021) Asparagine sustains cellular proliferation and c-Myc expression in glutamine-starved cancer cells. *Oncology Reports*, vol. 45, no. 6, article 96. <https://doi.org/10.3892/or.2021.8047>
- Coëffier, M., Claeysens, S., Bensifi, M. et al. (2011) Influence of leucine on protein metabolism, phosphokinase expression, and cell proliferation in human duodenum. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 93, no. 6, pp. 1255–1262. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.013649>
- Dai, J.-M., Yu, M.-X., Shen, Zh.-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>
- 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 deoxyribooligonucleotides and DNA. *Biochemistry (Moscow)*, vol. 76, no. 11, pp. 1210–1219. <https://doi.org/10.1134/S0006297911110022>
- Gao, C., Cao, N., Wang, Y. (2021) The coming of age for branched-chain amino acids. *Journal of Cardiovascular Aging*, vol. 1, no. 2. <https://doi.org/10.20517/jca.2021.02>
- Gonçalves, E. M., Gomes-Marcondes, M. C. C. (2010) Leucine affects the fibroblastic Vero cells stimulating the cell proliferation and modulating the proteolysis process. *Amino Acids*, vol. 38, no. 1, pp. 145–153. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0222-7>
- Ivanova, P. N., Surma, S. V., Shchegolev, B. F. et al. (2018) The effects of weak static magnetic field on the development of organotypic tissue culture in rats. *Doklady Biological Sciences*, vol. 481, no. 4, pp. 132–134. <https://doi.org/10.1134/S0012496618040075>
- Kandil, H. M., Argenzio, R. A., Chen, W. et al. (1995) L-glutamine and L-asparagine stimulate ODC activity and proliferation in a porcine jejunal enterocyte line. *American Journal of Physiology*, vol. 269, no. 1, pp. G591–G599. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1995.269.4.G591>
- Masuoka, N., Lei, C., Li, H., Hisatsune, T. (2021) Influence of imidazole-dipeptides on cognitive status and preservation in elders: A narrative review. *Nutrients*, vol. 13, no. 2, article 397. <https://doi.org/10.3390/nu13020397>
- Nishikawa, G., Kawada, K., Hanada, K. et al. (2022) Targeting asparagine synthetase in tumorigenicity using patient-derived tumor-initiating cells. *Cells*, vol. 11, no. 20, article 3273. <https://doi.org/10.3390/cells11203273>
- Ostfeld, I., Hoffman, J. R. (2023) The effect of  $\beta$ -alanine supplementation on performance, cognitive function and resiliency in soldiers. *Nutrients*, vol. 15, no. 4, article 1039. <https://doi.org/10.3390/nu15041039>



- Rezaei, R., Wu, G. (2022) Branched-chain amino acids regulate intracellular protein turnover in porcine mammary epithelial cells. *Amino Acids*, vol. 54, no. 11, pp. 1491–1504. <https://doi.org/10.1007/s00726-022-03203-y>
- Richardson, N. E., Konon, E. N., Schuster, H. S. et al. (2021) Lifelong restriction of dietary branched-chain amino acids has sex-specific benefits for frailty and life span in mice. *Nature Aging*, vol. 1, no. 1, pp. 73–86. <https://doi.org/10.1038/s43587-020-00006-2>
- Vanyushin, B. F., Khavinson, V. Kh. (2016) Short biologically active peptides as epigenetic modulators of gene activity. In: W. Doerfler, P. Böhm (eds.). *Epigenetics — a different way of looking at genetics*. Cham: Springer Publ., pp. 69–90. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-27186-6\\_5](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-27186-6_5)
- Vasconcelos, P. R., Guimarães, A. B., Campelo, M W. et al. (2015) Preconditioning with L-alanyl-glutamine upon cerebral edema and hippocampus red neurons counting in rats subjected to brain ischemia/reperfusion injury. *Acta Cirúrgica Brasileira*, vol. 30, no. 3, pp. 199–203. <https://doi.org/10.1590/S0102-865020150030000006>
- Yu, Q., Wang, X., Wang, L. et al. (2016) Knockdown of asparagine synthetase (ASNS) suppresses cell proliferation and inhibits tumor growth in gastric cancer cells. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol. 51, no. 10, pp. 1220–1226. <https://doi.org/10.1080/00365521.2016.1190399>
- 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, M., 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)
- Anisimov, V. N., Khavinson, V. Kh. (2010) Peptide bioregulation of aging: Results and prospects. *Biogerontology*, vol. 11, no. 2, pp. 139–149. <https://doi.org/10.1007/s10522-009-9249-8> (In English)
- Bender, D. A. (1983) Effects of a dietary excess of leucine on the metabolism of tryptophan in the rat: A mechanism for the pellagragenic action of leucine. *British Journal of Nutrition*, vol. 50, no. 1, pp. 25–32. <https://doi.org/10.1079/bjn19830068> (In English)
- Bilen, M., Ibrahim, P., Barmo, N. et al. (2020) Methionine mediates resilience to chronic social defeat stress by epigenetic regulation of NMDA receptor subunit expression. *Psychopharmacology*, vol. 237, no. 10, pp. 3007–3020. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05588-8> (In English)
- Bisset, E. S., Howlett, S. E. (2022) The use of dietary supplements and amino acid restriction interventions to reduce frailty in pre-clinical models. *Nutrients*, vol. 14, no. 14, article 2806. <https://doi.org/10.3390/nu14142806> (In English)
- Blank, H. M., Reuse, C., Schmidt-Hohagen, K. et al. (2023) Branched-chain amino acid synthesis is coupled to TOR activation early in the cell cycle in yeast. *EMBO Reports*, vol. 24, no. 9, article e57372. <https://doi.org/10.15252/embr.202357372> (In English)
- Calabrese, V., Scuto, M., Salinaro, A. T. et al. (2020) Hydrogen sulfide and carnosine: Modulation of oxidative stress and inflammation in kidney and brain axis. *Antioxidants*, vol. 9, no. 12, article 1303. <https://doi.org/10.3390/antiox9121303> (In English)
- Chalisova, N. I., Ivanova, P. N., Egozova, E. S., Nikitina, E. A. (2023) Stimuliruyushee vliyaniye korotkikh peptidov na kletochnyuyu proliferatsiyu v organotipicheskoy kul'ture tkanej [The stimulating effect of short peptides on cellular proliferation in organotypic tissue culture]. *Integrativnaya fiziologiya — Integrative Physiology*, vol. 4, no. 2, pp. 225–234. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-2-225-234> (In Russian)
- 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) Regul'yatornoe vliyaniye kodiruemykh aminokislot na 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*, vol. 24, no. 2, pp. 189–197. (In Russian)
- Chalisova, N. I., Nikitina, E. A., Alexandrova, M. L., Zolotoverkhaja, E. A. (2021) Vliyaniye kodiruemykh L-aminokislot na organotipicheskuyu kul'turu tkanej razlichnogo geneza [The effect of coded L-amino acids on the organotypic culture of tissues of different]. *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)
- Chiodi, I., Perini, C., Berardi, D., Mondello, C. (2021) Asparagine sustains cellular proliferation and c-Myc expression in glutamine-starved cancer cells. *Oncology Reports*, vol. 45, no. 6, article 96. <https://doi.org/10.3892/or.2021.8047> (In English)
- Coëffier, M., Claeysens, S., Bensifi, M. et al. (2011) Influence of leucine on protein metabolism, phosphokinase expression, and cell proliferation in human duodenum. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 93, no. 6, pp. 1255–1262. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.013649> (In English)

- Dai, J.-M., Yu, M.-X., Shen, Zh.-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)
- 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 (Moscow)*, vol. 76, no. 11, pp. 1210–1219. <https://doi.org/10.1134/S0006297911110022> (In English)
- Gao, C., Cao, N., Wang, Y. (2021) The coming of age for branched-chain amino acids. *Journal of Cardiovascular Aging*, vol. 1, no. 2. <https://doi.org/10.20517/jca.2021.02> (In English)
- Gonçalves, E. M., Gomes-Marcondes, M. C. C. (2010) Leucine affects the fibroblastic Vero cells stimulating the cell proliferation and modulating the proteolysis process. *Amino Acids*, vol. 38, no. 1, pp. 145–153. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0222-7> (In English)
- Ivanova, P. N., Surma, S. V., Shchegolev, B. F. et al. (2018) The effects of weak static magnetic field on the development of organotypic tissue culture in rats. *Doklady Biological Sciences*, vol. 481, no. 4, pp. 132–134. <https://doi.org/10.1134/S0012496618040075> (In English)
- Kandil, H. M., Argenzio, R. A., Chen, W. et al. (1995) L-glutamine and L-asparagine stimulate ODC activity and proliferation in a porcine jejunal enterocyte line. *American Journal of Physiology*, vol. 269, no. 1, pp. G591–G599. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1995.269.4.G591> (In English)
- Khavinson, V. K., Chalisova, N. I., Linkova, N. S. et al. (2015) Zavisimost' tkanespetsificheskogo dejstviya peptidov ot kolichestva aminokislota, vkhodyashchikh v ikh sostav [The dependence of tissue-specific peptides activity on the number of amino acids in the peptides]. *Fundamental'nyye issledovaniya — Fundamental research*, no. 2-3, pp. 497–503. (In Russian)
- Masuoka, N., Lei, C., Li, H., Hisatsune, T. (2021) Influence of imidazole-dipeptides on cognitive status and preservation in elders: A narrative review. *Nutrients*, vol. 13, no. 2, article 397. <https://doi.org/10.3390/nu13020397> (In English)
- Nishikawa G., Kawada, K., Hanada, K. et al. (2022) Targeting asparagine synthetase in tumorigenicity using patient-derived tumor-initiating cells. *Cells*, vol. 11, no. 20, art. 3273. <https://doi.org/10.3390/cells11203273> (In English)
- Ostfeld, I., Hoffman, J. R. (2023) The effect of  $\beta$ -alanine supplementation on performance, cognitive function and resiliency in soldiers. *Nutrients*, vol. 15, no. 4, article 1039. <https://doi.org/10.3390/nu15041039> (In English)
- Rezaei, R., Wu, G. (2022) Branched-chain amino acids regulate intracellular protein turnover in porcine mammary epithelial cells. *Amino Acids*, vol. 54, no. 11, pp. 1491–1504. <https://doi.org/10.1007/s00726-022-03203-y> (In English)
- Richardson, N. E., Konon, E. N., Schuster, H. S. et al. (2021) Lifelong restriction of dietary branched-chain amino acids has sex-specific benefits for frailty and lifespan in mice. *Nature Aging*, vol. 1, no. 1, pp. 73–86. <https://doi.org/10.1038/s43587-020-00006-2> (In English)
- Ryzhak, G. A., Chalisova, N. I., Linkova, N. S. et al. (2015) Vliyanie polipeptidov na regeneratsiyu kletok v culture raznykh tkaney molodykh i starykh kryss [Polypeptides influence on tissue cell cultures regeneration of various rats]. *Uspekhi gerontologii*, vol. 28, no. 1, pp. 97–103. (In Russian)
- Vanyushin, B. F., Khavinson, V. Kh. (2016) Short biologically active peptides as epigenetic modulators of gene activity. In: W. Doerfler, P. Böhm (eds.). *Epigenetics — a different way of looking at genetics*. Cham: Springer Publ., pp. 69–90. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-27186-6\\_5](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-27186-6_5) (In English)
- Vasconcelos, P. R., Guimarães, A. B., Campelo, M. W. et al. (2015) Preconditioning with L-alanyl-glutamine upon cerebral edema and hippocampus red neurons counting in rats subjected to brain ischemia/reperfusion injury. *Acta Cirúrgica Brasileira*, vol. 30, no. 3, pp. 199–203. <https://doi.org/10.1590/S0102-865020150030000006> (In English)
- Yu, Q., Wang, X., Wang, L. et al. (2016) Knockdown of asparagine synthetase (ASNS) suppresses cell proliferation and inhibits tumor growth in gastric cancer cells. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol. 51, no. 10, pp. 1220–1226. <https://doi.org/10.1080/00365521.2016.1190399> (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)
- Zhurkovich, I. K., Kovrov, N. G., Ryzhak, G. A. et al. (2020) Identifikatsiya korotkikh peptidov v sostave polipeptidnykh kompleksov, vydelennykh iz organov zhivotnykh [Identification of short peptides as part of polypeptide complexes isolated from animal organs]. *Uspeki sovremennoy biologii*, vol. 140, no. 2, pp. 140–148. <https://doi.org/10.31857/S004213242002012X> (In Russian)