

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «КУРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*



Ворвуть Антон Олегович

**Динамика состояния функций нервной системы, микробиоты и  
морфофункциональных показателей толстой кишки  
при применении N-концевого аналога АКТГ в условиях хронического  
иммобилизационного стресса**

3.3.3. Патологическая физиология

1.5.11. Микробиология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор

Бобынцев Игорь Иванович

доктор биологических наук, профессор

Медведева Ольга Анатольевна

Курск – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
1.1. Структурно-функциональные механизмы взаимодействия в системе «микробиота – кишечник – мозг» .....	13
1.2. Механизмы повышения проницаемости кишечной стенки при стрессе.....	21
1.3. Биологические эффекты пептидов семейства меланокортинов и их синтетических аналогов.....	29
1.4. Пептид АКТГ <sub>6-9</sub> -ППП: биодоступность, механизмы деградации и биологических эффектов .....	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	47
2.1. Экспериментальные животные.....	47
2.2. Препарат .....	48
2.3. Хронический иммобилизационный стресс .....	49
2.4. Исследование функций нервной системы .....	49
2.4.1. Методика изучения уровня тревожности в приподнятом крестообразном лабиринте.....	49
2.4.2. Методика изучения ориентировочно-исследовательской и локомоторной активностей, эмоциональности и груминга в тесте открытого поля .....	50
2.4.3. Методика изучения уровня депрессивного поведения в тесте принудительного плавания.....	52
2.5. Выведение животных и забор биологического материала .....	53
2.6. Исследование пристеночной микробиоты.....	54
2.7. Морфологическое исследование ободочной кишки .....	55
2.8. Определение уровней цитокинов, маркеров свободно-радикального окисления и кортикостерона в сыворотке крови.....	56
2.9. Статистическая обработка данных.....	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	59

3.1. Состояние функций нервной системы крыс при применении АКТГ <sub>6-9</sub> -ПГП в условиях хронического иммобилизационного стресса.....	59
3.2. Состояние микробиоты толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса и применении АКТГ <sub>6-9</sub> -ПГП.....	65
3.3. Морфофункциональное состояние стенки толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса и при применении АКТГ <sub>6-9</sub> -ПГП.....	70
3.4. Эффекты пептида АКТГ <sub>6-9</sub> -ПГП на уровни цитокинов, маркеров свободно-радикального окисления и кортикостерона в сыворотке крови .....	78
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	84
ВЫВОДЫ .....	99
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	103

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Изучение двунаправленной связи между кишечной микробиотой и мозгом, известной как «кишечно-мозговая ось» (КМО), является одним из актуальных направлений в биомедицинских исследованиях. Известно, что кишечная микробиота у людей обладает значительным нейроактивным потенциалом и способна оказывать существенное влияние на психическое здоровье [281]. При этом в настоящее время доказано наличие нескольких путей влияния кишечной микробиоты на центральную нервную систему (ЦНС): вегетативная нервная система, кишечная нервная система, иммунная система, энтероэндокринная сигнализация, выработка нейромедиаторов, аминокислот с разветвленной цепью, фрагментов желчи и короткоцепочечных жирных кислот, спинномозговые механизмы, гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система (ГГНС) [279]. Кроме того, нарушения в составе кишечной микробиоты могут быть связаны со значительным числом психических расстройств, например, депрессией, тревогой, шизофренией, болезнью Альцгеймера, болезнью Паркинсона и т.д. [279]. Данные факты обусловили появление термина «психобиом», который подчеркивает особое место кишечной микробиоты в функционировании ЦНС [225].

Известно, что различные виды стресса влияют как на функции ЦНС, так и на кишечную микробиоту [90, 119], нарушения состава которой, в свою очередь, коррелируют с эмоциональными и поведенческими проявлениями вызванных стрессом расстройств [74, 107, 201, 286].

Одним из перспективных направлений коррекции стрессиндуцированных изменений в организме является коррекция состояния регуляторных систем организма. С этой целью целесообразно использование регуляторных пептидов, которые обладают высокой биологической активностью, низкой токсичностью и аллергенностью [227]. К их числу относятся меланокортины, являющиеся одними

из наиболее биологически активных классов регуляторных пептидов. Открытые на данный момент 5 типов меланокортиновых рецепторов (MCRs) и их способность проходить через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и взаимодействовать со структурами ЦНС определяют широкий спектр эффектов меланокортинов и позволяют их рассматривать как потенциальную основу для создания новых лекарственных препаратов [82, 164, 193, 234]. В различных исследованиях показаны нейротрофический, анальгетический и ноотропный эффекты N-концевых аналогов АКТГ. Также показана активность данных молекул в условиях различного стрессорного воздействия [164, 171, 193].

### **Степень разработанности темы исследования**

Наиболее изученным из меланокортинов является синтетический аналог АКТГ<sub>4-10</sub> – Семакс (АКТГ<sub>4-7</sub>–Pro-Gly-Pro), который обладает анксиолитической и антидепрессантной активностью как в условиях стресса, так и вне его [117]. Также известно, что АКТГ<sub>4-7</sub>–Pro-Gly-Pro препятствует развитию нарушений состава микробиоты в условиях хронического иммобилизационного стресса [102]. При этом N-концевые фрагменты АКТГ не обладают гормональной активностью, что позволяет различать свойства исходной аминокислотной последовательности от эффектов глюкокортикоидов [185].

Одним из высокоактивных меланокортиновых пептидов является структурный и функциональный аналог АКТГ<sub>4-7</sub>–Pro-Gly-Pro – АКТГ<sub>6-9</sub>–Pro-Gly-Pro. Паттерн АКТГ<sub>6-9</sub> (His-Phe-Arg-Trp) – общий для всех природных меланокортинов и имеет минимальную последовательность, необходимую для связывания с каждым типом меланокортиновых рецепторов (MCR) (за исключением MC2R) и АКТГ<sub>6-9</sub> является фармакофором MCR [62, 171]. Присоединение Pro-Gly-Pro (ППП) к C-концу АКТГ<sub>6-9</sub> стабилизирует пептидную молекулу, повышает ее устойчивость к деградации эндопептидазами и увеличивает продолжительность биологических эффектов [71, 250]. При этом

также глипролины обладают своей физиологической активностью, которая может способствовать эффектам изучаемого пептида [26]. Известно, что АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП проникает через ГЭБ, взаимодействует со структурами мозга [235] и поэтому обладает потенциально широким спектром активности.

В настоящее время установлено, что АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП улучшает выработку имеющегося пищевого рефлекса, обладает анксиолитическим и антидепрессантным действием, улучшает закрепление условного рефлекса пассивного избегания и влияет на болевую чувствительность у крыс [63, 85, 94, 113, 192]. АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП облегчал тревожноподобное поведение у крыс с агрессивным и покорным поведением в условиях экспериментального социального стресса [111, 112]. При этом исследования влияния АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП на поведение животных, кишечную микробиоту и их взаимосвязь в условиях хронического стресса ранее не проводились.

С учетом актуальности поиска новых способов коррекции вызванных стрессом изменений в оси «кишечник-мозг» представляется целесообразным изучение возможности применения АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП для коррекции стрессиндуцированных нарушений функций нервной системы и состава микробиоты толстой кишки.

Диссертационное исследование (№ государственной регистрации АААА-А20-120122890098-4) выполнено по основному плану научно-исследовательской работы Курского государственного медицинского университета.

### **Цель и задачи исследования**

Цель – изучить динамику состояния функций нервной системы, состава микробиоты и морфофункциональных показателей толстой кишки в условиях применения АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП при хроническом иммобилизационном стрессе.

Задачи:

1. Изучить влияние пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП на состояние нервной системы

(уровень тревожности, депрессии и эмоциональное состояние) у крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса.

2. Определить изменение состава пристеночной микробиоты толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса при введении пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП.

3. Оценить динамику морфофункционального состояния толстой кишки крыс при применении пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП в условиях хронического иммобилизационного стресса.

4. Исследовать влияние пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП на изменение уровней в крови про- и противовоспалительных цитокинов, интенсивности процесса свободнорадикального окисления у крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса.

5. Выявить динамику концентрации кортикостерона в сыворотке крови крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса и применения пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП.

### **Научная новизна**

Впервые изучено влияние пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП на уровень тревожности, депрессии, эмоционального состояния у крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса.

Впервые установлено корригирующее действие пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП на состав пристеночной микробиоты у крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса.

Впервые исследованы эффекты пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП на морфофункциональное состояние ободочной кишки у крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса.

Впервые выполнена оценка уровней про- и противовоспалительных цитокинов, показателей свободно-радикального окисления и кортикостерона у

крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса и при применении пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В ходе данного исследования опытным путем были получены новые знания о биологической активности регуляторных пептидов семейства меланокортинов. Показано, что АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП препятствует развитию у экспериментальных животных индуцированного стрессом дисбиоза, повышению уровня тревожности и депрессии, способствует улучшению морфофункционального состояния стенки оболочкой кишки, снижению активности свободно-радикального окисления и концентрации кортикостерона.

На основании полученных в ходе исследования данных получен патент «Применение пептида His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro для профилактики дисбиоза при хроническом иммобилизационном стрессе» (патент на изобретение №2770583 от 23.08.2023 г.).

Результаты настоящей работы свидетельствуют о необходимости продолжения изучения эффектов меланокортиновых пептидов и их синтетических аналогов на функциональное состояние кишечно-мозговой оси и регуляторных систем с целью дальнейшего выяснения механизмов развития индуцированных стрессом сдвигов в организме и разработки патогенетически обоснованных методов их коррекции.

### **Методология и методы исследования**

Методология диссертационного исследования разработана в соответствии с поставленными целью и задачами исследования.

Исследование выполнено на 55 крысах-самках Вистар массой 280-300 г. Все



эксперименты были проведены в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г., и были одобрены этическим комитетом Курского государственного медицинского университета (протокол № 3 от 16 ноября 2020 г.).

В исследовании использовались: микробиологические методы (культуральный, масс-спектрометрия), гистологические методы (световая микроскопия, цифровая микрофотосъемка окрашенных срезов), этологические методы (тесты приподнятого крестообразного лабиринта, открытого поля, принудительного плавания), иммунологические методы (иммуноферментный анализ).

### **Личный вклад**

Личный вклад автора осуществлялся на всех этапах работы. Автор совместно с научными руководителями принимал участие в постановке цели и задач исследования, разработке дизайна и концепции исследования. Автор лично выполнял анализ данных литературы по теме исследования, работу с лабораторными животными, проводил сбор первичных данных и их последующую статистическую обработку. Автор совместно с научными руководителями осуществлял трактовку и интерпретацию полученных результатов, подготовку материалов для публикации.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Применение пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП снижает вызванные хроническим

иммобилизационным стрессом проявления депрессии и повышенные уровни тревожности и эмоциональности у крыс.

2. Использование пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП способствует коррекции индуцированных стрессом нарушений качественного и количественного состава мукозной микробиоты толстой кишки и морфометрических показателей ее стенки.

3. Пептид АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП ингибирует вызванное хроническим иммобилизационным стрессом повышение уровней провоспалительных цитокинов, кортикостерона и активности процессов свободнорадикального окисления.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Направление диссертационного исследования соответствует пунктам паспорта научной специальности 3.3.3. Патологическая физиология: п.2. «Изучение механизмов развития заболеваний, типовых патологических процессов и реакций организма на воздействие патогенных факторов, в том числе механизмов формирования патологических систем и нарушений информационного процесса, обуславливающих развитие заболеваний», п. 11. «Разработка новых путей этиотропной и патогенетической терапии с учетом взаимодействия лечебных мероприятий с защитно-приспособительными реакциями организма», а также пункту паспорта научной специальности 1.5.11. Микробиология: п. 13 «Симбиотические микробные сообщества, в том числе микробиота человека и животных».

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность представленных результатов, положений, выносимых на

защиту, и выводов обусловлена достаточных числом исследованных животных, полнотой и широтой литературно-библиографической справки, использовании современных микробиологических, гистологических, этологических, биохимических и иммунологических методов исследования, применении современных методов статистической обработки данных, полученных в ходе исследования.

Основные положения диссертации были представлены и обсуждены на: Международной научной конференции «Университетская наука: взгляд в будущее» (Курск, 2022); Международной конференции студентов и молодых ученых «Молодежная наука и современность» (Курск, 2022); Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы экспериментальной микробиологии: теория, методология, практика, инноватика» (Курск, 2022); XXIV Международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2022); VIII Региональной научно-практической конференции «Павловские чтения 2022» (Курск, 2022); XXX Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2023); XXIX Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2023» (Санкт-Петербург, 2023); 88-й Международной конференции студентов и молодых ученых «Молодежная наука и современность» (Курск, 2023).

Апробация материалов диссертации проведена на межкафедральном заседании кафедр патофизиологии, микробиологии, вирусологии, иммунологии, фармакологии, нормальной физиологии им. А.В. Завьялова, гистологии, эмбриологии, цитологии, биологической химии ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет Минздрава России (протокол №15 от 30.05.2023 г.).

### **Публикации по теме исследования**

По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, отражающие

результаты основные результаты диссертации: 4 статьи – в изданиях, включенных в международные базы данных Scopus, Web of Science, Chemical Abstracts, Springer; 1 статья – в издании, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/Перечень ВАК при Минобрнауки России, 1 обзорная статья, 6 публикаций в материалах конференций, 1 патент РФ на изобретение. В публикациях результаты проведенного исследования отражены в полном объеме.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста и включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы, составленный из 313 источников, из которых 70 отечественных и 243 зарубежных источников. Работа содержит 4 таблицы и 26 рисунков.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Структурно-функциональные механизмы взаимодействия в системе «микробиота – кишечник – мозг»

Одним из приоритетных направлений развития современной медико-биологической науки является изучение двунаправленных связей между кишечной микробиотой и мозгом, известной как «кишечно-мозговая ось» (КМО). В данном взаимодействии важную роль играют эфферентные и афферентные нервные пути [138]. Так, ЦНС регулирует секреторные и сенсорные функции, а также моторику желудочно-кишечного тракта [77], а микробиота может прямо или косвенно влиять на функцию афферентных сенсорных нейронов блуждающего нерва через синтез и продукцию нейротрансмиттеров и нейроактивных метаболитов [62, 72, 104]. Также микробиота кишечника оказывает влияние на воспалительные процессы в нервной системе за счет модуляции процессов активации клеток микроглии и эффектов на миелинизацию и нейрогенез [64, 128, 190]. Трансплантация фекалий между мышами с различным уровнем тревожности показала, что микробиота может даже влиять на поведение путем изменения нейрохимических процессов в головном мозге [99]. Кроме того, установлен нейроактивный потенциал кишечной микробиоты влиять на психическое здоровье людей [281]. Кроме того, нарушения в составе микробиоты кишечника могут быть связаны со значительным числом психических расстройств, например, депрессией, тревогой, шизофренией, болезнью Альцгеймера, болезнью Паркинсона и так далее [279]. Эти факты привели к появлению термина «психобиом», который подчеркивает важность кишечной микробиоты в функционировании ЦНС [225].

Эффективное функционирование оси обеспечивается за счет сочетания различных видов регуляции с участием вегетативной нервной системы кишечника, иммунных механизмов, энтероэндокринной сигнализации, продукции

нейротрансмиттеров, аминокислот с разветвленной цепью и короткоцепочечных жирных кислот, спинномозговых механизмов и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [279]. Наиболее важные регуляторные компоненты данной оси представлены ниже.

Известно, что кишечник иннервируется печеночной и чревной ветвями блуждающего нерва от проксимального отдела двенадцатиперстной кишки до сигмовидной кишки. Афферентные волокна вагуса образуют три различных типа соединений в кишечнике: внутриганглионарные ламинарные окончания и внутримышечные массивы (оба заканчиваются в мышечной стенке), а также концевые аксональные окончания в слизистой оболочке и недавно описанное соединение с энтероэндокринными клетками, называемых нейроподами, которые образуют синапсы с нейронами блуждающего нерва [57].

Установлено, что кишечная микрофлора изменяет эмоциональное состояние и поведенческие реакции макроорганизма путем воздействия на вагус, что подтверждается изменением экспрессии c-Fos в телах афферентных нейронов вагуса после перорального введения *Campylobacter jejuni* [86]. Введение *C. jejuni* повышало уровень тревожности без активации системного иммунного ответа [197]. Кроме того, у ваготомированных животных не наблюдалось положительного влияния пребиотика 2'-фукозиллактозы на ассоциативное обучение и долговременную потенциацию нейронов гиппокампа [112]. Введение *Lactobacterium rhamnosus* увеличивало скорость возбуждения брыжеечного нервного пучка, содержащего блуждающие и спинномозговые афферентные волокна [266]. У трансгенных мышей Shank3B<sup>-/-</sup> (генетическая модель аутизма) не наблюдалось положительного эффекта *L. reuteri* на социальное поведение у ваготомированных животных [203]. При этом активация блуждающего нерва вызывала увеличение концентрации индола в кишечнике, являющегося метаболитом микробного происхождения [64].

Гипоталамо–гипофизарно–надпочечниковая система (ГГНС), регулирующая реакцию организма на стресс, представляет собой еще один путь взаимодействия между кишечником и мозгом. Она не только контролирует

реакцию организма на стресс, но также участвует в регуляции эмоций, мотиваций, иммунных реакций, активности системы пищеварения и метаболических процессов. Нарушение регуляции активности ГГНС может быть связано с расстройствами психического здоровья, такими как депрессия и шизофрения, которые ассоциируются с изменением состава кишечной микробиоты [95, 124].

Показано, что у мышей-гнотобионтов (GF) с отсутствием микрофлоры кишечника наблюдается усиленная реакция ГГНС на стресс, характеризующаяся повышенными уровнями кортикостерона в плазме, а также дефицитом обучения, тревожным поведением и сниженной общительностью [71, 131, 171, 190, 219]. Кроме того, у таких животных были отмечены изменения экспрессии NMDA и рецептора 5-HT<sub>1A</sub> в гиппокампе [241], которые влияют на высвобождение кортикотропин-рилизинг фактора (КРФ) из гипоталамуса и изменения в их экспрессии могут способствовать изменению функции ГГНС у GF-животных. О наличии связи между ГГНС и блуждающим нервом также свидетельствует тот факт, что у грызунов стимуляция блуждающего нерва увеличивала экспрессию КРФ в гипоталамусе, а также уровни АКТГ и кортикостерона в плазме крови [203].

В передаче сигналов в кишечно-мозговой оси важное значение имеет взаимодействие между ГГНС и иммунной системой. Так, в условиях психологического стресса у животных отмечались повышенная проницаемость кишечника и бактериальная транслокация в стенку кишечника с последующей активацией иммунного ответа в слизистой оболочке кишечника усилением продукции провоспалительных цитокинов, которые могут приводить к активации ГГНС [228]. Также показано, что в отсутствие резидентной микробиоты снижается или полностью отсутствует экспрессия Toll-подобных рецепторов (TLR), что препятствует развитию адаптивных нейроэндокринных реакций на патогенные воздействия внешней среды [221]. При этом у нокаутных по TLR4 мышей не происходит активация ГГНС в ответ на грамотрицательные бактерии [146].

Важную роль во взаимодействии микробиоты и нервной системы играет мозговой нейротрофический фактор (BDNF), который активно участвует в поддержании жизнедеятельности нейронов, а также стимулирует рост и дифференцировку нейронов и синаптических образований в головном мозге [88]. Наиболее высокая активность BDNF показана в гиппокампе и коре головного мозга – областях, играющих ключевую роль в обучении, памяти и других когнитивных функциях. У GF-мышей отмечается пониженный уровень BDNF в гиппокампе и коре головного мозга [230], а также снижение регуляции мРНК BDNF в зубчатой области гиппокампа [241]. Установлено, что введение *Bifidobacterium breve* 6330 увеличивало общее количество вариантов BDNF и уменьшило IV сплайсинговый вариант BDNF в гиппокампе крыс [76]. Одним из возможных путей регуляции уровня BDNF микробиотой кишечника являются короткоцепочечные жирные кислоты. Так, ингибитор гистондеацетилазы бутират влияет на экспрессию BDNF в гиппокампе [198]. В аналогичном исследовании установлено, что введение пероральных противомикробных препаратов мышам увеличивало экспрессию BDNF в гиппокампе. Однако данные изменения не зависели от воспалительной активности, уровней желудочно-кишечных нейротрансмиттеров, активности обоих отделов вегетативной системы и корректировались введением *B. longum* [276].

В последнее время появились данные о том, что бактерии могут специфически взаимодействовать с различными популяциями нейронов. В частности, *L. helveticus* R0052 влияет на функционирование нейронов ЦНС в гиппокампе и миндалевидном теле, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* H61 модулирует активность нейронов слухового ствола мозга, а *L. reuteri* (DSM 17938) – висцеральных ноцицептивных нейронов кишечника [70, 99, 189]. Кроме того, различные представители кишечной микробиоты могут продуцировать широкий спектр нейротрансмиттеров, позволяющий осуществлять коммуникацию микроорганизмов с макроорганизмом и между собой. Так, *Escherichia coli*, *L. plantarum* и *Staphylococcus aureus* способны синтезировать ацетилхолин [108, 198].



В процессах функционирования оси кишечник-мозг принимает участие и серотонин, способность синтезировать который из триптофана с помощью фермента триптофангидроксилазы широко сохраняется у млекопитающих и некоторых видов бактерий [133]. Более чем 5% серотонина в организме вырабатывается энтерохромафинными клетками [137], однако микробиота кишечника оказывает существенное влияние на серотонинергическую систему желудочно-кишечного тракта хозяина [243]. Так, способность продуцировать серотонин отмечена у *S. aureus*, *E. coli* K-12, *K. pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Lactococcus lactis*, *L. plantarum*, *L. helveticus* и других бактерий [85, 118]. *Clostridium perfringens* модулирует синтез серотонина в толстой кишке хозяина с через рецептор TRH1 [168]. Значительное снижение концентрации серотонина в просветах слепой кишки и толстой кишки отмечено у GF-мышей [243]. При этом трансплантация кишечной микробиоты привела к увеличению концентрации серотонина в просвете кишечника. При этом серотонин модулирует подвижность бактерий и индуцирует экспрессию генов их вирулентности с помощью механизма определения кворума [253].

Важно отметить, что у GF-животных отмечался повышенный уровень циркулирующего триптофана, который корригировался после колонизации микробиотой, на фоне снижения содержания серотонина в крови и в гиппокампе [59, 166, 219]. Помимо синтеза серотонина, более 90% доступного триптофана метаболизируется по кинурениновому пути [252]. При этом содержание кинуренина и его метаболитов коррелируют с состоянием нервной системы [165]. У GF-мышей наблюдалось снижение метаболизма триптофана по кинурениновому пути [278]. Важно отметить, что триптофан-2,3-диоксигеназа (TDO) печени (фермент, превращающий триптофан в кинуренин) регулируется глюкокортикоидами [278], при этом активность его изофермента индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) регулируется иммунной системой. Поскольку микробиота модулирует уровень глюкокортикоидов в крови хозяина и их выработку в ответ на стресс, она может косвенно влиять на выработку кинуренина хозяина посредством глюкокортикоидного контроля TDO печени или активации IDO

через иммунные механизмы [72, 153, 184]. Также у мышей после хронического стресса была отмечена корреляционная взаимосвязь между снижением числа *L. reuteri* и увеличением концентрации кинуренина в сыворотке крови [209].

Дофамин, который участвует в регуляции поведения, мотивированном вознаграждении и является предшественником других катехоламинов, также имеет важное значение во взаимодействии кишечной микробиоты и мозга. Способность к его продукции была показана у *B. cereus*, *E. coli* К-12, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, а у ряда культур *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *S. aureus*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* [69, 75, 84, 178].

Катехоламинергическая система была одной из первых изучена с позиций участия во взаимоотношениях между хозяином и микробом как у животных, так и у людей [196]. Следует отметить, что у GF-грызунов имеется более высокая концентрация норэпинефрина по сравнению с обычными грызунами [184], а способность синтезировать норадреналина была установлена у *B. mycoides*, *B. subtilis*, *E. coli* К-12, *P. vulgaris*, *Serratia marcescens* [65, 57].

Отдельного внимания требует вопрос о значении гистамина в механизмах кишечно-мозгового взаимодействия. Установлено, что гистамин возбуждает афференты вагуса, поэтому гистамин микробного происхождения также может взаимодействовать с нервной системой хозяина [182]. Способность продуцировать гистамин отмечена у многих комменсальных микроорганизмов: *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii*, *M. mogranii*, *Acinetobacter lowfli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio alginolyticus*, *Clostridium spp.* [82, 198]. Установлено, что гистамин, продуцируемый *L. reuteri*, подавлял выработку ФНО $\alpha$  моноцитоидами человека через действие на TLR [154], а *L. reuteri* оказывает иммуномодулирующее действие на стенку кишечника хозяина и регулирует течение воспалительной реакции через H $_2$ -рецептор гистамина [88, 89].

Известно, что как и макроорганизм бактерии обладают способностью превращать глутамат в гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК) [97, 115], которая

является основным тормозным нейромедиатором ЦНС. Установлена связь между измененной ГАМК-ергической нейротрансмиссией и многочисленными расстройствами ЦНС, включая поведенческие расстройства, боль и сон, а также в нарушении важных функций энтеральной нервной системы, таких как моторика кишечника, опорожнение желудка, ноцицепция и секреция кислоты [133, 226]. ГАМК способны синтезировать *Escherichia spp.*, *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.* [140, 195, 211]. У GF-мышей были отмечены более низкие уровни ГАМК в просвете по сравнению с нормальными животными [166]. Установлено, что *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.* преобразуют ГАМК из глутамата натрия, поступающего с пищей [300]. Результаты проекта «Микробиом человека» показали, что в микробиоме фекалий закодирована глутаматдекарбоксилаза – фермент, превращающий глутамат в ГАМК [140]. Кроме того, бактерии экспрессируют рецепторы, способные воспринимать внеклеточную ГАМК [140], поэтому выработка ГАМК хозяином может влиять на микробиоту.

Особая роль в функционировании кишечно-мозговой оси отводится иммунной системе. Желудочно-кишечный тракт обладает самой высокой плотностью иммунных клеток и находится в постоянном контакте с представителями кишечной микрофлоры. Одной из основных функций эпителиального слоя кишечника является препятствование проникновению микробов в ткани кишечника, прежде всего за счет выделения слизи бокаловидными клетками. Граница между просветом кишечника и его слизистой оболочкой является местом, где происходит основное взаимодействие между микробиотой и макроорганизмом, а обмен молекулами через слизистый слой и эпителий способствует облегчению взаимосвязи между кишечником и иммунной системой посредством распознавания собственных и чужеродных антигенов и, следовательно, для запуска иммунных механизмов для выявления потенциально вредных патогенов [201].

Роль иммунной системы во взаимодействии микробиоты с кишечником и мозгом может зависеть от вида макроорганизма. Так, у мышей-гнотобионтов

обнаружены специфические нарушения в иммунной, нейрональной, желудочно-кишечной и метаболической функциях, а их заражение патогенным микроорганизмом *C. rodentium* приводило к развитию тревожного поведения [122, 138].

У нокаутных по Rag2 трансгенных мышей с отсутствием зрелых В- и Т-лимфоцитов адаптивный перенос лимфоцитов от стрессированных мышей приводил к снижению уровня тревожности, повышению социального поведения, а также увеличению пролиферации клеток гиппокампа в сравнении с получившими клетки от нестрессированных животных. При этом перенесенные лимфоидные клетки также были обнаружены в сосудистом сплетении и мозговых оболочках [156, 225]. Данные изменения функций нервной системы корректировались введением комбинации пробиотиков *L. rhamnosus* и *L. helveticus*. Для пролиферации интраэпителиальных лимфоцитов (в частности, CD4CD8 $\alpha$  $\alpha$ <sup>+</sup> Т-клетки) в иммунорегуляторные Т-клетки требуется наличие *L. reuteri* в сочетании с богатой триптофаном диетой, что свидетельствует о взаимодействии микробиома кишечника с адаптивной иммунной системой [191].

Ряд метаболитов комменсальных бактерий, включая нейромодуляторы, бактериоцины, желчные кислоты, холин и короткоцепочечные жирные кислоты, оказывают иммуномодулирующий эффект. Взаимодействие микробиоты с хозяином на уровне кишечника приводит к высвобождению цитокинов, хемокинов, нейротрансмиттеров, нейропептидов, эндокринных мессенджеров и микробных продуктов метаболизма, которые могут проникать в кровеносную и лимфатическую системы или оказывать влияние на нейронные сообщения, передаваемые блуждающими и спинномозговыми афферентными нейронами для постоянной связи с мозгом и контроля состояния здоровья и, возможно, регуляции функций нервной системы [194, 221].

Таким образом, динамическое равновесие между состоянием кишечной микробиоты и нервной системы поддерживается различными регуляторными механизмами (нервными, гуморальными, иммунными). В результате разобщения структурно-функциональных взаимосвязей в данной двунаправленной

коммуникации могут отмечаться существенные нарушения состояния нервной системы, и, как следствие, изменение важных показателей жизнедеятельности организма и его адаптивного потенциала. Важную роль в данных процессах играет повышение проницаемости кишечной стенки.

## **1.2. Механизмы повышения проницаемости кишечной стенки при стрессе**

Барьер слизистой оболочки толстой кишки, отделяющий просвет кишечника от внутренней среды, включает в себя пристеночную микробиоту, слой слизи и слизистую оболочку, в которой помимо однослойного столбчатого эпителия находятся бокаловидные, энтероэндокринные и М-клетки. Внутри собственной пластинки имеются кровеносные и лимфатические сосуды, иммунные клетки (тучные, плазматические, дендритные, лимфоциты, макрофаги, эозинофилы, клетки) и значительное количество внутренних и внешних нервных окончаний. Все эти компоненты обладают исключительной реактивностью и адаптивностью, а также критическими эффекторными и модулирующими функциями, которые играют важную роль в контроле воспаления, метаболических процессов, всасывания, секреции и транспорта макромолекул. Коммуникация при этом осуществляется за счет высвобождения широкого спектра химических медиаторов: нейропептидов, нейрогормонов, нейротрансмиттеров, цитокинов, хемокинов, факторов роста и других регуляторных молекул [19].

Энтероциты плотно связаны друг с другом, герметизируя парацеллюлярное пространство через апикальный соединительный комплекс, состоящий из плотных контактов, адгезивных соединений и десмосом [89]. Трансмембранные белки плотных контактов (окклюдин и клаудины) образуют сложные системы, взаимодействующие с белками *zonula occludens*, которые связываются с актиновым цитоскелетом. Парацеллюлярное пространство не является полностью непроницаемым для молекул и антигенов, позволяя ограниченному количеству

молекул (менее 400 Да) проникать через него и достичь собственной пластинки. Данный механизм играет ключевую роль в индукции иммунной толерантности. Нарушение кишечного барьера приводит к неконтролируемому потоку антигенов и микроорганизмов из просвета вглубь слизистой оболочки, что может вызвать активацию иммунитета, а также привести к развитию воспаления [154, 202, 213]. Таким образом, жесткая регуляция проницаемости кишечника является центральным механизмом предотвращения развития в нем воспалительных реакций [19].

Многочисленные исследования демонстрируют повышение проницаемости кишечника под воздействием острых и хронических стрессоров через различные механизмы [109, 199]. Наиболее актуальными из них являются: высвобождение КРФ, активация тучных клеток (ТК), эозинофилов, дендритных клеток (ДК) и эпигенетические изменения в генах, кодирующих белки межэпителиальных контактов [242]. Наиболее актуальными из них являются активация клеточных элементов (тучные клетки, эозинофилы, дендритные клетки) и эпигенетических механизмов, выделение нейроэндокринных факторов (КРФ) и нейропептидов, а также воспалительная реакция при транслокации бактерий, роль которых изложена ниже.

Установлено, что при моделировании вызванного стрессом повышения КРФ путем его экзогенного введения наблюдалось увеличение проницаемости толстой кишки [229], однако оно не развивалось при предварительном введении неселективного антагониста КРФ астрессина или КРФ<sub>9-41</sub> [93, 171, 179]. При этом селективный агонист рецептора КРФ-1 кортагин, селективный антагонист рецептора КРФ-1 SSR-125543 и селективный антагонист рецептора КРФ-2 антисаувагин-30 снижали проницаемость толстой кишки, что свидетельствует об участии обоих рецепторов КРФ в модуляции данного процесса [97, 128, 198]. В исследованиях на нескольких линиях культивируемых эпителиальных клеток показано, что КРФ индуцирует повышенную регуляцию TLR4, а предварительная обработка антагонистом рецептора КРФ2 антальармином не вызвала подобного ответа. Сопутствующее присутствие КРФ и липополисахарида (ЛПС) повышало

проницаемость стенки кишки для пероксидазы хрена и снижало трансэпителиальную резистентность. Данный эффект корригировался антагонистом рецептора КРФ2 и астрессинном 2-В на фоне повышения уровня клаудина-2. Аналогичным образом, экспрессия TLR4 и клаудина-2 увеличивалась в тонком и толстом кишечнике беременных мышей, подвергнутых 10-дневному воздействию, в сочетании с увеличением проницаемости стенки для пероксидазы хрена. Данный эффект нивелировался введением спирального КРФ<sub>9-41</sub> и антител к клаудину [260].

Важным механизмом повышения проницаемости барьера слизистой оболочки толстой кишки является формирование патогенетической цепи стресс-КРФ-тучные клетки. Так, в кишечнике изменения секреции и проницаемости эпителиальных барьеров коррелируют со степенью инфильтрации ТК [291]. В условиях стресса мозг может влиять на состав микробиоты через гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось и за счет секреции кортизола изменять проницаемость и барьерную функцию кишечника. ТК чувствительны к компонентам данной оси, поскольку на них локализованы рецепторы к КРФ, активация которых приводит к высвобождению цитокинов и других провоспалительных медиаторов [162]. Известно, что КРФ усиливает трансклеточное поглощение макромолекул в слизистой оболочке толстой кишки человека *in vitro* через рецепторы КРФ1 и КРФ2, экспрессируемые на субэпителиальных ТК [116].

В основе взаимосвязи между проявлениями стресса и реакциями со стороны желудочно-кишечного тракта находится взаимодействие мозга и ТК за счет вовлечения блуждающего нерва [210, 216]. Так, ЦНС через внешние сенсорные блуждающие нервы вызывает дегрануляцию ТК кишечника, тогда как симпатическая активация блокирует данный процесс. В данном случае ТК, высвобождая биологически активные вещества, играют роль эффекторных клеток при неиммунном стимуле [290].

У животных, лишенных ТК (крысы Ws/Ws и мышей W/W (v)), в условиях хронического стресса сохранялось нормальное функционирование желудочно-

кишечного тракта, не отмечалось изменений структуры и функции эпителия, взаимодействия бактерий и эпителиальных клеток, а также признаков инфильтрации воспалительными клетками. Однако при этом наблюдались внекишечные проявления стресса: потеря веса, повышенный уровень кортикостерона и эмоциональности [88]. Также было показано, что фармакологическое ингибирование активации ТК нивелировало вызванную стрессом повышенную проницаемость кишечника в различных моделях у животных [93, 106, 209]. Так, предварительное введение стабилизатора ТК доксантразола корригировало или полностью нивелировало повышение проницаемости кишечника в ответ на иммобилизационный стресс или внутрибрюшинное введение КРФ [248, 262]. Кроме того, КРФ вызывал гиперплазию ТК и увеличение адгезии бактерий и/или их проникновение в слизистую оболочку крыс, тогда как у крыс с дефицитом ТК таких изменений не отмечалось [83]. При этом известно, что стимуляция рецептора КРФ1 индуцировала повышенную секрецию, тогда как активация рецептора КРФ2 вызывала увеличение проницаемости стенки [83, 248].

Увеличение кишечной парацеллюлярной проницаемости под влиянием КРФ может развиваться за счет зависимого от ТК высвобождения ФНО- $\alpha$  и протеаз [222]. Установлено, что высвобождаемые при активации ТК триптазы индуцирует разрушение ПК посредством активации рецепторов, активируемых протеазой-2 из эпителиальных клеток [214, 233]. Данные рецепторы могут модулировать кишечную нейротрансмиссию, секрецию, моторику и проницаемость эпителия, а также регулируют воспалительные реакции в кишечнике [295]. Контакты между ТК и нервными волокнами кишечника были показаны в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта и при воспалении их число увеличивает [62, 160]. при этом ТК взаимодействуют двунаправленно как с кишечной, вегетативной, так и с центральной нервной системой через различные медиаторы и нейропептиды [85].

ТК являются важным связующим звеном между энтеральной НС и ЦНС. В кишечнике они располагаются в непосредственной близости с сенсорными



нервными волокнами слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, включая висцеральные афференты, которые экспрессируют ванилоидные рецепторы1 (TRPV1). Активация данных рецепторов на первичных сенсорных нейронах способствует нейрогенному воспалению [289]. Афферентная иннервация кишечных ТК может вызвать высвобождение гистамина, который действует через четыре типа гистаминовых рецепторов (HR). Активация HR1 и HR2 влияет на функцию кровеносных сосудов (расширение и повышенная проницаемость), гладких мышц (сокращение) и эпителиальных клеток (выработка слизи). Гистамин также воздействует на эпителиальные клетки, дендритные клетки, способствует активации Т-хелперов (Th) 1 через HR1 и подавляет активацию клеток Th1 и Th2 через HR2 [81].

Важную роль в изменении проницаемости кишечника играют эозинофилы и нейропептиды. Показано, что основной основной белок эозинофилов влияет на барьерную функцию посредством подавления окклюдина независимым от ТК способом [125]. Субстанция Р индуцирует высвобождение вазоактивных медиаторов из ТК, макрофагов и Т-клеток, способствуя секреции хлоридов, повышению проницаемости кишечника и сосудов [149, 209]. За счет увеличения под действием субстанции Р экспрессии рецептора КРФ1 на ТК КРФ индуцирует экспрессию специфического рецептора нейрокинина (NK)-1 [249]. Показано, что в условиях психологического стресса SP через рецепторы NK-1 и NK-2 индуцировала высвобождение из эозинофилов КРФ, который приводил к активации ТК и дальнейшей дисфункции эпителиального барьера [238].

Важную роль в регуляции иммунной функции и проницаемости кишечника играют дендритные клетки посредством выработки КРФ, усиленной бактериями-комменсалами [105]. Аналогичным образом, агонисты рецепторов КРФ1 и КРФ2 оказывают двухфазное действие на макрофаги. На ранних стадиях воспалительной реакции они подавляют высвобождение ФНО- $\alpha$  посредством индукции циклооксигеназы-2/простагландина E2, а на более поздних этапах индуцируют транскрипцию ФНО- $\alpha$  [107].

Установлено, что вызванное стрессом увеличение парацеллюлярной проницаемости кишечника может индуцироваться и фактором роста нервов (NGF), высвобождение которого происходит при активации рецепторов КРФ1 на ТК. В частности, повышение проницаемости толстой кишки при стрессе на модели материнской депривации происходит при повышенной экспрессии NGF [215]. При этом КРФ, действуя через КРФ1 рецептор, стимулировал высвобождение NGF из ТК, что, в свою очередь, было ассоциировано с повышенной парацеллюлярной проницаемостью кишечника [224].

Одним из возможных механизмов повышения проницаемости кишечника также является изменение эпигенетической регуляции генов, кодирующих белки межклеточных контактов. Так, установлена потенциальная роль H3K9me3 в увеличении парацеллюлярной проницаемости в условиях хронического стресса, который увеличивал репрессивное метилирование гистона H3K9me2/me3 и снижал связывание транскрипционного GR с промоторами генов Ocln и Cldn-1, что приводило к пониженной регуляции экспрессии белка и увеличению парацеллюлярной проницаемости [157]. Кроме того, применение кортизола на модели колоноида человека приводило к снижению экспрессии Ocln. Данный эффект гормона нивелировался антагонистом GR RU486. Увеличение метилирования H3K9 и снижение уровней белков ПК может происходить под действием ИЛ-6 и данные изменения корригировались селективными ингибиторами метилирования H3K9 UNC0642 [157]. Также отмечена возможная роль метилирования репрессивного гистона H3K27 в снижении экспрессии белков ПК [111]. Определенную роль в понижающей регуляции экспрессии гена и белка ПК в эпителии кишечника могут играть и реципрокные изменения (снижение функции) в гистонах-активаторах, такие как ацетилирование H3K27, которые связаны с активной экспрессией гена [153].

Таким образом, в результате вышеописанных стресс-индуцированных процессов в стенке толстой кишки происходит изменение проницаемости эпителиального барьера (рисунок 1), что способствует транслокации

микроорганизмов и их антигенов в слизистую оболочку кишечника [122, 208, 253].

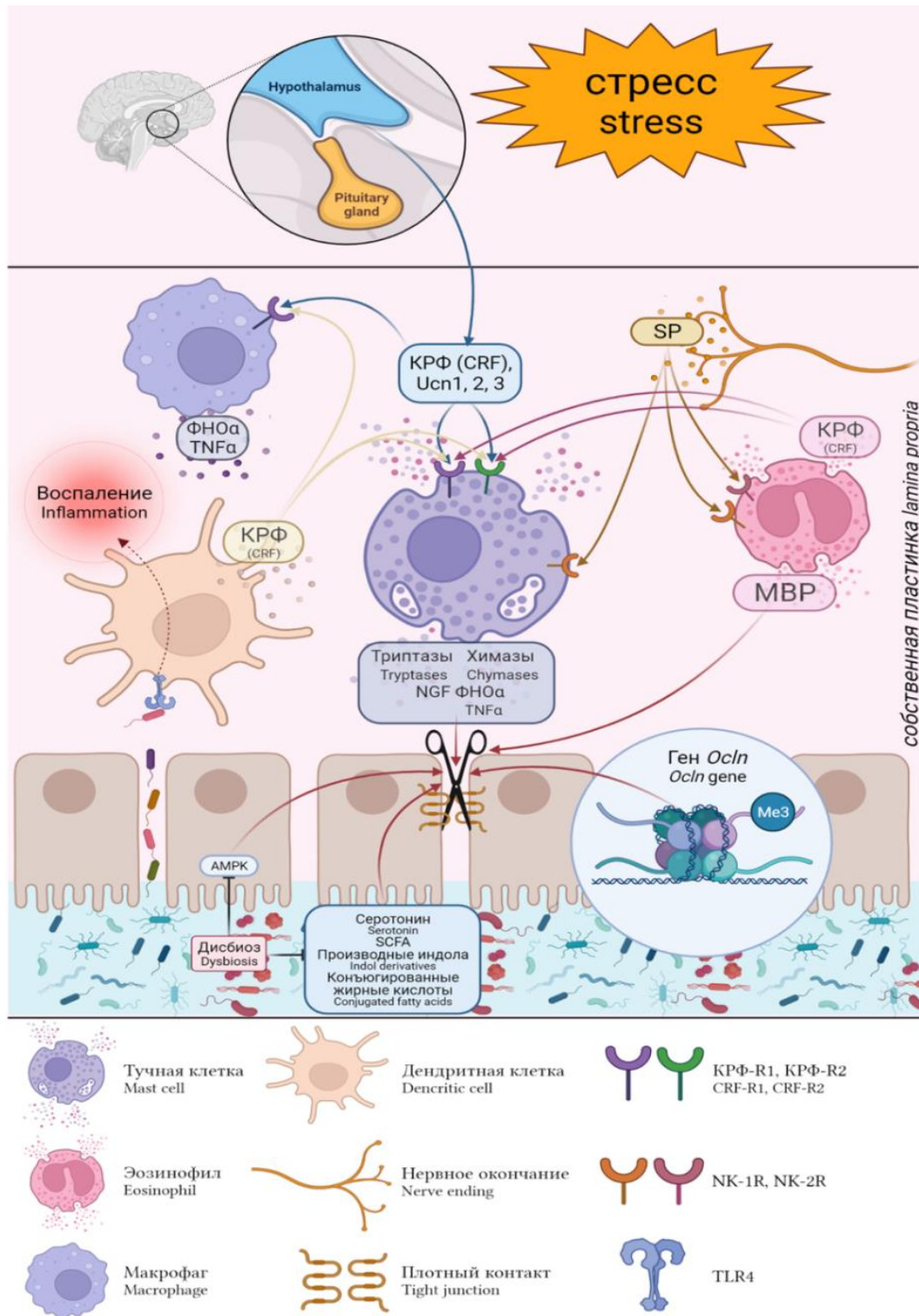


Рисунок 1 – Механизмы повышения проницаемости эпителия толстой кишки при стрессе [19]

Миграция бактерий и бактериальных антигенов через слизистую оболочку кишечника, в свою очередь, вызывает повышенный провоспалительный иммунный ответ [87, 117, 185]. Так, грамотрицательные бактерии содержат ЛПС в стенках и везикулах, а его присутствие определяется CD14-TLR4 на клетках CD14 (нейтрофилах, макрофагах и дендритных клетках [167]). Путь TLR4/NLRP3 играет ключевую роль в регулировании гомеостаза кишечника, поддержании целостности кишечного эпителиального барьера и снижении смертности при экспериментальном колите, а также может влиять на состав кишечной микробиоты [298]. Взаимодействие TLR4, CD14 и ко-рецептора MD-2 приводит к активации домена смерти MyD88, который рекрутирует и активирует белки-линкеры: интеллейкин-1 рецептор ассоциированную киназу (IRAK) 4, IRAK1 и ассоциированный с рецептором ФНО фактор 6 (TRAF6). TRAF6 может образовывать комплекс с UBC1/3UEV1A и функционировать как убиквитинлигаза E3, которая активирует трансформирующий фактор роста- $\beta$  в активированную киназу 1 (TAK1) на мембране. Затем TAK1 активирует нижестоящие ингибирующие пути I $\kappa$ B-киназы и MAPK и за счет этого усиливает воспалительной реакции [62, 111]. В свою очередь, NLRP3 связывается с апоптоз-ассоциированным Speck-подобным белком (ASC), что приводит к повышенной выработке прокаспазы-1. В дальнейшем данный белок преобразуется в активированную каспазу-1, способствующей секреции ИЛ-1 $\beta$  и развитию воспалительной реакции [143, 169]. Взаимодействие ЛПС с TLR4 также активирует MyD88-независимый путь с последующим высвобождением NF- $\kappa$ B и регуляторного фактора интерферона 3 (IRF3), их транслокацией в ядро и активацией инфламмосомы NLRP3 [283]. Результатом данного каскада внутриклеточных реакций является увеличение экспрессии провоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН $\gamma$ ) в колоноцитах и увеличение их уровней в сыворотке крови [84, 146, 232].

### 1.3. Биологические эффекты пептидов семейства меланокортинов и их синтетических аналогов

В настоящее время в литературе накоплен достаточно большой объем информации о группе меланокортиновых пептидов, обладающих широким спектром биологической активности. Меланокортины образуются в результате посттрансляционного процессинга общего белка-предшественника – проопиомеланокортина (ПОМК). ПОМК также может вырабатываться вне гипофиза, например, в дугообразном ядре гипоталамуса и ядре солитарного тракта ствола головного мозга, спинном мозге и ганглии дорсального корешка. Матричная РНК ПОМК также обнаруживается в лимфоцитах и моноцитах. После синтеза ПОМК подвергается протеолизу проконвертазами (РС). Проконвертаза 1 (РС1) расщепляет ПОМК с образованием про- $\gamma$ -меланоцитстимулирующего гормона (МСГ), АКТГ и  $\beta$ -липотропина, из которых после действия РС2 образуются  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -МСГ,  $\beta$ -эндорфин и кортикотропиноподобный промежуточный пептид (CLIP) [165, 175].

Меланокортины оказывают влияние на процессы памяти и обучение, терморегуляцию, болевую чувствительность, сердечно-сосудистую, иммунную систему и пищевое поведение. Свои биологические эффекты они реализуют путем связывания с пятью подтипами МСР. В структуре всех меланокортинов имеется общая аминокислотная последовательность His-Phe-Arg-Trp, который является минимально необходимой для связывания с рецепторами и их последующей активацией.

МС1R является классическим рецептором для МСГ и экспрессируется в коже, волосяных фолликулах, околопроводном сером веществе, моноцитах/макрофагах, лимфоцитах, нейтрофилах и астроцитах. Также установлено, что *E. coli* кишечной микробиоты продуцирует структурно и функционально аналогичный АКТГ и  $\alpha$ -МСГ меланокортиноподобный пептид (МЕСО-1 – меланокортиноподобный пептид *E. coli*), оказывающий

противовоспалительный эффект. Показано, что МЕСО-1 *in vitro* связывается с МС1R, что позволяет предположить наличие МС1R в стенке кишечника [218].

Классический рецептор АКТГ МС2R экспрессируется в коре надпочечников и регулирует стероидогенез в надпочечниках и пролиферацию их клеток. МС2R также экспрессируется в хондроцитах и остеобластах.

Большинство МС3R экспрессируются главным образом в ЦНС (коре, таламусе, гипоталамусе, гиппокампе, миндалевидном теле, ядре одиночного пути, и перегородке), также этот подтип рецепторов был обнаружен в плаценте, сердце, кишечнике человека, лимфоцитах и макрофагах.

МС4R экспрессируется во многих областях мозга, включая кору головного мозга, гиппокамп (СА1 и СА2 области), зубчатую извилину, миндалину, септальную область, стриатум, таламус, гипоталамус, ствол головного мозга, ядро одиночного пути и спинной мозг.

МС5R широко экспрессируется в коже, надпочечниках, адипоцитах, скелетных мышцах, костном мозге, почках, печени, легких, селезенке, тимусе, гонадах, матке и головном мозге. Также меланокортины могут оказывать иммуномодулирующее действие через МС5R В-, Т-лимфоцитов и тучных клеток.

Для регуляции экспрессии МСRs, их активации и внутриклеточной сигнализации необходимы вспомогательные белки – MRAP1 и MRAP2. MRAP1 необходим для передачи сигналов с МС2R. Позже в надпочечниках и гипоталамусе был обнаружен близкородственный ему белок MRAP2. MRAP1 необходим для активации МС2R-сигнализации, тогда как MRAP2 считается его конкурентным ингибитором. Помимо регуляции сигнализации с МС2R, MRAP также взаимодействуют и с другими МСRs [164, 196].

МСRs в основном связаны с Gs-белками и сигнализация с них приводит к активации аденилатциклазы, затем образовавшийся циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) активирует протеинкиназу А (РКА), которая, в свою очередь, дополнительно индуцирует фосфорилирование фактора транскрипции и влияет на транскрипцию нижестоящих генов. В дополнение к

классическому пути MCRs могут также передавать сигналы другие вторичные мессенджеры [207].

Активация MC1R запускает образование цАМФ, повышает уровень  $Ca^{2+}$  и активирует ERK1/2. Опосредованная  $\alpha$ -МСГ активация PKA индуцирует фосфорилирование транскрипционного фактора CREB. Показано, что цАМФ активирует RAP-1 через PKA и дополнительно индуцирует фосфорилирование RAS, который активирует B-RAF, MEK и ERK1/2. В клетках пигментного эпителия сетчатки  $\alpha$ -МСГ активирует сигнальные пути ERK1/2 и АКТ/mTOR, уменьшая повреждение клеток, вызванное перекисью водорода [247].

MC2R способен передавать сигналы через  $Ca^{2+}$ , PKC и ERK1/2, активируя несколько транскрипционных факторов, таких как CREB, c-Fos и c-Jun. Ключевыми факторами, определяющими, какие пути могут быть активированы в различных ситуациях, могут являться сила и продолжительность стимулов, которые могут зависеть не только от типа клетки и концентрации агониста, но также от экспрессии и плотности MC2R на поверхности клеток [247].

MC3R также способен и передавать сигнал как через Gs/цАМФ/PKA, так и через ERK1/2, повышать внутриклеточные уровни  $Ca^{2+}$  и взаимодействовать с PKC-путем. Кроме того, передача сигнала пролиферативного сигнала в нейронах с MC3R может идти как по ERK1/2, так и по PI3K- и Gi/o-зависимому механизму, что может определять нейротрофическую роль MC3R в ЦНС [247].

MC4R может соединяться с Gs, Gi/o и Gq и запускать, помимо PKA, PKC-, PI3K- и ERK1/2-сигнальные пути. Стимуляция MC4R клеток гипоталамуса способствует активации цАМФ и транзитному фосфорилированию ERK1/2 по пути  $Ca^{2+}$ /PKC. Кроме того, показано PI3K-зависимое фосфорилирование ERK1/2. PKA-независимая передача сигналов ERK1/2 является важным механизмом для опосредования антиапоптотических эффектов меланокортинов в клетках гипоталамуса [247].

MC5R при активации вызывает два параллельных сигнала - цАМФ/PKA и ERK1/2. При этом активация ERK1/2 происходит независимо от PKA, PKC и АКТ

и приводит к последующему фосфорилированию 90-кДа рибосомальных S6-киназ и активируемой митогеном и стрессом протеинкиназы 1 [247].

Широкий спектр физиологических и биологических эффектов природных меланокортинов, наличие 5 типов рецепторов и их высокая распространенность в организме обуславливает целесообразность поиска синтетических аналогов меланокортинов для коррекции стресс-индуцированных изменений в организме.

Показано, что селективный антагонист MC4R HS014 оказывает антидепрессантное и анксиолитическое действие в условиях острого иммобилизационного стресса. Так, интраназальное введение HS014 приводило к снижению времени иммобилизации в тесте принудительного плавания, увеличению времени нахождения животного в открытых рукавах, снижению времени, проведенного в закрытых рукавах, числа свешиваний, индекса тревожности в тесте приподнятого крестообразного лабиринта, а также увеличению времени нахождения в центре и уменьшению числа фекальных болюсов в тесте открытого поля [174]. У животных, получавших интраназально HS014, отмечалось снижение уровня мРНК тирозин-гидроксилазы (лимитирует скорость биосинтеза норадреналина в голубом пятне), кортикостерона в плазме и экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе [101]. Кроме того, HS014 оказывает анксиолитическое и антидепрессантное действие на модели социальной изоляции. Его внутрижелудочковое введение после 6-недельной изоляции от матери приводило к увеличению времени нахождения в открытых рукавах ПКЛ и снижению времени фризинга [179]. Также HS014 снижал стремление к возобновлению употребления никотина абстинентными крысами в условиях стресса [56].

Такие антагонисты MC4R как MCL0020, MCL0129 и MCL0042 в условиях острого иммобилизационного стресса и стресса, вызванным принудительным плаванием, оказывали анксиолитический эффект в тестах темной-светлой камеры, ПКЛ и конфликтной ситуации по Vogel [67, 142, 144, 151].

Также показана стресс-лимитирующая активность антагониста MC3/4R SHU9119. В условиях острого иммобилизационного стресса введение SHU9119



как в медиальное ядро миндалевидного тела, так и в желудочки головного мозга, приводило к увеличению времени нахождения животных в открытых рукавах ПКЛ, уменьшению потребления пищи, а также снижению уровня кортикостерона в плазме крови [163, 218]. Кроме того, в условиях эфирного стресса SHU9119 нивелировал стресс-индуцированную анорексию и снижал уровень кортикостерона в плазме крови [29]. Таким образом, меланокортиновая система играет важную роль в развитии стрессорной реакции.

В настоящее время в клинической практике применяется созданный на основе меланокортинов фармакологический препарат Семакс, представляющий собой синтетический аналог участка АКТГ<sub>4-7</sub>, защищенный от действия эндопептидаз путем присоединения глипролина Pro-Gly-Pro (PGP). Препарат рекомендован для лечения интеллектуально-мнестических расстройств при сосудистых поражениях головного мозга, а также для повышения адаптационных возможностей в экстремальных условиях и профилактики психического утомления в наиболее тяжелые периоды работы в стрессовых условиях [185].

Для семакса установлены стресс-протекторные эффекты на различных моделях стресса. Так, в условиях острого иммобилизационного стресса (ОИС), внутрибрюшинное введение в дозе 100 мкг/кг ослабляло когнитивные нарушения, а также оказывало анксиолитическое действие [70]. Установлено, что в условиях острого стресса на моделях принудительного плавания в холодной воде и прерывистого электроболевого раздражения введение гептапептида приводило к ослаблению опиоидной формы вызванной стрессом анальгезии у крыс в тесте давления на лапу, но не корригировало стресс-индуцированное снижение исследовательской активности и уровень тревожности [55]. Показано, что внутрибрюшинное введение семакса в условиях острого эмоционально-болевого и иммобилизационного стресса снижало выраженность акцидентальной инволюции тимуса, нормализовало структуру печеночной паренхимы, снижало выраженность ее дистрофии, приводило к уменьшению площади гепатоцитов и степени выраженности их гидропической дистрофии и увеличению числа

многоядрышковых гепатоцитов [235, 236]. Также АКТГ<sub>4-7</sub>-ППП приводил к восстановлению белок-синтезирующей функции и уменьшению выраженности свободно-радикального окисления в ткани печени, снижению уровней сывороточных трансаминаз [236, 244]. Также была проведена оценка стресс-лимитирующего эффекта АКТГ<sub>4-7</sub>-ППП с использованием полногеномного секвенирования РНК гиппокампа крыс, подвергнутых острому иммобилизационному стрессу. Показано, что семакс приводил к увеличению экспрессии генов, кодирующих структурные белки рибосом, изменению экспрессии генов ферментных систем и транспорта. Кроме того, антистрессорное действие семакса было ассоциировано с изменением экспрессии генов нейросигнализации и сплайсинга, а также со снижением экспрессии генов, связанных с функционированием лизосом [41].

В ряде работ установлена активность семакса при хроническом стрессе. Так, в условиях 14-дневного ХИС при введении семакса оказывал анксиолитическое действие: в тесте открытого поля наблюдалось значительное уменьшение эмоциональности и тревожности в виде снижения числа уринаций, количества актов короткого груминга, двигательной активности в центральных квадратах и показателей тревожности в сравнении с контрольными стрессированными животными [284]. Кроме того, в тесте приподнятого крестообразного лабиринта АКТГ<sub>4-7</sub>-ППП увеличивал время нахождения животных на центральной площадке при уменьшении времени их пребывания в закрытых рукавах. На фоне всех перечисленных эффектов установлено снижение уровня кортикостерона в сыворотке крови на 14 сутки действия ХИС по сравнению со стрессированными животными, получавшими физиологический раствор, а также установлена дозозависимая корреляция между концентрацией кортикостерона в сыворотке крови и показателями тревожности [284]. В условиях социального стресса семакс также оказывал анксиолитическое действие: у животных в агрессивным и субмиссивным типами поведения отмечалось увеличение времени и числа заходов в открытые рукава, и числа выглядываний из закрытых рукавов в тесте приподнятого крестообразного лабиринта, а в тесте открытого поля – увеличение

горизонтальной и вертикальной активности, числа пересеченных центральных квадратов и снижение количества оставленных фекальных боллюсов [101, 102].

Введение АКТГ<sub>4-7</sub>-ППП в условиях неонатального стресса в течение первых 21 дней жизни детенышам крыс вызывало снижение уровня тревожности, рост ориентировочно-исследовательской активности и улучшение обучения крыс на фоне восстановления до контрольных значений уровня кортикостерона [103]. Отмечалось, что применение семакса в условиях хронического непредсказуемого стресса приводило к нивелированию стресс-индуцированной тревожности и депрессии, а также к нормализации набора массы тела и снижению относительной массы надпочечников [152].

Установлено, что введение семакса на фоне 5-дневного иммобилизационного стресса приводило к снижению числа многоядрышковых гепатоцитов в центральном отделе дольки, и увеличению данного показателя в периферическом отделе [34]. Кроме того, в условиях иммобилизационного стресса семакс вызывал снижение уровней сывороточных трансаминаз и активности перекисного окисления липидов в печени, а также повышение уровня общего белка [13]. В условиях повторяющегося на протяжении 5 дней эмоционально-болевого стрессорного воздействия семакс приводил к восстановлению балочной структуры паренхимы печени на фоне снижения выраженности цитолитического синдрома, свободно-радикального окисления в печени и восстановления протеинсинтезирующей функции печени [139, 244].

Результатом стрессорного воздействия на организм также могут являться качественные и количественные изменения состава микробиоты толстой кишки, что приводит к реорганизации в функционировании в ЦНС посредством изменений в кишечной-мозговой оси. В связи с этим необходимо отметить влияние семакса на состав микробиоты толстой кишки в условиях 2-недельного ХИС, при котором ежедневное внутрибрюшинное его введение за 30 минут до стрессорного воздействия корригировало стресс-индуцированные изменения качественного и количественного состава пристеночной микробиоты толстой кишки. При этом отмечалось увеличение числа представителей облигатной

микробиоты (лактобактерий, бифидобактерий, кишечной палочки с нормальной ферментативной активностью), уменьшение содержания условно-патогенных микроорганизмов (цитробактеров, морганелл, ацинетобактеров, энтерококков), а также снижение числа золотистых стафилококков, коагулазоотрицательных стафилококков и грибов рода *Candida* [102].

Известно, что между состоянием пристеночной микробиоты и морфофункциональным состоянием стенки толстой кишки имеются тесные взаимосвязи. Стресс-индуцированные изменения в ней приводят к изменению адгезивных свойств как эпителия слизистой оболочки, так и микроорганизмов на ней, а также к повышению ее проницаемости, которое может привести к транслокации бактерий в подслизистый слой и развитию воспаления стенки кишки с дальнейшим развитием нарушений функций нервной системы. АКТГ<sub>4-7</sub>-ППП в условиях ХИС приводил к восстановлению гистоархитектоники слизистого слоя толстой кишки (увеличению высоты крипт и числа бокаловидных клеток), уменьшению выраженности дезорганизационных, дисциркуляторных и дистрофических изменений, снижению воспалительной инфильтрации и экссудации, а также числа тучных клеток [212].

Также показано иммуномодулирующее и цитопротекторное действие АКТГ<sub>4-7</sub>-ППП в условиях стрессорного воздействия: отмечалось снижение концентрации ИЛ-1 $\beta$  в условиях социального, информационного и иммунного стрессов [33], а также иммуномодулирующее действие информационного стресса [48]. В условиях информационного стресса семакс также вызывал снижение выраженности перекисного окисления липидов и уровней апоптотических факторов (каспазы-3 и -8) в сыворотке крови, в условиях социального стресса – повышение содержания мозгового нейротрофического фактора и фактора роста нервов [73, 237, 241]. Также АКТГ<sub>4-7</sub>-ППП корригировал нарушения гемостаза, вызванные воздействием острого и хронического иммобилизационного стресса [121, 246].

В связи с повышением актуальности изучения роли вспомогательных пептидов меланокортиновых рецепторов представляет собой интерес изучение

биологических эффектов аналогов участка АКТГ<sub>15-18</sub> (Lys-Lys-Arg-Arg), который отвечает за связывание меланокортинов с MRAP. Показано, что пептид АКТГ<sub>15-18</sub> и его синтетический аналог АКТГ<sub>15-18</sub>-ППП нивелировали тревожность, вызванную острым электрошоковым стрессом, при введении за 20 ч и за 30 мин до стрессорного воздействия. В тесте приподнятого крестообразного лабиринта отмечалось увеличение времени, проведенного в открытых рукавах, числа заходов в рукава, свешиваний, снижение времени в закрытых рукавах, а в тесте «О-образный лабиринт» отмечалось увеличение времени в открытых секторах, числа заходов в них и количества свешиваний. Кроме того, оба пептида приводили к снижению уровня кортикостерона в сыворотке крови. Следует отметить, что эффект АКТГ<sub>15-18</sub>-ППП более выраженный и продолжительный, чем АКТГ<sub>15-18</sub> [18].

Также изучены эффекты олигопептидов – аналогов участка АКТГ<sub>15-18</sub> в условиях острого иммобилизационного стресса. Так, пептиды ацетил-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-амид и ацетил-(D-Lys)-Lys-(D-Arg)-Arg-амид нивелировали стресс-индуцированные структурные изменения в надпочечниках и печени, снижали выраженность свободно-радикального окисления, стабилизировали углеводный обмен и показатели периферической крови у крыс [152, 242, 251].

Таким образом, меланокортиновую систему можно рассматривать как одну из стресс-лимитирующих систем, а применение синтетических производных природных меланокортинов как перспективное направление коррекции стрессиндуцированных изменений в гомеостазе на различных уровне организации организма.

#### 1.4. Пептид АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП: биодоступность, механизмы деградации и биологических эффектов

Пептид АКТГ<sub>6-9</sub> (His-Phe-Arg-Trp) является активным центром АКТГ, который взаимодействует со всеми типами меланокортиновых рецепторов (MCR), кроме MC2R [247, 252]. Присоединение трипептида Pro-Gly-Pro к С-концу этой молекулы повышает её устойчивость к действию карбоксипептидаз и способствует пролонгации биологических эффектов.

Важным аспектом при изучении эффектов АКТГ<sub>6-9</sub>-PGP является оценка биодоступности пептида при различных способах введения, механизмов его биодеградации и устойчивости, распределения и накопления в различных органах, а также путей элиминации. Установлено, что при внутривенном введении АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП снижение его содержания происходит с нарастающей скоростью: через 1 час концентрация падает на 67%, а через 2 часа – на 86% [186, 258] при среднем времени нахождения пептида в крови (MRT) 108 минут. При интраназальном введении АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП концентрация пептида поддерживается практически на одном уровне в течение двух часов: 0,37 и 0,38 пмоль/г через 1 и 2 ч соответственно, MRT составило 131 мин [204, 265]. В данном случае время полной абсорбции из слизистой оболочки составило 161 минуту. Максимум общей радиоактивности и меченого пептида наблюдали через 120 минут после введения пептида, который составлял 1,12 пмоль/мл (0,08% от введенной дозы), через 5 ч его концентрация была 0,13 пмоль/мл [204, 265]. При внутривенном введении АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП отношение содержания пептида в мозге и крови крыс, в отличие от интраназального введения, значительно отличалось: отношение площади под кривой (AUC) концентрации пептида в мозге и крови при внутривенном введении составляла 0,132, а отношение AUC пептида в мозге и крови при интраназальном введении составляло 0,196. Показано, что около 33% от введенного в носовую полость пептида попадает в головной мозг путем прямого транспорта [186, 249].

Установлено, что при протеолизе АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП в мозге и крови крыс независимо от способа введения из всех продуктов протеолиза пептида наблюдается наибольшая концентрация Pro-Gly-Pro. Следует отметить, что концентрация PGP в мозге при интраназальном введении была выше, чем в крови. При внутривенном введении наблюдалась обратная картина на фоне высокой концентрации триптофана [186, 258].

Известно, что наиболее важным механизмом протеолиза АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП является действие аминопептидаз, что подтверждается данными *in vitro* и *in vivo* о том, что содержание метаболита Trp-Pro-Gly-Pro было значительно больше, чем His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly, как при внутривенном, так и при интраназальном введении. Однако основную долю среди метаболитов АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП составляют короткие пептиды и отдельные аминокислоты.

Изучение основных путей биodeградации и устойчивости проводилось с помощью хроматоспектрометрического анализа реакционных смесей АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП с лейцинаминопептидазой и карбоксипептидазой Y, действующих на N- и C-конец пептидной молекулы соответственно, а также ферментных систем назальной слизи, крови и плазмы крови. Показано, что под действием лейцинаминопептидазы происходит сначала образование Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro (к 90-й минуте), а затем Trp-Pro-Gly-Pro и Arg-Trp-Pro-Gly-Pro (к 180-й минуте), при этом Trp-Pro-Gly-Pro является наиболее устойчивым к действию аминопептидаз. В случае гидролиза АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП карбоксипептидазой Y от C-конца происходит отщепление только конечного пролина с образованием устойчивого к действию карбоксипептидаз пептида His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly [203, 264].

Установлено, что динамика гидролиза АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП в крови и плазме крови значительно отличается. Так, при инкубации пептида с ферментной системой крови через 30 минут оставалось 40% его исходного количества, через 60 минут – 12%, а через 120 минут – 0%. При этом в плазме крови динамика гидролиза АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП была следующая: 30 мин – 91%, 60 мин – 78%, 120 мин – 56%, а продуктами гидролиза являлись Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro и Trp-Pro-Gly-Pro, что

свидетельствует о важной роли аминопептидаз в биодеградации АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП [204, 265]. В назальной слизи через 30 минут содержание АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП составляло 52%, через 60 минут – 31%, через 90 минут – 14%, через 120 минут – 0% от введенного количества [204, 265].

Фаза активного перераспределения пептида между кровью и органами/тканями при внутривенном введении завершается примерно через 5 минут, а равновесие достигается через 30 минут и его распределение в различных органах отличается. Так, наибольшее содержание пептида отмечалось в почках и печени: 5–9 пмоль/г после внутривенного введения и 0,5–1,0 пмоль/г после интраназального. Наименьшее содержание пептида отмечалось в головном мозге: 0,05–0,1 пмоль/г при обоих способах введения. Соотношение содержания АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП в органах в порядке убывания может быть представлена в следующем виде: почки > печень > легкие > сердце > мозг [204, 265]. Показано, что содержание пептида в печени и почках было значительно выше, чем в крови, а в головном мозге наблюдалась обратная картина. Как при внутривенном введении, так и при интраназальном во всех органах (почки, печень, легкие, сердце) содержание АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП и его метаболитов постепенно уменьшается за исключением Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro. В головном мозге, в отличие от других органов, содержание пептида практически не зависит от способа введения и одним из основных продуктов гидролиза является His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly, что свидетельствует о важной роли мозговых карбоксипептидаз в биодеградации АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП [204, 265].

Основную роль в экскреции АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП играют почки. При внутривенном введении элиминация пептида характеризуется высоким значением общего клиренса (579 мл/мин×кг) и невысокими значением константы скорости выведения (0,012/мин), при интраназальном введении данные показатели были несколько ниже – 371 мл/мин×кг и 0,01/мин соответственно. Установлено, что время полувыведения АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП при внутривенном введении составляет 84,5 минуты и 71,4 минуты – при интраназальном [204, 265].



На основании вышеизложенного можно заключить, что особенности биодоступности АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП, пути его биodeградации, распределения и накопления в различных органах, и, особенно, его способность проникать через гематоэнцефалический барьер и накапливаться в головном мозге могут во многом способствовать его полифункциональности и плейотропности эффектов.

В настоящее время для АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП установлен широкий спектр биологических эффектов как при однократном, так и длительном введении при различных состояниях организма. Наиболее изученным является влияние пептида на функции нервной системы. В частности, исследованы его эффекты на супраспинальные и спинальные механизмы формирования болевой чувствительности. Так, в тесте «горячая пластина» установлено увеличение порога болевой чувствительности при введении АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в дозе 5 мкг/кг на 15-й и 45-й минутах эксперимента в 2,5 и 7 раз соответственно, а в дозе 150 мкг/кг – в 3,2 и 8,7 раз. При введении пептида в дозах 0,5 и 50 мкг/кг отмечалась тенденция к альгическому эффекту, а в дозах 1,5 и 450 мкг/кг пептид не оказывал влияние на болевую чувствительность [81, 248]. При исследовании влияния пептида на спинальные механизмы болевой чувствительности в тесте отдергивания хвоста (tail-flick) показано, что через 30 минут после введения пептида в дозе 150 мкг/кг приводило к повышению порога болевой чувствительности, а дозе 5 мкг/кг - показана тенденция к алгическому эффекту [81, 248].

Кроме того, установлено влияние однократного введения АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП на уровень тревожности у крыс: в тесте приподнятого крестообразного лабиринта интраназальное введение пептида в дозе 0,05 мг/кг за 15 минут до эксперимента приводило к увеличению в открытых рукавах времени нахождения крыс, числа заходов в них и свешиваний, тогда как введение пептида за 20 ч до эксперимента не приводило к значимому изменению поведения крыс [36]. Также установлено, что однократное внутрибрюшинное введение АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП может оказывать анксиогенное действие [16]. Так, в тесте конфликтной ситуации по Вогелю отмечалось снижение продолжительности питья при введении пептида в дозе

0,5 мкг/кг на 72%, 5 мкг/кг – на 62%, 50 мкг/кг – на 54%, 150 мкг/кг – на 75%, 450 мкг/кг – на 59% в сравнении с контрольной группой. Также отмечалось снижение числа наказуемых взятий воды и числа электрических шоков: в дозе 0,5 мкг/кг – в 6 и 3 раза соответственно, а в дозе 150 мкг/кг – в 1,5 раза. Следует отметить, что АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП при внутрибрюшинном введении не оказывал влияние на показатели тревожности в тесте приподнятого крестообразного лабиринта [56, 66, 103]. Однако в условиях острого иммобилизационного стресса отмечалось его анксиолитическое действие. Так, введение пептида в дозе 10 мкг/кг за 30 минут до стрессорного действия приводило к увеличению продолжительности нахождения крыс в открытых рукавах и уменьшению в закрытых рукавах, а также к снижению числа заходов в закрытые рукава [70].

Наряду с этим показано, что однократное внутрибрюшинное введение АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в дозе 450 мкг/кг оказывает антидепрессантное действие на крыс в тесте принудительного плавания по Порсолту, вызывая уменьшение времени иммобилизации и пассивного плавания, а также к увеличению продолжительности активного плавания. При этом введение АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в дозах 0,5-150 мкг/кг не изменяло поведение животных в данном тесте [247, 262].

Важным аспектом физиологической активности АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП является его положительное действие на процессы памяти и обучения. Так, при интраназальном введении пептида в дозе 0,05 мг/кг за 15 минут до обучения в тесте условной реакции пассивного избегания показало достоверное увеличение общего времени нахождения в светлой камере и снижение числа переходов в темный отсек при воспроизведении выработанного рефлекса [36]. Внутрибрюшинное введение пептида в дозах 0,5-150 мкг/кг увеличивало латентный период выхода в темную камеру, однако в дозе 450 мкг/кг данный эффект нивелировался [36].

На модели обучения и памяти с положительным подкреплением (Т-образный лабиринт) АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП стимулировал данные процессы. Интраназальное введение пептида в дозе 0,05 мг/кг за 15 минут до начала тестирования приводило к увеличению числа выполненных реакций, снижению

числа ошибок и латентного периода выхода из стартового отсека. Однако введение пептида за 20 ч до эксперимента не оказало значимого влияния на показатели обучения [36].

Отдельный интерес представляет изучение эффектов пептида в отличных от физиологических условиях, например, при стрессе. В условиях социального стресса внутрибрюшинное введение пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в дозе 100 мкг/кг/сут в течение 20 дней оказывало анксиолитическое действие на крыс Вистар в тесте ПКЛ. Кроме того, отмечалось снижение уровня эмоционального животных в виде снижения числа уринаций и фекальных болюсов [101, 240]. Также в условиях социального стресса пептид оказывает антидепрессантное действие, выявленное в тесте принудительного плавания в виде снижения времени иммобилизации и пассивного плавания на фоне увеличения продолжительности клайминга [8].

Нейротропные эффекты АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП также отмечены у крыс с аллоксан-индуцированным сахарным диабетом в виде анксиолитического и антидепрессантного действия соответственно в тестах открытого поля принудительного плавания [5].

В основе вышеуказанных нейротропных эффектов АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП может являться его влияние на уровни нейротрофинов в головном мозге. Известно, что введение пептида повышало экспрессию мозгового нейротрофического фактора (BDNF) у стрессированных животных с агрессивным типом поведения [78]. Также важную роль в реализации данных эффектов пептида может играть его взаимодействие с рецепторами нервной системы. В настоящее время исследованы межмолекулярные взаимодействия АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП на цитоплазматических мембранах головного мозга с использованием тритий-меченых лигандов различных подтипов дофаминовых, каннабиноидных и ваниллоидных рецепторов. С использованием [<sup>3</sup>H]дофамина показано, что АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП прямо конкурирует за сайты связывания различных типов дофаминовых рецепторов и изменяет их конформацию за счет взаимодействия с сайтами аллостерической модуляции. Кроме того, пептид увеличивал число специфических сайтов связывания агониста каннабиноидных рецепторов [<sup>3</sup>H]CP55,940 на плазматических

мембранах гиппокампа крыс, а также блокировал связывание [ $^3\text{H}$ ]капсаицина (2H) с высоко- и низкоаффинными сайтами ванилоидных рецепторов соответственно на 20% и 52%, а в присутствии синтетического агониста каннабиноидных рецепторов CP55940 специфическое связывание составляло около 85% в обоих сайтах [103, 266]. Также показано, что введение АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП снижало связывание [ $^3\text{H}$ ]ГАМК на мембранах клеток гиппокампа в условиях острого иммобилизационного стресса [269].

Наряду с влиянием на функции нервной системы для АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП установлены и иммуностропные эффекты. В условиях социального стресса пептид корригировал стресс-индуцированные нарушения клеточного и гуморального звеньев иммунитета в виде повышения индекса реакции гиперчувствительности замедленного типа, увеличения образования антител и восстановления фагоцитарной активности [6].

Кроме того, имеются экспериментальные данные о влиянии АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП на состояние гемостаза. Интраназальное введение пептида в дозе 1 мкг/кг в течение 7 суток вызывало повышение антиагрегантной и антикоагулянтной активности, которое сохранялось через 20 и 168 ч после последнего введения. Также установлено снижение индекса агрегации тромбоцитов на 27-36% [43], удлинение времени реакции (первая фаза коагуляции), увеличение времени образования сгустка (вторая фаза), снижение максимальной амплитуды (третья фаза) и константы синерезиса, увеличение тотальной константы свертывания крови, а также уменьшение общего индекса коагуляции [197, 259, 261]. Кроме того, отмечалось повышение АЧТВ и повышение фибринолитической активности плазмы крови крыс в виде увеличения суммарной, ферментативной и неферментативной фибринолитической активности крови [259, 260]. Также была проведена оценка эффектов АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП на показатели гемостаза на модели гиперхолестеринемии, вызванной высококалорийной диетой. Установлено, что интраназальное применение пептида в дозе 500 мкг/кг в течение 7 суток приводило к повышению противосвертывающей активности, снижению агрегации тромбоцитов и повышению фибринолитической активности (за счет как

ферментативного, так и неферментативного компонентов) [226]. Данные эффекты авторы связывают с наличием аминокислоты аргинина в составе пептидной молекулы. Подтверждением данному предположению может являться тот факт, что аналогичные пептиды, содержащие аргинин, показали сходные АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП эффекты в сравнении с глипролином Pro-Gly-Pro [259, 260].

В условиях метаболического синдрома АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП проявляет гипохолестериемический и гипогликемический эффекты [161, 256]. Так, у животных с метаболическим синдромом, получавших пептид, снижались уровни общего холестерина, липопротеинов низкой плотности, триглицеридов и глюкозы крови на протяжении эксперимента и отмечено увеличение выраженности эффектов через 7 суток после окончания введения АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП. Также у животных с метаболическим синдромом отмечалось замедление прироста массы тела и даже ее снижение на фоне применения пептида [161, 256].

С использованием культуры нейроглиальных клеток, полученных из коры головного мозга крысят Вистар, показан нейропротекторный потенциал пептида. В условиях глутаматной эксайтотоксичности, вызванной введением 100 мкМ глутамина в культуру клеток, АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП в концентрациях 10 и 30 мкМ увеличивал выживаемость клеток на 32-34%. Кроме того, установлено увеличение числа клеток, восстанавливающих кальциевый гомеостаз, на 56-80% при введении пептида в аналогичных концентрациях. В данных культурах отсроченная кальциевая дисрегуляция и синхронная митохондриальная деполяризация наступали позже, чем в клетках, обработанных только глутаматом [216]. Цитопротекторный эффект пептида показан и в экспериментах на клетках нейробластомы SH-SY5Y при моделировании окислительного стресса [100], а также в условиях информационного стресса при внутрибрюшинном введении дозе 100 мкг/кг/сут крысам-самцам Вистар [4].

Цитопротективное действие АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП может быть обусловлено модуляцией им генов NF-κB-сигнального пути, стимуляцией пролиферативного NRF2-пути, активацией PLC/ПКC/Ras/МЕК-сигнального пути и угнетением апоптоза. Показано, что пептид в культуре клеток SH-SY5Y стимулировал

экспрессию протеинкиназы P38, нескольких компонентов Nrf2-пути и усиливал экспрессию p38 в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Также показано усиление экспрессии протеинкиназы C, NQO1 и HO-1, что также свидетельствует об участии Nrf2-пути в реализации эффектов пептида. Кроме того, при добавлении пептида в культуру клеток в присутствии перекиси водорода происходило восстановление уровней экспрессии p53 и pp5 до контрольного уровня, увеличение экспрессии гена глутаматцистеинлигазы и снижение экспрессии Ki-67 [100].

Изменение экспрессии некоторых генов в гиппокампе крыс установлено при введении АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП в условиях острого стресса за 30 минут до эксперимента. Так, через 6 ч после введения пептида усиливалась экспрессия генов белков рибосом (*Rpl9*, *Rps18* и др.), изменялась экспрессия генов, кодирующих компоненты ферментативных (*Cox7a2*, *Ntmt1*, и др.) и транспортных (*Atp5l*, *Atpbar1* и др.) систем клеток гиппокампа. Также отмечалось ослабление экспрессии генов, отвечающих за протеолиз (*Cul4b*, *Ube2l6* и др.) [66, 257].

Таким образом, пептид АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП при различных способах и продолжительности введения обладает широким спектром биологических эффектов при различных состояниях организма, оказывая существенное влияние на состояние регуляторных систем. Поэтому, с учетом особенностей механизмов реализации стрессорной реакции, представляется актуальным и теоретически обоснованным изучение влияния АСТН<sub>6-9</sub>-ПП на состояние функций нервной системы и микробиоты толстой кишки в условиях хронического стресса.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на базе кафедры патофизиологии, кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, научно-исследовательского института общей патологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России и бактериологической лаборатории с молекулярно-генетическим анализом ОБУЗ «Курский онкологический научно-клинический центр им. Г.Е. Островерхова».

С целью оценки состояния функций нервной системы, пристеночной микробиоты толстой кишки, морфофункционального состояния ободочной кишки, состояния иммунной системы и уровня окислительного стресса в условиях хронического стресса и при применении АКТГ<sub>6,9</sub>-ППП был выполнен комплекс исследований, включающий в себя:

1) исследование уровня тревожности экспериментальных животных в тесте приподнятого крестообразного лабиринта, исследование ориентировочно-исследовательской и локомоторной активностей, эмоциональности и эпизодов груминга в тесте открытого поля, исследование уровня депрессии у крыс в тесте принудительного плавания,

4) изучение пристеночной микробиоты толстой кишки,

5) оценка гистологических и морфометрических показателей ободочной кишки,

6) определение уровней про- и противовоспалительных цитокинов, маркеров свободно-радикального окисления и кортикостерона в сыворотке крови.

### 2.1. Экспериментальные животные

В опыте были использованы 55 крыс-самцов Вистар массой 280–300 г, полученных из SPF-вивария Института цитологии и генетики СО РАН и прошедших 14-дневный карантин в экспериментально-биологической клинике

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России. В помещении, где содержали животных, поддерживали температуру воздуха  $22 \pm 2$  °С, влажность  $60 \pm 5\%$  и 12-часовой режим (свет с 8:00 до 20:00). Животные были обеспечены кормом и водой *ad libitum* [60, 268, 294].

Экспериментальные животных были разделены на 5 групп ( $n = 11$ ): 1– нестрессированные животные, которым вводили 0,9% раствор натрия хлорида (контроль), 2 – животные, подвергавшиеся хронической иммобилизационному стрессу, которым вводили изотонический раствор натрия хлорида (ХИС), 3–5 – крысы, подвергнутые ХИС, которым вводили АКТГ<sub>6-9</sub>–ППП в дозах 5, 50 и 500 мкг/кг (ХИС+5, ХИС+50, ХИС+500) [60, 268, 294].

Все эксперименты были проведены в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г., и были одобрены этическим комитетом Курского государственного медицинского университета (протокол № 3 от 16 ноября 2020 г.).

## 2.2. Препарат

В исследовании использовали N-концевой аналог АКТГ, АКТГ<sub>6-9</sub>–ППП (His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro), синтезированный в Институте молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт».

АКТГ<sub>6-9</sub>–ППП растворяли в 0,9% растворе натрия хлорида и вводили внутривенно в дозах 5, 50 и 500 мкг/кг ежедневно за 12–15 мин. до начала каждого стрессорного воздействия в объеме из расчета 1 мл на 1 кг массы тела. Контрольные нестрессированные и контрольные стрессированные животные ежедневно получали эквивалентные объемы изотонического раствора натрия хлорида.



Использованные в эксперименте дозы пептида и протокол введения были выбраны в соответствии с имеющимися литературными данными об их эффективности [61, 81, 205].

### **2.3. Хронический иммобилизационный стресс**

Для моделирования ХИС использовали модификации методик Н. Chen et al., J. Zheng et al. и S.W. Wang: крыс помещали в тесные прозрачные пластиковые вентилируемые пеналы, размер которых подбирали индивидуально для каждого животного и фиксировали в положении лежа на спине [122]. Амплитуду дыхательных движений контролировали визуально. Стрессорное воздействие проводили ежедневно в течение 2 ч (с 11:00 до 13:00 ч) на протяжении 14 дней.

### **2.4. Исследование функций нервной системы**

#### **2.4.1. Методика изучения уровня тревожности в приподнятом крестообразном лабиринте**

Приподнятый крестообразный лабиринт состоит из 2 открытых, 2 закрытых рукавов длиной 50 см и шириной 15 см, центральной площадки 15×15 см и приподнят на 50 см над уровнем пола. Освещение в закрытых, открытых рукавах и центре составляло 45, 300 и 240 лк, соответственно. Для поддержания единого феромонового фона для все экспериментальных животных перед проведением исследования в установку помещали нулевое животное и оставляли его свободно перемещаться в течение 5 мин. Затем исследуемое животное помещали на центральную площадку лабиринта мордочкой в сторону одного из открытых рукавов и оставляли в течение 5 минут, в течение которых поведение в лабиринте фиксировалось на цифровую видеокамеру (рисунок 2) [175, 244, 252, 288].

Поведение животных анализировали с помощью программного обеспечения SMART 3.0 (PanLab Harvard Apparatus, Испания). При этом оценивали время, проведенное в открытых и закрытых рукавах, центральной площадке и число свешиваний.



Рисунок 2 – Экспериментальное животное в тесте ПКЛ

#### **2.4.2. Методика изучения ориентировочно-исследовательской и локомоторной активностей, эмоциональности и груминга в тесте открытого поля**

Установка «открытое поле» состоит из квадратной площадки серого цвета размером 90×90 см и стенок высотой 40 см. Освещение в помещении, где проводилось исследование, составляло 30 лк. Поле визуально разделялось на 16 равных квадратов: 12 периферических и 4 центральных (рисунок 3). Для поддержания единого феромонового фона для всех экспериментальных животных перед проведением исследования в поле помещали нулевое животное и оставляли его свободно перемещаться в течение 5 мин [131, 288]. Затем исследуемую крысу

плавно помещали в правый нижний угол установки и регистрировали ее поведение в течение 5 минут с помощью цифровой видеокамеры (рисунок 4). После каждого животного установку протирали антисептическим раствором, дезодорировали дистиллированной водой и давали ей полностью высохнуть. Поведение животных анализировали с помощью программного обеспечения SMART 3.0 (PanLab Harvard Apparatus, Испания). При этом оценивали двигательную, исследовательскую (горизонтальную) и локомоторную активность, эмоциональность и короткий груминг. Двигательную и исследовательскую активность определяли по числу пересеченных квадратов. Пересечением границы считали тот момент, когда животное находилось четырьмя лапами в одном квадрате. Эмоциональность оценивали по числу фекальных болюсов и актов уринации, локомоторную активность – по пройденной дистанции в центральных и периферических квадратах, а также общей пройденной дистанции. За короткий груминг принимали 1-2 быстрых круговых движений передних лап вокруг носа или глаз. Также регистрировали время нахождения животных в центральных и периферических квадратах [244, 282].

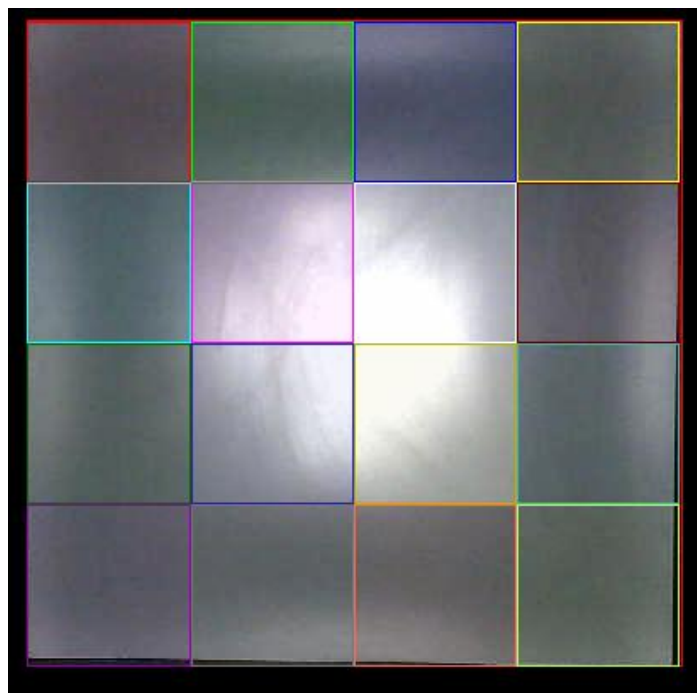


Рисунок 3 – Деление открытого поля на квадраты

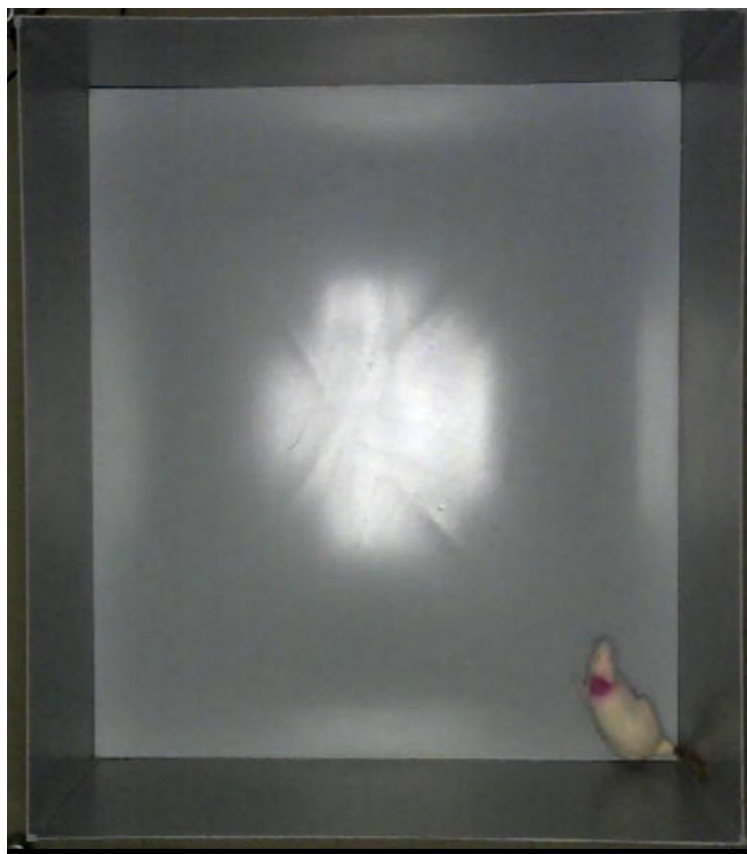


Рисунок 4 – Экспериментальное животное в тесте открытого поля

### **2.4.3. Методика изучения уровня депрессивного поведения в тесте принудительного плавания**

Тест принудительного плавания выполняли с использованием цилиндров высотой 40 см и диаметром 20 см, выполненных из органического стекла, которые заполняли водой  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  на 30 см.

Исследование проводили в течение двух дней. В первый день испытуемых животных помещали в воду на 15 минут с целью их адаптации к условиям эксперимента. Регистрацию показателей в первый день не проводили. Через 24 ч животных помещали в воду на 5 мин, в течение которых их поведение фиксировали на цифровую видеокамеру (рисунок 5). Одновременно производили видеофиксацию поведения 2 или 3 животных. По истечении времени эксперимента крыс помещали в сухую клетку и обсушивали теплым воздухом [60, 70, 166, 288].

Анализ поведения испытуемых проводили с помощью программного обеспечения SMART 3.0 (Panlab Harvard Apparatus, Испания) и оценивали такие показатели как общее время иммобилизации (фризинга), число иммобилизаций, среднее время иммобилизации (общее время иммобилизации/число иммобилизаций), время активного плавания (клайминга).



Рисунок 5 – Экспериментальные животные в тесте принудительного плавания

## 2.5. Выведение животных и забор биологического материала

Через 24 ч после заключительного стрессорного воздействия проводили эвтаназию животных путем забора крови из правого желудочка сердца после двусторонней парастеральной торакотомии под эфирным наркозом с помощью вакуумной системы S-Monovette® с прокоагулянтом (SARSTEDT, Германия). Проводили забор 7,0–7,5 мл крови для последующих исследований. Положение иглы вакуумной системы оценивали визуально. Собранную кровь центрифугировали при 1500 g в течение 15 мин. Полученную сыворотку аликвотировали по 200 мкл в индивидуальные чистые микропробирки и замораживали при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , затем хранили при  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Перед анализом аликвоты размораживали при комнатной температуре в течение 4 ч.

## 2.6. Исследование пристеночной микробиоты

Для качественной и количественной оценки микробиоты слизистой оболочки использовали метод Кафарской Л.И. и Коршунова В.М. [25]. Непосредственно после обескровливания среднюю часть ободочной кишки крысы выделяли, промывали стерильным физиологическим раствором для удаления ее содержимого и взвешивали в асептических условиях. Затем аутопаты гомогенизировали в стерильном фосфатном буфере (рН = 7,0) с помощью гомогенизатора Поттера (DELTALAB, Испания) в отношении 1:10 (ткань/буфер). С целью разжижения кишечного муцина и экстракции пристеночной микробиоты гомогенаты инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Далее приготавливали их разведения в концентрациях  $10^{-2}$ - $10^{-4}$  и в объеме 0,1 мл каждого разведения засеивали газоном на микробиологические питательные среды (Эндо, SSA, стрептококковый агар, висмут-сульфитный агар, желточно-солевой агар, агар для выделения синегнойной палочки (ЦПХ-агар), кровяной агар, среда Сабуро, агар Манн, Рогоза, Шарп (MRS) и бифидо-агар) и инкубировали при 37°C в течение 24 ч [60, 267].

С целью идентификации выращенных микроорганизмов выполняли матрично-активированную лазерную с времяпролетным разделением масс-спектрометрию (MALDI-ToF) на аппарате Maldi Biotyper Microflex (Bruker, США).

Количественную оценку париетальной микробиоты толстой кишки крыс проводили на основании удельного содержания идентифицированных микроорганизмов в 1 г аутоптата кишки. Рассчитывали на основе числа выросших колониеобразующих единиц (КОЕ) на чашке Петри с наибольшим разведением, где наблюдалось более 10 колоний, которое рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{КОЕ} = \frac{E}{k \times v \times n},$$

где  $E$  – общее количество микроорганизмов,  $k$  – объем посеянного материала,  $v$  – количество чашек Петри, на которое производили посев материала,  $n$  – разведение гомогената кишки. Полученные результаты выражали в виде  $\lg\text{КОЕ/г}$  ткани.

Для вычисления частоты встречаемости (ЧВ) отдельного микроорганизма или рода бактерий использовали формулу:

$$\text{ЧВ} = \frac{n_i \times 100}{N},$$

где  $n_i$  – число животных, у которых идентифицировали  $i$ -й микроорганизм/род бактерий,  $N$  – число животных в экспериментальной группе.

Для исследования доли каждого микроорганизма в составе мукозальной микробиоты рассчитывали его относительное среднее по представленной ниже формуле:

$$\text{ОСр} = \frac{A\text{Ср}_i \times 100}{N},$$

где  $A\text{Ср}_i$  – абсолютное среднее для  $i$ -го микроорганизма в группе,  $N$  – сумма абсолютных средних всех идентифицированных микроорганизмов в группе.

## **2.7. Морфологическое исследование ободочной кишки**

Для морфометрического и гистологического исследования выделяли ободочную кишку крыс, иссекали ее среднюю треть и фиксировали в 10% растворе забуференного нейтрального формалина. Далее аутопаты подвергали стандартной гистологической проводке с получением парафиновых срезов толщиной 5–7 мкм и последующей их окраской гематоксилином и эозином. Для

выявления и оценки морфофункциональных изменений бокаловидных и тучных клеток срезы окрашивали реактивом Шиффа с доокраской альциановым синим.

Морфологическое исследование гистологических препаратов ободочной кишки выполняли на микроскопе Nikon Eclipse Ci (Nikon, Япония) со штатной цифровой камерой. Также проводили оцифровывание препаратов с помощью слайдсканера NanoZoomer-SQ (Hamamatsu Photonics, Япония) с использованием программного обеспечения NDP.view.2 (Hamamatsu Photonics, Япония). Полученные микрофотографии изучали в программе ImageJ v.1.53i (National Institutes of Health, США, <https://imagej.nih.gov/>), в которой рассчитывали высоту крипт (инструменты «Straight line» и «Analyze – Measure») и число бокаловидных клеток (инструмент «Multi-point»). В дальнейшем рассчитывали относительное количество клеток воспалительного инфильтрата (нейтрофилов, лимфоцитов, плазматических клеток, макрофагов), а также тучных клеток, которое выражали в процентах. Подсчет клеток проводили на 100 клеток в 10 полях зрения при увеличении  $\times 400$ , что соответствовало площади  $502 \text{ мкм}^2$ , (для достоверной идентификации карио-цитологических признаков) по 5 срезам исследуемого аутопсийного материала [1].

## **2.8. Определение уровней цитокинов, маркеров свободно-радикального окисления и кортикостерона в сыворотке крови**

Перед анализом аликвоты сыворотки размораживали при комнатной температуре в течение 4 ч, повторное замораживание не допускалось.

Количественное определение уровней ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИФН $\gamma$ , MCP-1, ИЛ-10, ИЛ-8 в сыворотке крови проводили с помощью иммуноферментного анализа с использованием наборов ELISA Kits: Rat IL-1 beta ELIS Kit BMS630, Rat IL-6 ELIS Kit BMS625, Rat IFN gamma ELIS Kit BMS621, Rat MCP-1 Instant ELIS Kit BMS630, Rat IL-10 ELIS Kit BMS629 (Invitrogen, Австрия), Enzyme-Linked



Immunosorbent Assay (ELISA) Kit For Interleukin 8 (IL8) SEA080Ra (Cloud-Clone Corp., США)

Содержание 8-оксо-2'-дезоксигуанозина (8-OHdG) и экстрацеллюлярной супероксиддисмутазы (СОД3) исследовали методом иммуноферментного анализа с использованием наборов DNA/RNA Oxidative Damage (High Sensitivity) ELISA Kit (589320, Cayman Chemical, США) и ELISA Kit For Superoxide Dismutase 3, Extracellular (SEA117Ra, Cloud-Clone Corp., США).

Продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-ПП), определяли флуориметрическим методом с помощью набора TBARS (TCA Method) Assay Kit (700870, Cayman Chemical, США).

Для оценки выраженности стресс-реакции определяли содержание кортикостерона в сыворотке крови иммуноферментным методом с использованием набора Corticosterone ELISA kit (ADI-900-097, Enzo Life Sciences, США).

Все исследования проводили в соответствии с протоколами производителей. Абсорбцию и флуоресценцию регистрировали и анализировали с помощью многофункционального планшетного анализатора Varioskan Flash® (Thermo Fisher Scientific, США) и программного обеспечения SkanIt® (Thermo Fisher Scientific, США).

## **2.9. Статистическая обработка данных**

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием языка программирования R v.4.1.0 в интегрированной среде разработки RStudio Desktop v. 1.4.1717 (RStudio, PBC, США, <https://www.rstudio.com>). Для подтверждения гипотезы о нормальности распределения применяли критерий Шапиро–Уилка, для подтверждения гипотезы о равенстве дисперсий — критерий Левене. В случае подтверждения гипотез для сравнения двух групп использовали t-критерий Стьюдента с поправкой Уэлча, для

четырёх групп — однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с апостериорным тестом Ньюмана–Кейлса. При их отклонении применяли U-критерий Манна–Уитни для двух групп, критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна — для четырёх групп. Для оценки частот использовался точный критерий Фишера. Количественные данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего ( $M \pm m$ ) или медианы, первого и третьего квартилей ( $Me[1Q; 3Q]$ ). Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Состояние функций нервной системы крыс при применении АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП в условиях хронического иммобилизационного стресса

В настоящее время установлен целый ряд нейротропных эффектов АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП у экспериментальных животных, не подвергавшихся стрессорному воздействию. Так, пептид оказывал анксиолитическое, антидепрессантное и анальгетическое действие, улучшать консолидацию памятного следа [61, 85, 111, 290]. Данные результаты свидетельствуют о высокой нейротропной активности пептида и позволяют предполагать сохранение его влияния в случае изменения функционального состояния нервной системы.

При этом эффекты АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП в условиях стресса, в частности, на состояние нервной системы, оставались неизученными. Поэтому нами было выполнено исследование уровня тревожности, ориентировочно-исследовательской и локомоторной активностей, эмоциональности и груминга, а также уровня депрессии у экспериментальных животных на фоне введения пептида в условиях хронического иммобилизационного стресса.

Изучение уровня тревожности у экспериментальных животных при применении АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП в условиях ХИС проводили в тесте приподнятого крестообразного лабиринта. ХИС приводил к повышению уровня тревожности у подопытных животных, которое выражалось в достоверном снижении времени, проведенного в открытых рукавах ПКЛ (в 2,6 раза,  $p < 0,01$ ), и увеличению времени в закрытых рукавах ПКЛ (на 12%,  $p < 0,05$ ) по сравнению с нестрессированными животными (таблица 1). При этом достоверных отличий в медианных значениях времени на центральной площадке ПКЛ, числе актов поворота, вытягиваний, вертикальных стоек и свешиваний с открытых рукавов ПКЛ не отмечалось ( $p > 0,05$ ) [2, 69].

Введение пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в дозе 5 мкг/кг не приводило к значимым изменениям в поведении животных в тесте ПКЛ по сравнению со стрессированными животными, которым вводили изотонический раствор натрия хлорида. При этом отмечено некоторое снижение времени, проведенного в открытых и закрытых рукавах ПКЛ, снижение числа поворотов и свешиваний, а также увеличение числа вытягиваний и вертикальных стоек ( $p > 0,05$ ) [2, 69].

Установлено, что внутрибрюшинное ведение АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в дозе 50 мкг/кг приводило к значимому увеличению времени в открытых рукавах ПКЛ по сравнению с контрольными нестрессированными животными (в 2,9 раза,  $p < 0,01$ ), уменьшению времени в закрытых рукавах (в 1,3 раза,  $p < 0,05$ ). При этом увеличение времени на центральной площадке ПКЛ и числа вертикальных стоек имело недостоверный характер [3, 71].

Увеличение дозы АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП до 500 мкг/кг приводило к снижению времени в открытых рукавах и на центральной площадке ПКЛ, увеличению времени в закрытых рукавах, а также уменьшению числа поворотов, вытягиваний, стоек и свешиваний. Однако вышеперечисленные изменения значимо не отличались от аналогичных показателей стрессированных крыс, которым вводили изотонический раствор натрия хлорида ( $p > 0,05$ ) [3, 71].

Оценку ориентировочно-исследовательской и локомоторной активностей, эмоциональности и груминга у крыс при применении АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в условиях ХИС проводили в тесте открытого поля. Стрессорное воздействие на крыс Вистар в течение 14 дней приводило к увеличению пройденной дистанции в центре открытого поля (в 2,9 раза,  $p < 0,05$ ) (таблица 2). При этом изменения пройденной дистанции на периферии и общей дистанции не достигали достоверных различий. Кроме того, ХИС приводил к значимому увеличению времени нахождения как в центре открытого поля (в 3,5 раза,  $p < 0,05$ ), и уменьшению времени на периферии (на 2,3%,  $p < 0,05$ ). Также необходимо отметить увеличение эмоционального состояния у животных, повергнутых ХИС: отмечалось увеличение числа оставленных фекальных болюсов и числа актов короткого груминга (в 2 раза,  $p < 0,05$ ) [71].

Таблица 1 – Результаты оценки поведения экспериментальных животных в тесте приподнятого крестообразного лабиринта в условиях ХИС и при применении АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП (Ме[1Q, 3Q])

Показатель	Группа				
	Контроль (n = 11)	ХИС (n = 11)	ХИС+5 (n = 11)	ХИС+50 (n = 11)	ХИС+500 (n = 11)
Время в открытых рукавах, с	40,32 [10,36; 50,76]	15,75×× [2,25; 28,9]	13,9 [1,6; 22,38]	45,84** [15,92; 57,76]	11,3 [2,56; 27,06]
Время в закрытых рукавах, с	218,6 [157,88; 242,06]	244,9× [204,88; 273,165]	236,13 [154,33; 242,44]	189,48* [100; 220,93]	255,7 [181,48; 279,7]
Время на центральной площадке, с	39,48 [0,2; 61,62]	30,93 [7,15; 47,92]	30,93 [7,15; 47,92]	62,98 [21,57; 82,46]	21,4 [10,44; 50,16]
Повороты, шт.	8 [4; 11]	8 [4; 9]	7 [2; 12]	8 [4; 9,5]	4 [0 ;8]
Вытягивания, шт.	6 [1; 7]	5 [1; 7]	9 [0; 10]	5 [3; 7]	4 [0 ;5]
Стойки, шт.	2 [0; 13,5]	6 [1; 8]	7 [0; 7,5]	12 [0 ;16]	4 [0 ;9,5]
Свешивания, шт.	4 [0; 5]	7 [2; 9]	3 [0; 6]	7 [1 ;9]	4 [0 ;5,5]
Примечание – × – $p < 0,05$ , ×× – $p < 0,01$ , по сравнению с группой «Контроль» (по U-критерию Манна–Уитни), * – $p < 0,05$ , ** – $p < 0,01$ , по сравнению с группой «ХИС» (по критерию Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна).					

Применение пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП во всех использованных дозах не оказывало значимого влияния на вертикальную, горизонтальную и ориентировочно-исследовательскую активность [71].

При этом отмечалось снижение эмоциональности после введения пептида в дозе 50 мкг/кг: в открытом поле показано снижение числа болюсов (в 4 раза,  $p < 0,01$ ) и числа актов короткого груминга (в 2 раза,  $p < 0,01$ ). Учитывая тот факт, что уровень эмоциональности животных отражает уровень их тревожности, данные результаты согласуются с вышеописанными в тесте приподнятого крестообразного лабиринта и свидетельствуют об анксиолитическом эффекте АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в дозе 50 мкг/кг [3, 71].

Таблица 2 – Результаты оценки поведения экспериментальных животных в тесте открытого поля в условиях ХИС и при применении АКТГ<sub>6,9</sub>-ППП (Ме[1Q; 3Q])

Показатель	Группа				
	Контроль (n = 11)	ХИС (n = 11)	ХИС+5 (n = 11)	ХИС+50 (n = 11)	ХИС+500 (n = 11)
Дистанция на периферии, см	555,98 [210,72; 802,88]	770,26 [164,33; 969,49]	689,31 [0; 900,68]	730,56 [44,53; 1051,25]	334,58 [0; 812,24]
Дистанция в центре, см	20,04 [11,25; 39,55]	59,82× [14,18; 89,64]	44,61 [17,64; 92,83]	60,23 [18,15; 100,05]	38,95 [16,81; 89,23]
Общая дистанция, см	621,27 [232,83; 839,5]	799,27 [196,64; 1077,17]	708,76 [136,69; 985,07]	797,51 [220,65; 1136,81]	460,04 [88,91; 851,395]
Число пересеченных центральных квадратов.	0 [0; 1]	1 [0; 2]	1 [0; 1,5]	1 [0; 2]	0 [0; 1]
Число пересеченных периферических квадратов	1 [1; 2]	2 [1; 3]	1 [0; 2,5]	2 [1; 3]	1 [0; 2]
Время на периферии, с	297,47 [287,33; 297,84]	290,13× [191,2; 296,42]	292,62 [283,03; 296,8]	291,93 [227,1; 294,18]	293 [222,37; 295,5]
Время в центре, с	2,57 [0,93; 4,55]	9× [2; 12,1]	7,87 [1,2; 13,79]	6,93 [2,43; 17,35]	7,03 [2,87; 61,17]
Число фекальных болюсов	2 [0; 4,5]	4 [3; 6]×	3 [1; 4]	1 [0; 3,5]**	6 [2; 8]
Число уринаций,	1 [0; 1,5]	1 [0; 2]	0 [0; 1]	1 [0; 2]	1 [0; 1]

## Продолжение таблицы 2

Число актов короткого грумминга	2 [0; 2,5]	4 [2; 5] <sup>××</sup>	5 [3; 6]	2 [1; 3] <sup>**</sup>	6 [1; 6.5]
Примечание – × – $p < 0,05$ , ×× – $p < 0,01$ по сравнению с группой «Контроль» (по U-критерию Манна–Уитни), * – $p < 0,05$ , ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой «ХИС» (по критерию Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна).					

Уровень депрессии у животных при применении АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП в условиях ХИС оценивали в тесте принудительного плавания. Показано, что ХИС способствует увеличению времени иммобилизации (в 2,1 раза,  $p < 0,05$ ), а также средней продолжительности фризинга (в 1,6 раза,  $p < 0,05$ ) (таблица 3). При этом изменения числа актов иммобилизации, латентного периода первой иммобилизации и частоты иммобилизации не достигали достоверно значимых различий. Таким образом, 2-недельное стрессорное воздействие приводило к развитию у животных депрессивного поведения [22, 71].

Пептид в дозе 5 мкг/кг приводил к значимому снижению общей длительности иммобилизации (в 2,8 раза,  $p < 0,05$ ) и средней продолжительности иммобилизации (в 1,8 раза,  $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольными стрессированными животными. Также отмечалось достоверно незначимое снижение числа иммобилизаций (на 33,3%,  $p > 0,05$ ), частоты иммобилизации (на 32,9%,  $p > 0,05$ ) и повышения латентного периода первой иммобилизации (на 27,5%,  $p > 0,05$ ) [22, 71].

Введение пептида в дозе 50 мкг/кг не приводило к значимым изменениям поведения животных в тесте принудительного плавания и их медианные значения существенно не отличались от таковых у стрессированных животных, которым вводили изотонический раствор натрия хлорида [22, 71].

АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП в максимальной используемой в эксперименте дозе 500 мкг/кг приводил к снижению общего времени фризинга (в 2 раза,  $p < 0,05$ ) и средней продолжительности иммобилизаций (на 28,2%,  $p < 0,05$ ) в сравнении со

стрессированными животными, которым вводили изотонический раствор натрия хлорида [22, 71].

Таким образом, пептид АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в дозах 5 и 50 мкг/кг в условиях ХИС оказывал анксиолитическое (уменьшения уровней тревожности и эмоциональности) и антидепрессантное действие. При этом пептид не оказывал существенного влияния на вертикальную, горизонтальную и ориентировочно-исследовательскую активность

Таблица 3 – Результаты оценки поведения экспериментальных животных в тесте принудительного плавания в условиях ХИС и при применении АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП (Me[1Q, 3Q])

Показатель	Группа				
	Контроль (n = 11)	ХИС (n = 11)	ХИС+5 (n = 11)	ХИС+50 (n = 11)	ХИС+500 (n = 11)
Длительность иммобилизации, с	33,03 [0; 61,8]	68,47× [24,33; 83,37]	24,23* [1,23; 45,285]	60,7 [1,17; 80,035]	32,97* [0; 47,97]
Число иммобилизаций, шт.	15 [0; 25]	23 [4; 26]	16 [1; 24]	21 [1; 28]	17 [0; 18,5]
Средняя длительность иммобилизации, с	1,78 [0; 2,67]	2,84× [1,81; 5,79]	1,61* [1,23; 1,91]	2,17 [1,17; 2,87]	2,04* [0; 2,56]
Латентный период первой иммобилизации, с	116,03 [64,97; 125,22]	96,87 [0; 104,07]	123,53 [0; 172,45]	85,53 [1,2; 121,75]	110,87 [0; 159,13]
Частота иммобилизации, шт./мин	3,61 [0; 5,99]	5,4 [0,46; 5,67]	3,62 [0,24; 5,37]	4,13 [0; 4,38]	5 [0,24; 6,64]
Примечание: × – $p < 0,05$ , ×× – $p < 0,01$ по сравнению с группой «Контроль» (по U-критерию Манна–Уитни), * – $p < 0,05$ , ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой «ХИС» (по критерию Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна).					



### 3.2. Состояние микробиоты толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса и применении АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП

В ранее выполненных исследованиях сотрудников КГМУ было изучено состояние микробиоты толстой кишки крыс в условиях модели хронического иммобилизационного стресса, аналогичной использованной в нашей работе. При этом был установлен ряд изменений состава пристеночной микробиоты [57, 58], а также показана коррекция стрессиндуцированных сдвигов в составе микробиоты путем использования синтетического аналога N-концевого фрагмента семакса (АКТГ<sub>4-7</sub>-ПГП) [32, 102], имеющего структурные и функциональные сходства с использованным нами АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП. Данные результаты обусловили необходимость выполнения дальнейших исследований в данном направлении, в том числе с учетом более высокой нейротропной активности АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП [61].

В результате выполненных исследований установлено, что ХИС оказывал выраженное влияние на состав пристеночной микробиоты и способствовал снижению числа облигатных микроорганизмов (рисунок б): *Lactobacillus* spp. в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ), *Bifidobacterium* spp. – в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ), *Escherichia coli* с нормальной ферментативной активностью – в 1,6 раза ( $p < 0,01$ ), а также *E. coli* со сниженной ферментативной активностью в 2,7 раза ( $p < 0,01$ ) и *Enterococcus* spp. – в 2,3 раза ( $p < 0,01$ ). При этом установлено увеличение числа *Proteus* spp. в 2,7 раза ( $p < 0,05$ ), *Klebsiella* spp. – в 2,9 раза ( $p < 0,01$ ), коагулазоотрицательных бактерий рода *Staphylococcus* – в 1,4 раза ( $p < 0,01$ ) и *Candida* spp. – в 1,96 раза ( $p < 0,05$ ). Кроме того, в условиях стресса в составе микробиоценоза муцинового слоя появились такие представители как энтеробактеры, цитробактеры, морганеллы, ацинетобактеры и золотистый стафилококк, которые не наблюдались у контрольных нестрессированных животных [13, 71, 308].

Введение АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП в дозе 5 мкг/кг приводило к значимому повышению числа лактобактерий в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ) и *E. coli* со сниженной ферментативной активностью в 2,4 раза ( $p < 0,05$ ) при снижении числа энтеробактерий в 3,1 раза ( $p < 0,05$ ), цитробактеров – в 3,3 раза ( $p < 0,05$ ), протеев – в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ),

морганелл – в 3 раза ( $p < 0,05$ ), *S. aureus* – в 3,3 раза ( $p < 0,05$ ) и грибов рода *Candida* – в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению со стрессированными животными, получавшими изотопический раствор натрия хлорида [13, 71].

У животных, которым вводили АКТГ<sub>6-9</sub>–ПГП в дозе 50 мкг/кг, установлено значимое увеличение числа бактерий рода *Bifidobacterium* в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ) и уменьшение числа *Citrobacter* spp. в 4,2 раза ( $p < 0,05$ ), *Proteus* spp. – в 3,6 раза ( $p < 0,01$ ), *Morganella* spp. – в 2,9 раза ( $p < 0,05$ ), *S. aureus* – в 3,9 раза ( $p < 0,05$ ) при отсутствии представителей рода *Acinetobacter* ( $p < 0,05$ ) [13, 71].

На фоне внутрибрюшинного введения АКТГ<sub>6-9</sub>–ПГП в дозе 500 мкг/кг наблюдалось увеличение числа облигатных микроорганизмов: лактобактерий – в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ), бифидобактерий – в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ) и *E. coli* с нормальной ферментативной активностью в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ). Также отмечалось увеличение числа *E. coli* со сниженной ферментативной активностью в 2,5 раза ( $p < 0,05$ ) и энтерококков в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ) при значимом снижении числа энтеробактеров в 4,5 раза ( $p < 0,05$ ), протеев – в 2,3 раза ( $p < 0,05$ ), морганелл – в 4,4 раз ( $p < 0,05$ ), ацинетобактеров – 7,7 раза ( $p < 0,05$ ), коагулазоотрицательных стафилококков – в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ), грибов рода *Candida* – 2,1 раза ( $p < 0,05$ ) при отсутствии бактерий рода *Citrobacter* ( $p < 0,01$ ) [13, 49, 71, 308].

Оценка частоты встречаемости микроорганизмов (рисунков 7) показала значимые различия между нестрессированными и стрессированными животными для бактерий родов *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Acinetobacter*, а также для вида *S. aureus* ( $p < 0,05$ ). При применении АКТГ<sub>6-9</sub>–ПГП в дозе 50 мкг/кг достоверно снизилась частота встречаемости *Acinetobacter* spp. ( $p < 0,05$ ), а при введении пептида в дозе 500 мкг/кг – *Citrobacter* spp. ( $p < 0,05$ ) [13].

Следует отметить, что во всех группах животных в составе микробиоценоза мукозального слоя толстой кишки преобладали лакто- и бифидобактерии (рисунок 8). На фоне ХИС отмечалось некоторое уменьшение доли данных микроорганизмов и энтерококков за счет увеличения представительства *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., коагулазоотрицательных стафилококков и грибов рода

*Candida*, а также появления отсутствовавших у контрольных животных энтеробактеров, цитробактеров, морганелл, ацинетобактеров и *S. aureus* [13, 71].

Применение АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП во всех использованных дозах приводило к увеличению доли облигатных представителей микробиоты за счет снижения количества факультативных и транзиторных микроорганизмов. При этом наиболее близкие значения относительного среднего отмечались в группе животных, которым вводили пептид в наибольшей использованной дозе (500 мкг/кг) [13, 71].

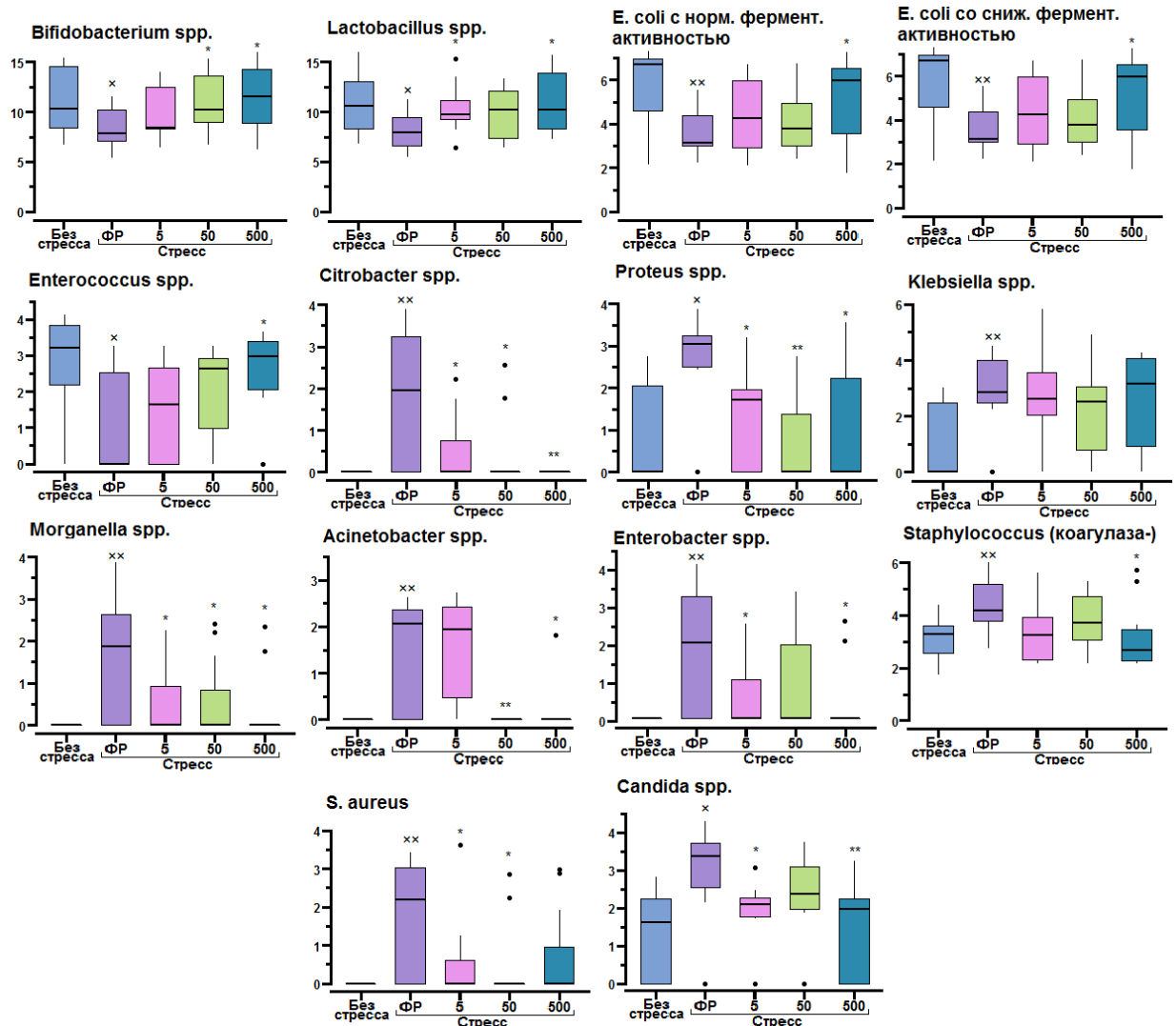


Рисунок 6 – Количественный состав мукозальной микробиоты толстой кишки крыс при ХИС и при применении АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП (lg КОЕ/г)

Примечание – × –  $p < 0,05$ , ×× –  $p < 0,01$  по сравнению с группой «Контроль» (по U-критерию Манна–Уитни), \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$  по сравнению с группой «ХИС» (по критерию Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна); ФР – изотонический раствор натрия хлорида.

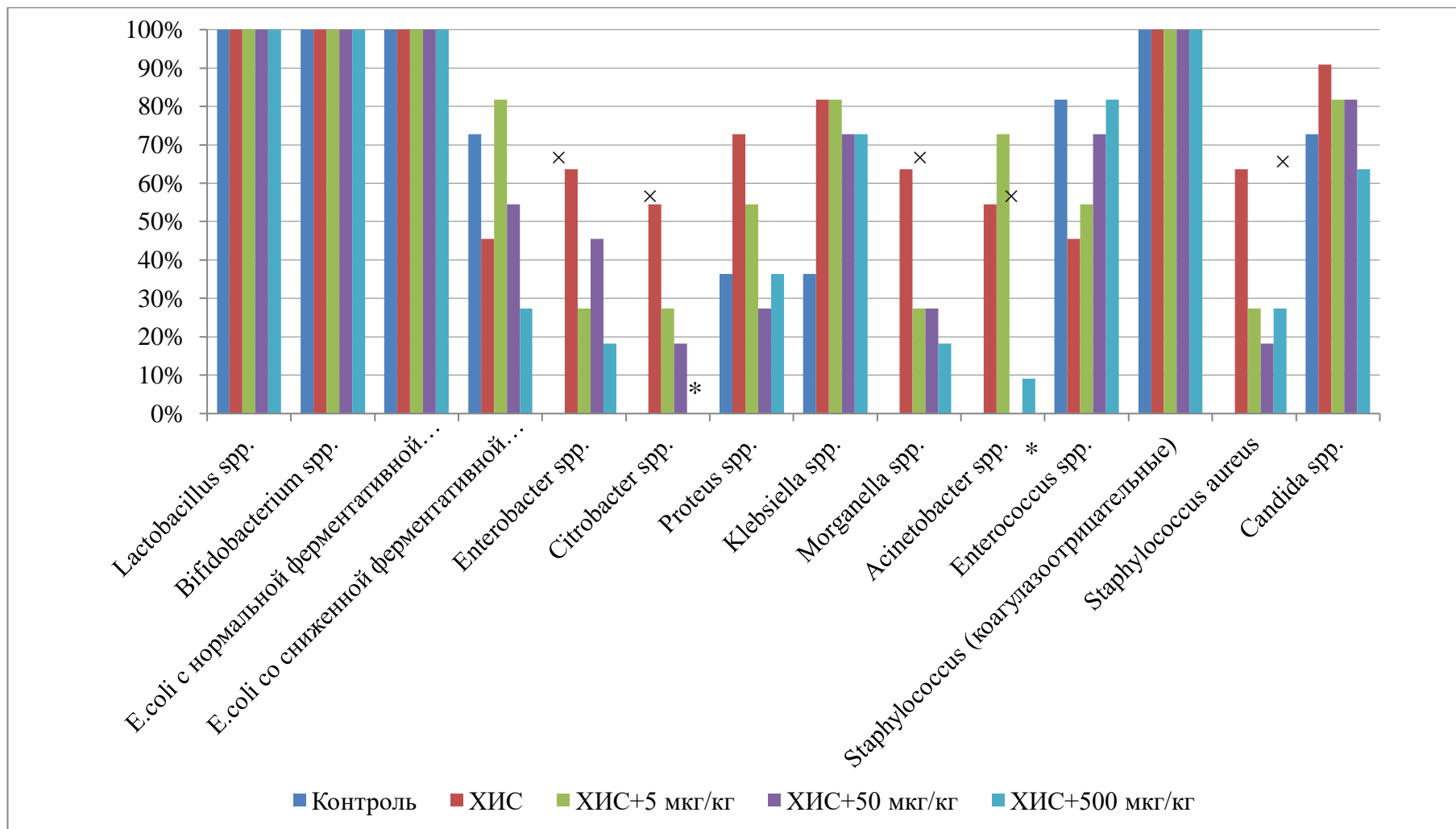


Рисунок 7 – Частота встречаемости представителей парietальной микробиоты толстой кишки

Примечание – x –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Контроль» (по точному критерию Фишера), \* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «ХИС» (по точному критерию Фишера)

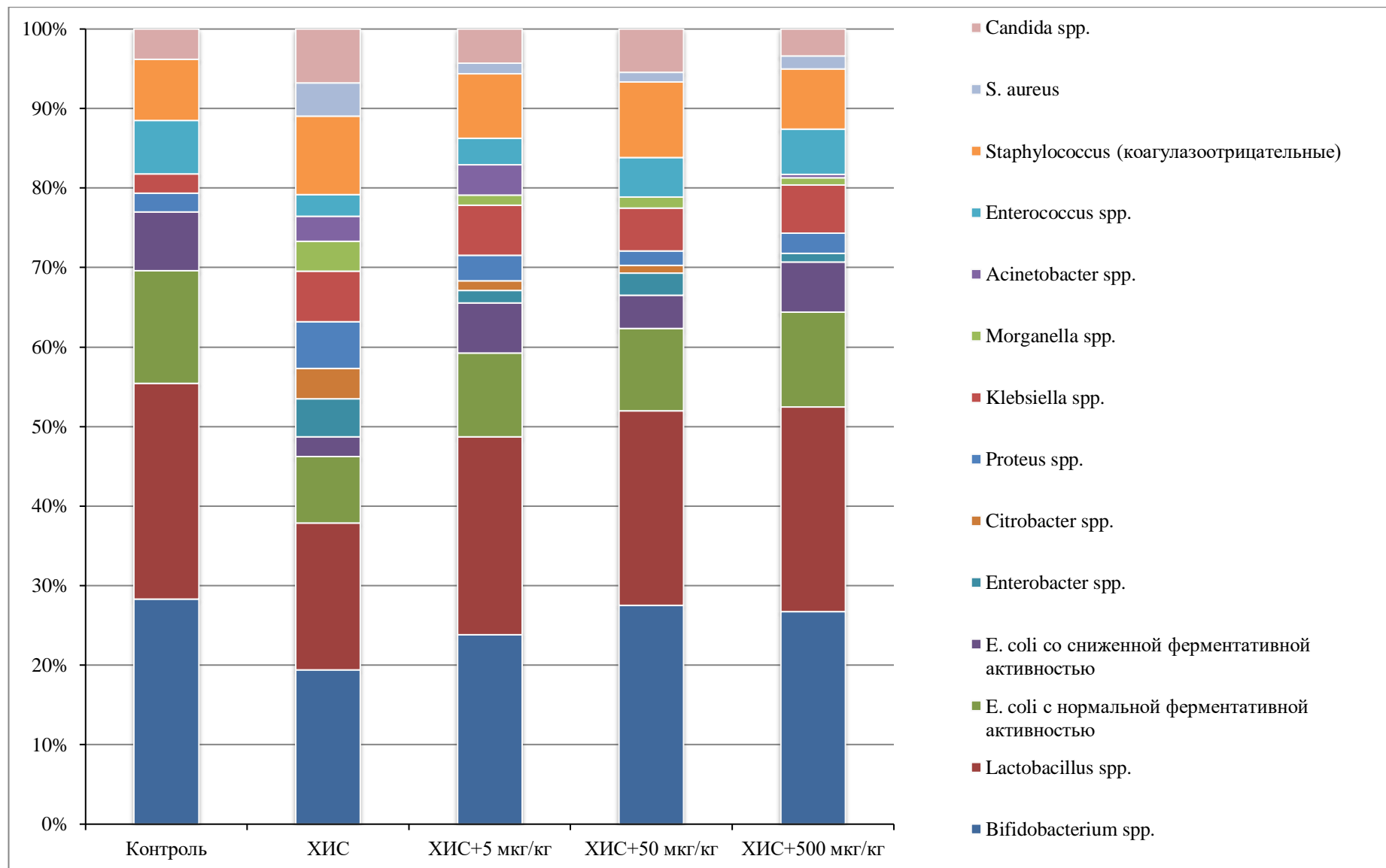


Рисунок 8 – Доля идентифицированных микроорганизмов в составе микробиоты толстой кишки в экспериментальных группах

Таким образом, стрессорное воздействие вызвало изменение количественного и качественного состава микробиоты за счет снижения числа и доли облигатных микроорганизмов и увеличения представительства условно-патогенных микроорганизмов на фоне увеличения уровня кортикостерона в сыворотке крови животных. Применение пептида во всех исследуемых дозах корригировало стресс-индуцированные изменения структуры пристеночной микробиоты толстой кишки на фоне снижения уровня кортикостерона. При этом наиболее близкий по количественным и качественным характеристикам к нестрессированным животным состав микробиоты отмечался в группе животных, которым вводили пептид в дозе 500 мкг/кг.

### **3.3. Морфофункциональное состояние стенки толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса и при применении АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП**

Важное значение в функционировании оси кишечник-мозг имеет проницаемость стенки кишки, от которой зависит проникновение в организм метаболитов микрофлоры кишечника и, как следствие, их влияние на состояние нервной системы [135, 279, 280]. На проницаемость стенки кишки оказывает влияние целый ряд факторов (высвобождение КРФ, активация клеточных элементов (тучные клетки, эозинофилы, дендритные клетки), эпигенетические механизмы, выделение нейроэндокринных факторов (КРФ) и нейропептидов, а также воспалительная реакция при транслокации бактерий), которые могут существенно изменяться в условиях стресса [19]. В предыдущих исследованиях было показано, что в условиях использованной в нашей работе модели хронического иммобилизационного стресса наблюдались существенные изменения морфофункционального состояния стенки толстой кишки провоспалительного характера [212, 213]. При этом использование семакса в определенной степени нивелировало данные стрессиндуцированные сдвиги [212].

Учитывая достаточно выраженные эффекты АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в отношении нервной системы и микробиоты толстой кишки, для полной оценки взаимоотношений в оси кишечник-мозг представлялось необходимым изучение эффектов пептида в данном направлении.

При гистологическом исследовании фрагментов толстой кишки в группе контрольных нестрессированных животных в ее стенке патоморфологических изменений не обнаружено (рисунки 9, 10). Слизистая оболочка покрыта однослойным призматическим эпителием, эпителиальная выстилка непрерывна на всем протяжении всей. Крипты глубокие с узкими просветами узкие. Глубина крипт в контрольной группе составляет 165,59 мкм. Столбчатые эпителиоциты высокие, большое количество бокаловидных в поле зрения (62,31 клеток в поле зрения). Подслизистая основа тонкая со слабо выраженной клеточной инфильтрацией, представленной лимфоцитами и гистиоцитами, Лимфатические сосуды подслизистого слоя были с узким щелевидным просветом. Мышечная оболочка состояла из нескольких рядов гладких миоцитов и не имела большого объема соединительной ткани. Стромальная основа складки была представлена соединительной тканью из тонких коллагеновых волокон и отдельными гладкомышечными волокнами. Со стороны мышечного слоя и серозной оболочки воспалительных изменений не обнаружено [17, 137].

При воздействии иммобилизационного стресса в стенке ободочной кишки крыс определяются выраженные морфологические изменения, сопровождающиеся нарушением архитектоники слизистой оболочки (рисунки 11, 12). Кишечные крипты приобретают выраженную булавовидную форму, их глубина уменьшается на 28,5% ( $p < 0,01$ ) (таблица 4). Количество бокаловидных клеток снижается на 23,6% ( $p < 0,05$ ). В просвете кишки и на ее поверхности присутствует большое количество слизи с разрушенными клетками. Очагово отмечается десквамация эпителия и поверхностный некроз колоноцитов. Со стороны лимфоидной ткани слизистой оболочки определяются выраженные реактивные изменения – присутствует большое количество крупных лимфоидных фолликулов с расширенными герминативными центрами, по сравнению с

аналогичными структурами ободочной кишки животных контрольной группы. Во всех оболочках ободочной кишки визуализируется выраженная диффузная полиморфноклеточная инфильтрация. Среди клеток преобладают лимфоциты и гранулоциты, относительное количество которых увеличивается в 6,8 раза ( $p < 0,01$ ) и 1,5 раза ( $p < 0,01$ ) соответственно по сравнению с аналогичным показателем животных контрольной группой. Также отмечается увеличение числа тучных клеток в 3,8 раза в стенке кишки ( $p < 0,01$ ) [17, 137].

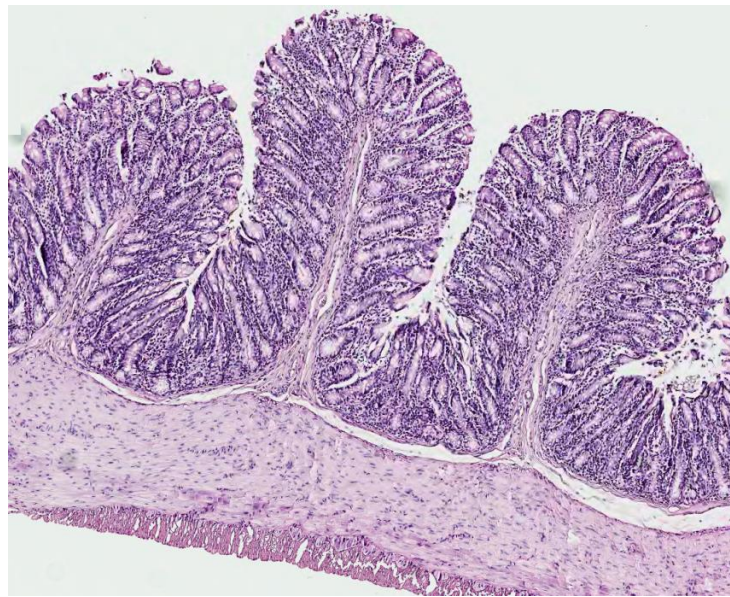


Рисунок 9 – Микрофотография стенки ободочной кишки животного контрольной группы. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.:  $\times 40$

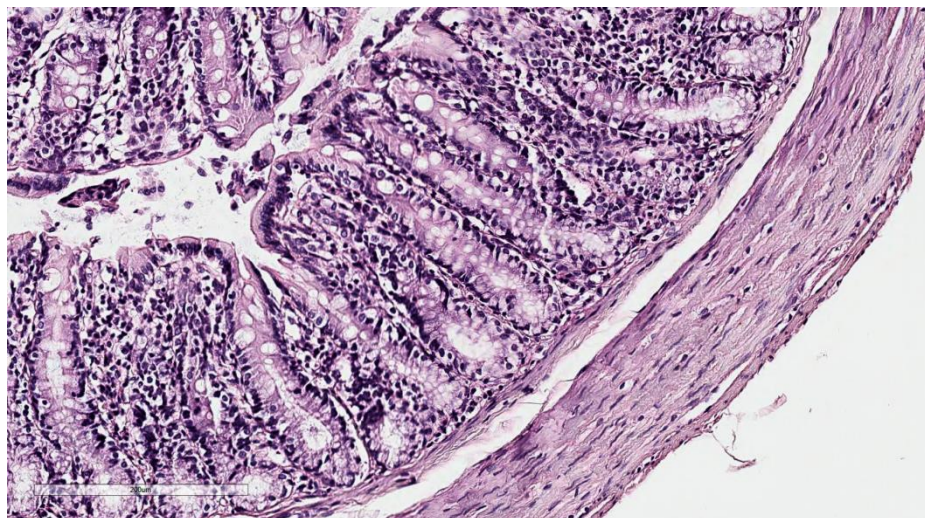


Рисунок 10 – Микрофотография слизистой ободочной кишки животного контрольной группы. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.:  $\times 100$



Таблица 4 – Морфометрические показатели толстой кишки крыс в условиях ХИС и при применении АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП (Ме[1Q, 3Q])

Показатель	Группа				
	Контроль (n = 11)	ХИС (n = 11)	ХИС+5 (n = 11)	ХИС+50 (n = 11)	ХИС+500 (n = 11)
Глубина крипт, мкм	159,4 [136,9; 182,34]	114,5×× [86,2; 122,1]	114,9 [97,9; 123,4]	116,6 [86,6; 130,5]	149,6** [102,5; 166,4]
Бокаловидные клетки, шт. в поле зрения	63,20 [42,3; 68,0]	48,3× [34,4; 54,2]	59,1* [46,1; 67,3]	55,2* [45,8; 64,6]	60,3* [42,6; 66,1]
Гранулоциты, %	11 [10; 12]	17× [15; 23]	12* [11; 13]	12* [11; 14]	11* [11; 13]
Плазмоциты, %	2,5 [2; 3]	17 [15; 18]×	5 [5; 7]*	7 [6; 9]*	3 [3; 4]*
Макрофаги, %	3 [3; 5]	13× [13; 15]	13 [11; 15]	14 [13; 16]	10* [10; 11]
Лимфоциты, %	15 [13; 17]	36× [34; 39]	22* [19; 24]	25* [24; 26]	22* [19; 24]
Тучные клетки, шт. в поле зрения	5 [5; 5,5]	19× [17,5; 20]	15 [14; 15]	12* [11,5; 13]	10* [10; 11]
Примечание – × – $p < 0,05$ , ×× – $p < 0,01$ по сравнению с группой «Контроль» (по U-критерию Манна–Уитни), * – $p < 0,05$ , ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой «ХИС» (по критерию Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна).					

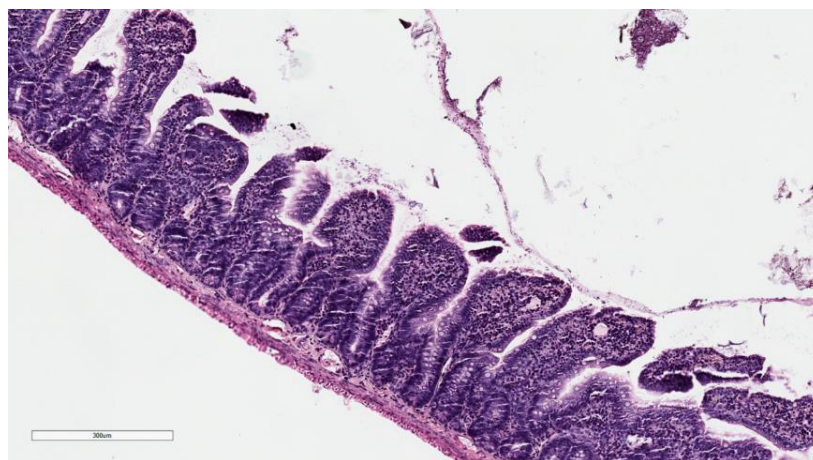


Рисунок 11 – Микрофотография стенки ободочной кишки животного группы ХИС. Нарушение гистоархитектоники стенки. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.: ×40

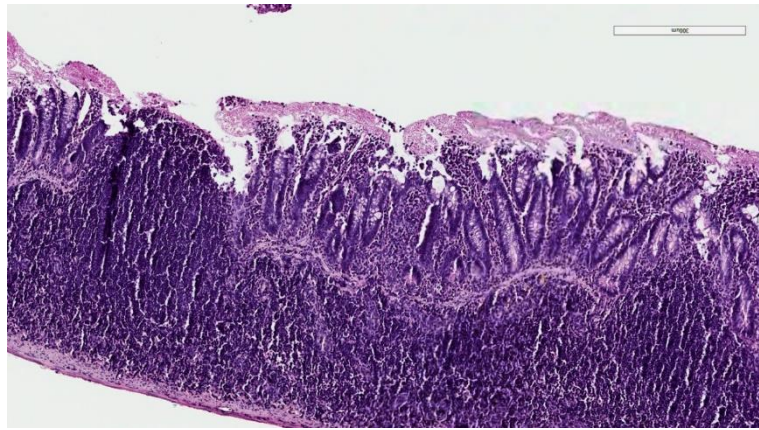


Рисунок 12 – Микрофотография стенки ободочной кишки животного группы ХИС. Некроз и десквамация в просвете клеток поверхностного эпителия, отек и лейкоцитарная инфильтрация собственной пластинки слизистой. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.:  $\times 40$

После введения АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в дозе 5 мкг/кг в стенке ободочной кишки сохраняются воспалительно-некротические изменения, сглаженные складки эпителия и поверхностный некроз колоноцитов. Со стороны лимфоидной ткани слизистой оболочки определяются выраженные реактивные изменения – присутствует большое количество крупных лимфоидных фолликулов с расширенными герминативными центрами (рисунки 13, 14, 15). На фоне низкой небольшой глубины кишечных крипт отмечается увеличение числа бокаловидных клеток на 22,4% ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует об активном слизиобразовании. Отмечается интерстициальный отек, умеренное полнокровие капилляров и мелких венозных сосудов в слизистой оболочке и подслизистой основе. В поле зрения большое количество увеличенных лимфоидных фолликулов, занимающих всю толщину стенки ободочной кишки. На некоторых участках толстой ободочной кишки в слизистой оболочке и подслизистой основе определяется очаговая выраженная инфильтрация гранулоцитами: отмечается снижение их числа на 29,4% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с группой ХИС), среди которых преобладают эозинофилы. В мышечном и серозном слоях патоморфологических изменений обнаружено не было [17, 137].

С увеличением дозы АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП до 50 мкг/кг выраженность морфологических изменений в ободочной кишке уменьшается (рисунки 16, 17).

В поверхностных отделах слизистой оболочки сохраняется диффузная выраженная полиморфноклеточная инфильтрация с преобладанием гранулоцитов. Наблюдается отек собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистой оболочки. Кишечные крипты сглажены, их высота не отличается от показателей группы ХИС ( $p > 0,05$ ). Отмечается увеличение числа бокаловидных клеток на 14,3% ( $p < 0,05$ ). Обращают на себя внимание дисциркуляторные нарушения в виде большого количества расширенных полнокровных сосудов микроциркуляторного русла в слизистой оболочке и подслизистой основе. В мышечной и серозной оболочках патоморфологических изменений обнаружено не было [17, 137].

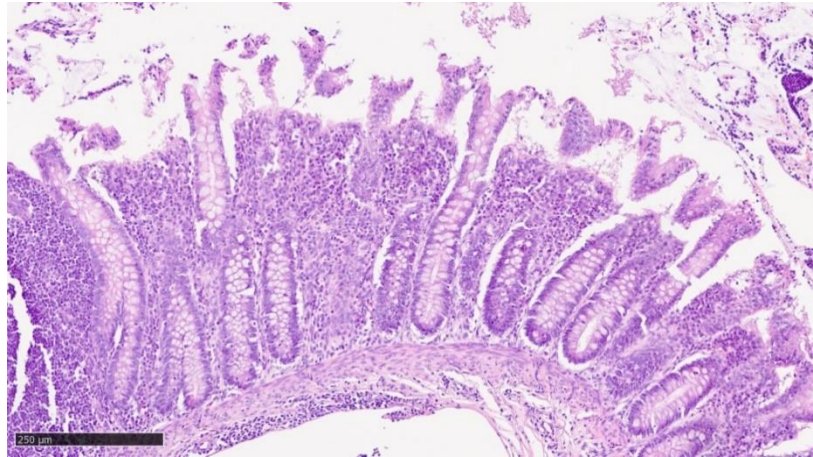


Рисунок 13 – Микрофотография стенки ободочной кишки животного группы ХИС+5. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.:  $\times 40$

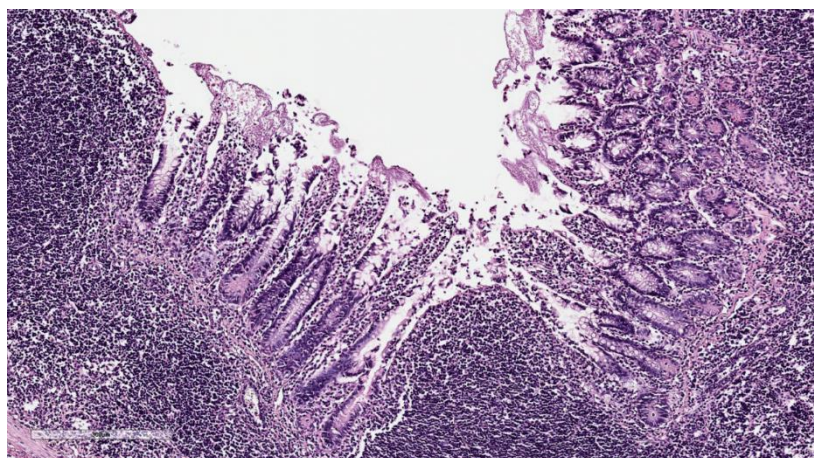


Рисунок 14 – Микрофотография стенки ободочной кишки животного группы ХИС+5. Лимфоидноподобное скопление лимфоцитов. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.:  $\times 100$

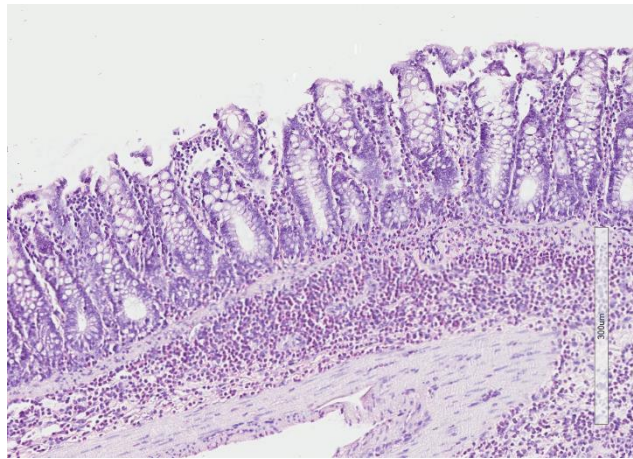


Рисунок 15 – Микрофотография стенки ободочной кишки животного группы ХИС+5. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.:  $\times 100$

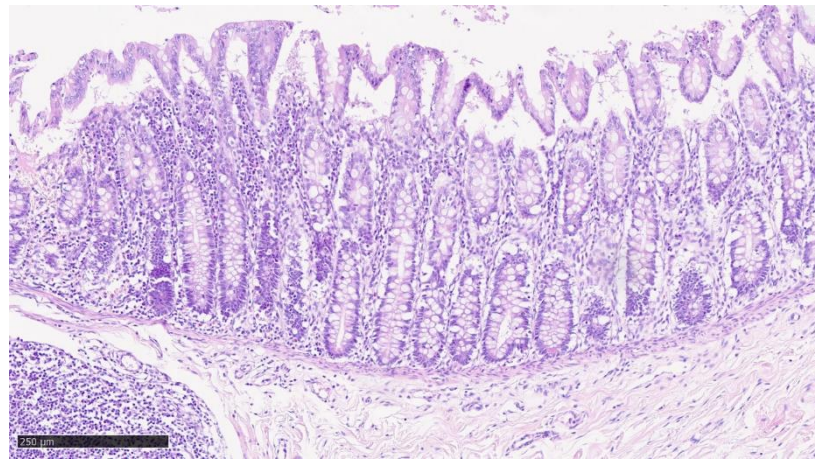


Рисунок 16 – Микрофотография стенки ободочной кишки животного группы ХИС+50. Дисциркуляторные изменения в стенке толстой кишки. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.:  $\times 40$

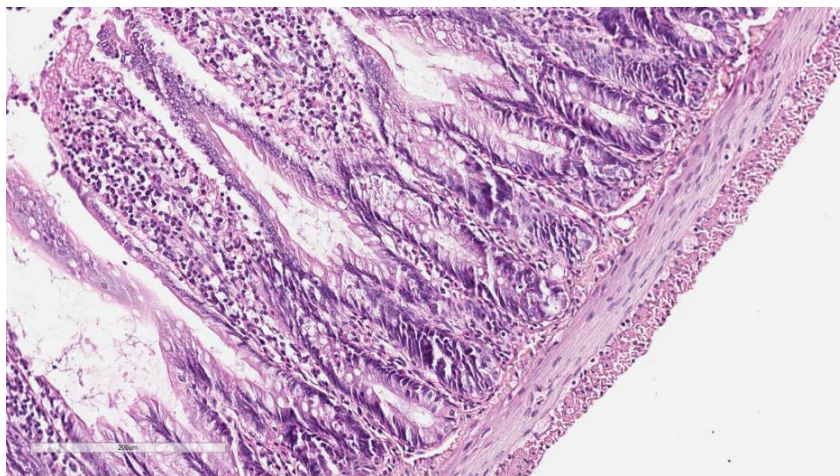


Рисунок 17 – Микрофотография стенки ободочной кишки животного группы ХИС+50. Диффузная полиморфноклеточная инфильтрация с преобладанием сегментоядерных лейкоцитов в поверхностных отделах слизистой. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.:  $\times 100$

После введения АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в дозе 500 мкг/кг степень выраженности реактивных изменений в слизистой оболочке ободочной кишки снижается (рисунки 18, 19). Отмечается активная пролиферация клеток эпителия, значительное увеличение глубины кишечных крипт на 30,7% ( $p < 0,01$ ) и количества бокаловидных клеток на 24,8% ( $p < 0,05$ ). При этом общее количество клеток воспалительного инфильтрата снижается по сравнению с контрольной группой (нужно привести название этой группы): лимфоцитов – на 38,9% ( $p < 0,01$ ), гранулоцитов – на 35,3% ( $p < 0,01$ ), плазмоцитов – на 82,4% ( $p < 0,01$ ) и макрофагов – на 23,1% ( $p < 0,01$ ), а также отмечается снижение числа тучных клеток на 47,3% ( $p < 0,01$ ). Локально определяется незначительно выраженный фиброз собственной пластинки слизистой оболочки [17, 137].

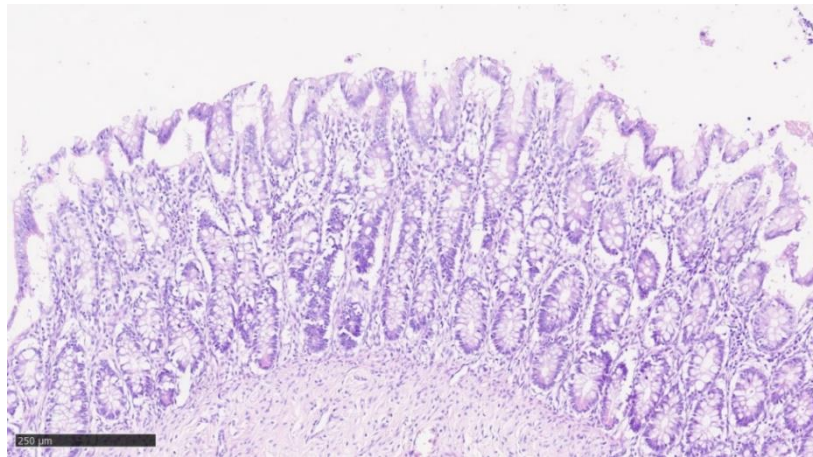


Рисунок 18 – Микрофотография стенки ободочной кишки животного группы ХИС+500. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.: ×40

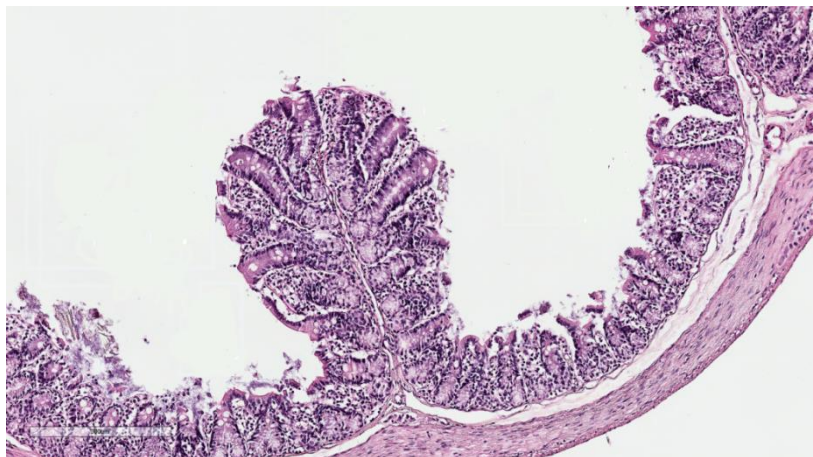


Рисунок 19 – Микрофотография стенки ободочной кишки животного группы ХИС+500. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.: ×40

В мышечной и серозной оболочках проявлений отека и воспалительной инфильтрации не отмечается. После введения АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в дозе 500 мкг/кг степень выраженности реактивных изменений в слизистой оболочке снижается. Отмечается активная пролиферация клеток поверхностного эпителия, значительное увеличение глубины кишечных крипт на 30,7% ( $p < 0,01$ ) и количества бокаловидных клеток на стандартную площадь поля зрения на 24,8% ( $p < 0,05$ ). При этом общее количество клеток воспалительного ряда инфильтрата снижается по сравнению с предыдущей экспериментальной группой: лимфоцитов – на 38,9% ( $p < 0,01$ ), гранулоцитов – на 35,3% ( $p < 0,01$ ), плазмоцитов – на 82,4% ( $p < 0,01$ ) и макрофагов - на 23,1% ( $p < 0,01$ ), а также отмечается снижение числа тучных клеток на 47,3% ( $p < 0,01$ ). Локально определяется слабо выраженный склероз собственной пластинки слизистой оболочки. В мышечном мышечной и серозной оболочке проявлений отека и воспалительной инфильтрации не отмечается [17, 137].

Таким образом, хронический иммобилизационный стресс приводит к развитию воспалительных процессов в стенке толстой кишки животных. Внутривентриальное введение АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в дозах 50 и 500 мкг/кг один раз в сутки на протяжении всего времени стрессорного воздействия препятствовало развитию наблюдавшихся у контрольных животных стресс-индуцированных сдвигов сопровождалось и сопровождалось противовоспалительными эффектами в стенке толстой кишки.

#### **3.4. Эффекты пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП на уровне цитокинов, маркеров свободно-радикального окисления и кортикостерона в сыворотке крови**

Известно, что формирование ответной реакции организма на стрессорное воздействие сопровождается увеличением уровня глюкокортикоидных гормонов в крови, активацией процессов свободнорадикального окисления и способствует развитию воспалительных реакций, в том числе за счет изменения продукции

про- и противовоспалительных цитокинов [69, 161]. В свою очередь, цитокины могут оказывать значительное влияние на состояние нервной системы, в частности, на уровни тревожности и развитие депрессии. С учетом полученных при изучении морфофункционального состояния стенки толстой кишки данных о развитии в условиях стресса экссудативной воспалительной реакции [35, 212, 213] и ее коррекции N-концевыми аналогами АКТГ [212] для выяснения механизмов эффектов АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП было выполнено исследование уровней цитокинов, маркеров свободно-радикального окисления и кортикостерона в сыворотке крови. При этом уровень глюкокортикоидов в крови является одним из основных маркеров стресса в организме и стадии его развития.

При исследовании влияния АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП на уровни про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови крыс в условиях ХИС установлено, что 14-дневное стрессорное воздействие приводило к повышению уровней провоспалительных цитокинов. Как видно из рисунков 20-25, в сыворотке животных, подвергшихся ХИС, отмечалось увеличение уровня ИЛ-1 $\beta$  (на 34,8%,  $p < 0,05$ ), ИЛ-6 (на 8,5%,  $p < 0,01$ ) и ИФН $\gamma$  (в 1,9 раза,  $p < 0,05$ ). При этом отмечалось достоверно незначимое повышение уровней ИЛ-8 и МСР-1 (соответственно на 9,3% и 7,1%,  $p > 0,05$ ), а также снижение уровня ИЛ-10 (на 2%,  $p > 0,05$ ) [25, 65, 130].

Введение АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП корригировало стресс-индуцированные сдвиги уровней цитокинов. Так, в дозе 5 мкг/кг пептид в сравнении со стрессированными контрольными животными снижал уровни ИЛ-6 на 49,3% ( $p < 0,05$ ). АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в дозе 50 мкг/кг уменьшал содержание в сыворотке крови ИЛ-1 $\beta$  на 51,2% ( $p < 0,01$ ), ИФН $\gamma$  - на 39,7% ( $p < 0,05$ ), а в дозе 500 мкг/кг пептид не оказывал влияние на уровни исследованных цитокинов [25, 65, 130].

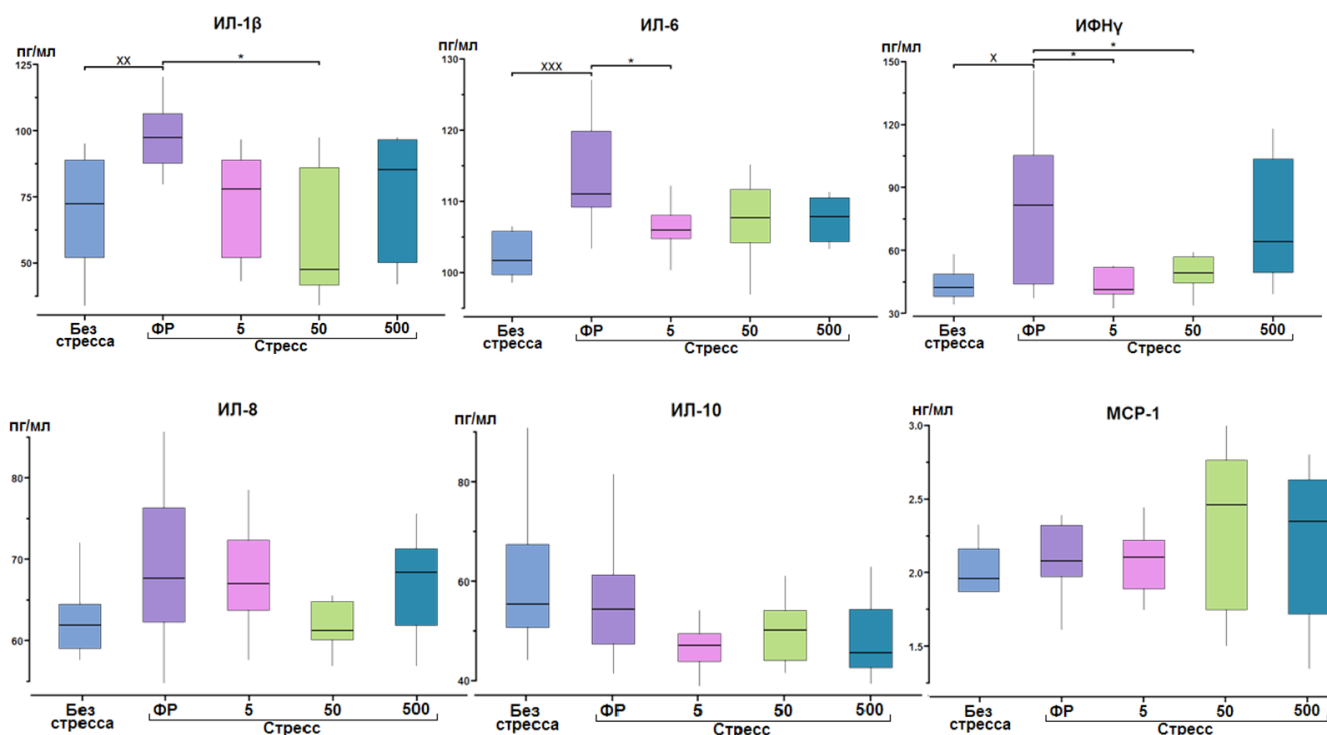


Рисунок 20 – Концентрация цитокинов в сыворотке крови экспериментальных животных в условиях ХИС и при применении АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП

Примечание – × –  $p < 0,05$ , ×× –  $p < 0,01$ , ××× –  $p < 0,01$  по сравнению с группой «Контроль» (по U-критерию Манна–Уитни), \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  по сравнению с группой «ХИС» (по критерию Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна).

Установлено, что ХИС приводил к значимому увеличению концентрации 8-ОНдГ в сыворотке крови крыс (на 6,6%,  $p < 0,05$ ) (рисунок 21), уменьшению уровня внеклеточной супероксиддисмутазы (на 7,4%,  $p < 0,05$ ) (рисунок 22) и незначимому увеличению уровня ТБК-РП (на 17,8%,  $p > 0,05$ ) (рисунок 23) [14, 65, 132].

Введение АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в дозе 5 мкг/кг приводило к достоверному уменьшению у экспериментальных животных уровней 8-ОНдГ (на 19,8%,  $p < 0,05$ ), При этом снижение содержания ТБК-РП (на 10,5%) и увеличение концентрации СОДЗ (на 6,4%) не было статистически значимым [14, 65, 132].

Увеличение дозы АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП до 50 мкг/кг также приводило к значимому уменьшению уровня 8-ОНдГ (на 30%,  $p < 0,01$ ) на фоне достоверно незначимого увеличения уровня СОД (на 1,4%) и снижения концентрации ТБК-РП (на 24,7%) [14, 65, 132].



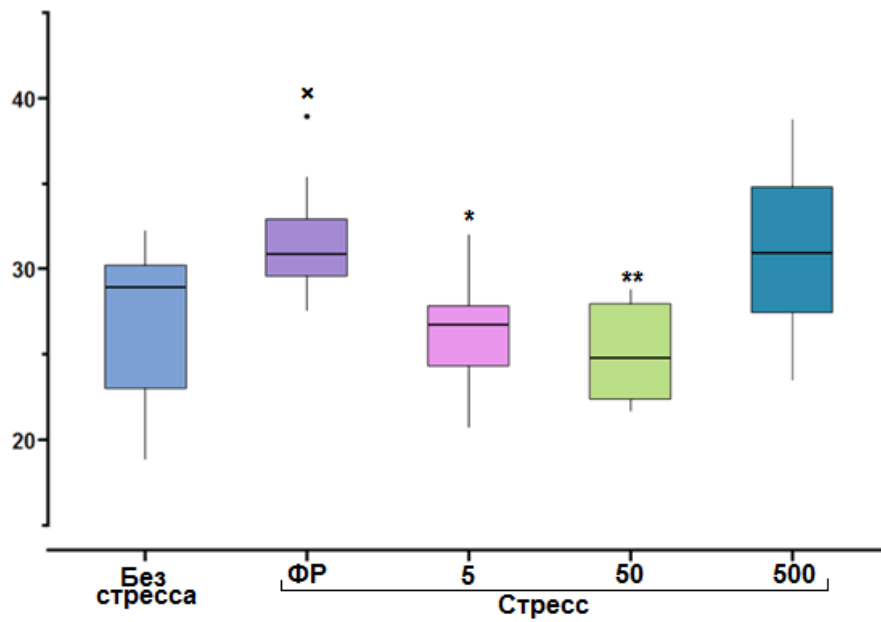


Рисунок 21 – Концентрация 8-OHdG в сыворотке крови экспериментальных животных в условиях ХИС и при применении АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП

Примечание – × –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Контроль» (по U-критерию Манна–Уитни), \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , по сравнению с группой «ХИС» (по критерию Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна).

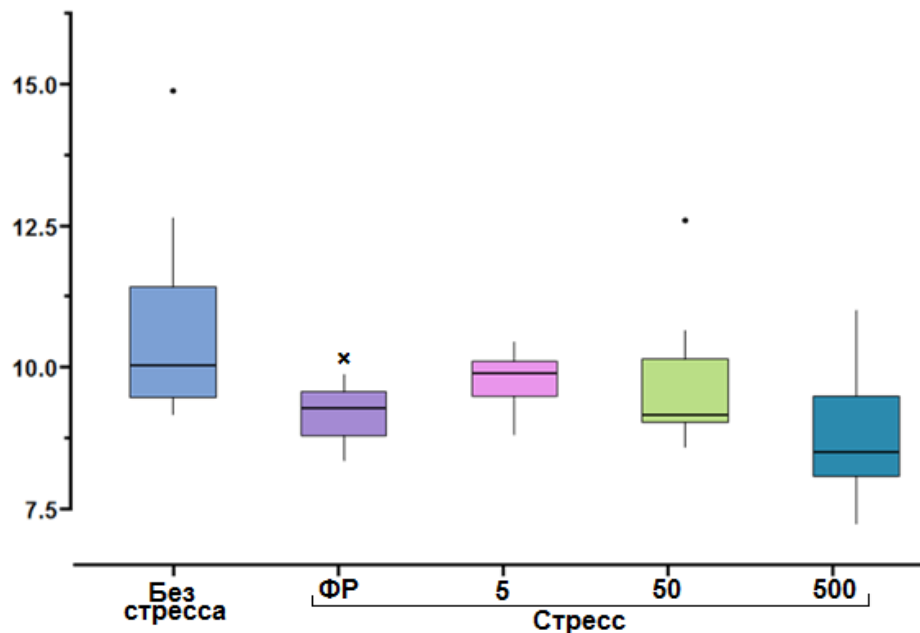


Рисунок 22 – Концентрация СОД3 в сыворотке крови экспериментальных животных в условиях ХИС и при применении АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП

Примечание – × –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Контроль» (по U-критерию Манна–Уитни).

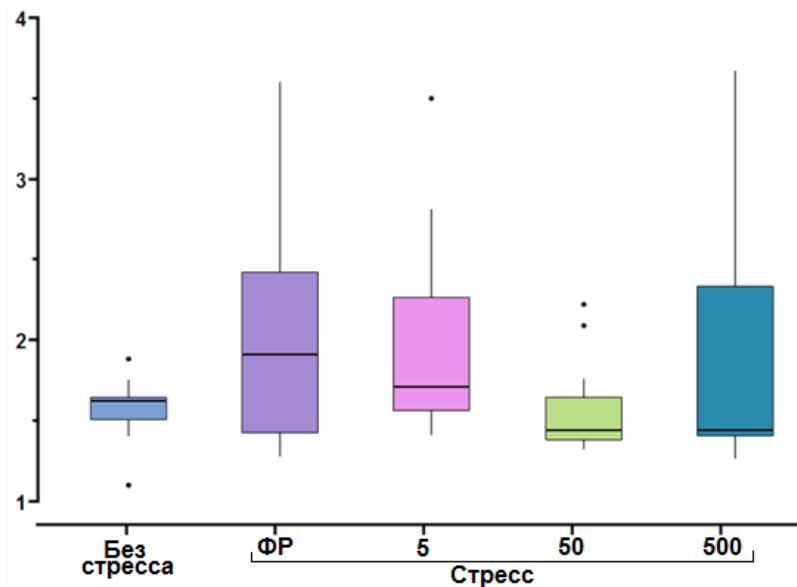


Рисунок 23 – Концентрация ТБК-РП в сыворотке крови экспериментальных животных в условиях ХИС и при применении АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП

В наибольшей использованной дозе 500 мкг/кг пептид не оказывал значимого влияния на показатели свободнорадикального окисления у экспериментальных животных: медианное значение уровня 8-OHdG фактически не изменилось, СОДЗ – увеличилось (на 8,4%), а ТБК-РП уменьшилось (на 24,6%) [14, 65, 132].

Как видно из рисунка 24 стрессорное воздействие у экспериментальных животных вызывало увеличение концентрации кортикостерона в сыворотке крови на 27% ( $p < 0,01$ ) [71].

Применение АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП во всех исследованных дозах в условиях ХИС приводило к значимому уменьшению концентрации данного гормона. Так, введение пептида в дозе 5 мкг/кг способствовало существенному снижению уровня кортикостерона (на 25,9%,  $p < 0,01$ ) в сравнении со стрессированными животными, получавших изотонический раствор натрия хлорида. При увеличении дозы АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП до 50 мкг/кг отмечалось уменьшение концентрации кортикостерона на 14,1% ( $p < 0,05$ ). В наибольшей использованной дозе 500 мкг/кг, пептид вызывал снижение уровня гормона на 22,3% ( $p < 0,05$ ) [71].

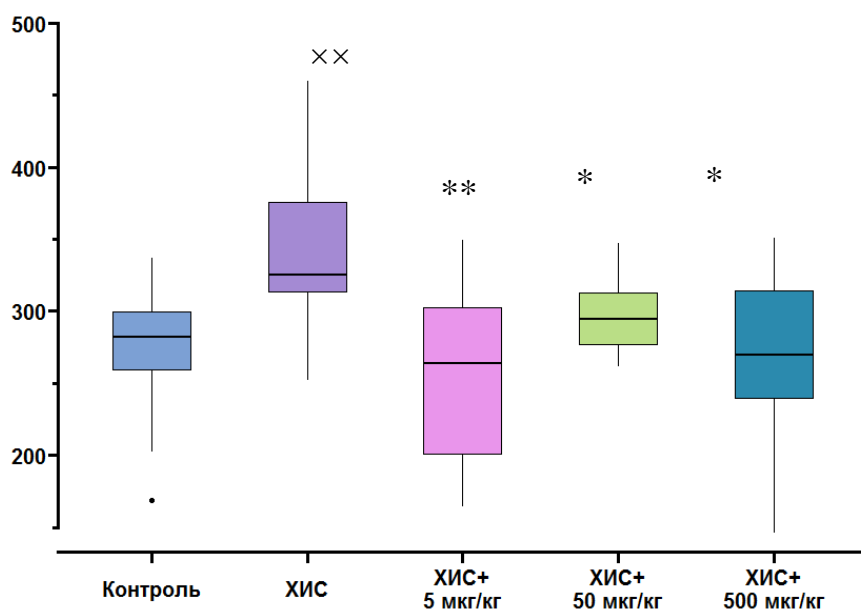


Рисунок 24 – Концентрация кортикостерона в сыворотке крови экспериментальных животных в условиях ХИС и при применении АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП

Примечание: xx –  $p < 0,01$  по сравнению с группой «Контроль» (по U-критерию Манна–Уитни), \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$  по сравнению с группой «ХИС» (по критерию Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна).

Таким образом, что 14-дневный иммобилизационный стресс способствует повышению уровней провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИФН $\gamma$ ) в сыворотке крови крыс. Внутривнутрибрюшинное введение АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП в дозах 5 и 50 мкг/кг один раз в сутки на протяжении всего времени стрессорного воздействия нивелировало развитие наблюдавшихся у контрольных животных стресс-индуцированных сдвигов за счет снижения уровней данных цитокинов в сыворотке крови, а также ингибировало активированные стрессом процессы свободнорадикального окисления. При этом использованная в нашей работе модель ХИС способствовала увеличению концентрации кортикостерона в сыворотке крови, а введение АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП в дозах 5, 50 и 500 мкг/кг перед стрессорным воздействием приводило к снижению уровней данного гормона, что свидетельствует о его стресс-лимитирующей активности пептида.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение механизмов развития стресса и вызванных им изменений функций организма остается актуальной проблемой современной медицины и биологии. Накопленный в настоящее время объем информации и методический уровень исследований определяет необходимость использования комплексных подходов для достижения научного результата. Учитывая тот факт, что стресс является общей реакцией организма на воздействия окружающей среды, важным условием адекватной его оценки является анализ состояния регуляторных систем, выяснение наличия функциональных взаимосвязей между ними, а также поиск путей патогенетически обоснованных путей коррекции стрессиндуцированных сдвигов в них. Изменение функционального состояния регуляторных систем, например, при стрессе, закономерно сопровождается развитием различных, в том числе и адаптивных, сдвигов в органах и системах. В ряде случаев при этом может развиваться дизрегуляторная патология [24]. В полной мере данные положения могут относиться и к оси кишечник-мозг, изучение структурно-функциональных связей в которой и их нарушения при различных состояниях является одним из наиболее интенсивно развивающихся направлений современной биомедицинской науки. Одним из возможных путей коррекции воздействия стресса на организм является использование регуляторных пептидов с широким спектром биологической активности.

В выполненном исследовании мы впервые исследовали эффекты аналога АКТГ, АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в условиях хронического иммобилизационного стресса с использованием крыс Вистар, которые рассматриваются как стресснеустойчивые неустойчивые животные [68]. Все полученные в работе показатели со стороны различных органов и систем определялись на одних и тех же животных, что повышало научную значимость и достоверность полученных данных за счет исключения сезонного фактора и возможных различий между партиями крыс из питомника.

Использованная в работе модель стресса в виде 2-часовой иммобилизации в течение 14 дней была нами неоднократно апробирована в предыдущих исследованиях [35, 102, 212, 213] и ее параметры близки или аналогичны к таковым, традиционно применяемым в многочисленных отечественных и зарубежных исследованиях, что позволяет проводить адекватное сопоставление полученных результатов с данными литературы. В целях контроля развития стрессорной реакции в нашей работе по окончании эксперимента было выполнено определение в сыворотке крови крыс уровня кортикостерона. Установлено, что стрессорное воздействие вызывало увеличение концентрации кортикостерона в сыворотке крови на 27% [59], что свидетельствует о развитии стадии резистентности стресса. Значительное достоверное снижение концентрации кортикостерона на фоне применения АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП во всех исследованных дозах в условиях ХИС на 14-26% свидетельствует о стресслимитирующем действии пептида. Наблюдаемое дозозависимое влияние пептида на уровень кортикостерона можно объяснить наличием U-эффекта, характерного для регуляторных пептидов.

Исследование состояния нервной системы с использованием поведенческих моделей ПКЛ, принудительного плавания и открытого поля позволило выявить значительные изменения на фоне применения АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП. Так, у контрольных стрессированных животных наблюдалось повышение уровня тревожного и депрессивного поведения, а также изменения двигательной активности. При этом пептид в дозах 5 и 50 мкг/кг в условиях ХИС оказывал анксиолитическое (уменьшения уровней тревожности и эмоциональности) и антидепрессантное действие, не оказывая существенного влияния на вертикальную, горизонтальную и ориентировочно-исследовательскую активность. Эти результаты могут являться подтверждением стресслимитирующей направленности эффектов АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП.

Кроме того, ХИС приводил к дисбиозу, представленному снижением численности облигатной микробиоты (такой как *E.coli* (с нормальной ферментативной активностью), *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. и *Enterococcus* spp.), появлением и ростом комменсальных микроорганизмов.

Однако введение АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП крысам в условиях ХИС приводило к нормализации состава микробиоты слизистой оболочки кишечника.

Установленные в результате исследования эффекты пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП на состояние мукозальной микрофлоры могли реализовываться как через центральные, так и через периферические механизмы. Центральное действие пептида заключается в его стресс-лимитирующем эффекте вследствие способности АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП проходить через гематоэнцефалический барьер и взаимодействовать с MC3R и MC4R головного мозга [65, 235]. Реализация периферических эффектов пептида может происходить через его взаимодействие с меланокортиновыми рецепторами кишечника (MC3R и MC4R) [62]. Также следует отметить, что кишечная микробиота находится в тесном контакте с иммунной системой, поэтому выявленные эффекты пептида могут реализовываться и за счет его иммуномодулирующих свойств [6].

Известно, что состав микробиоты слизистой оболочки определяется динамическим равновесием между состоянием слизистой оболочки кишечника и микрофлорой. Состояние слизистой оболочки толстой кишки определяется несколькими факторами, которые включают активность фагоцитов и действие некоторых цитокинов.

Одним из основных механизмов, предложенных в качестве основы коммуникации кишечник-мозг, является нарушение барьерной функции кишечника [275]. В 2004 году Sudo N. et al установили, что GF-мыши имели повышенную реакцию НРА на стресс из-за более высоких уровней кортикостерона и АКТГ по сравнению с мышами, кишечник которых был колонизирован микроорганизмами [230]. Dynan T. и Cryan F. (2017) объясняют повышенную реакцию НРА тем фактом, что это приводит к повышению проницаемости кишечника, транслокации микроорганизмов и активации иммунитета [114]. Таким образом, психологический стресс оказал значительное влияние на состояние слизистой оболочки кишечника животных с энтеропатией, вызванной приемом нестероидных противовоспалительных препаратов [231, 263].

Реакция ЦНС на стресс связана с активацией ГГНС и СНС. Эта активация приводит к увеличению проницаемости кишечника и изменениям в кишечной микробиоте [83, 276]. Вызванные стрессом кортикотропин-рилизинг фактор и выработка АКТГ сопровождаются высвобождением кортикостероидов, которые усиливают перистальтику толстой кишки, а также разрушают межэпителиальные контакты. В результате нарушается работа желудочно-кишечного тракта, что создает условия для миграции грамотрицательных бактерий в подслизистый слой. Там они становятся доступными для иммунных клеток и кишечной нервной системы. Бактериальная транслокация приводит к активации иммунитета, которая характеризуется увеличением выработки провоспалительных цитокинов, например ИЛ-6 и ИФН $\gamma$  [88, 143, 292]. Наряду с бактериальной транслокацией, ингибирование блуждающего нерва приводит к провоспалительной реакции [82]. Хронический стресс препятствует восстановлению тонуса парасимпатической системы, способствует аллостатической нагрузке и подавляет противовоспалительную активность блуждающего нерва [200]. Таким образом, хронический стресс устраняет защитное действие блуждающего нерва на эпителиальный барьер кишечника, что способствует формированию дисбактериоза кишечника.

Поведенческое исследование в приподнятом плюс-лабиринте, тесте на принудительное плавание и тесте на открытом поле показало, что ХИС приводил к тревожному и депрессивноподобному поведению. АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП продемонстрировал как анксиолитический, так и антидепрессантный эффекты, которые соответствуют результатам наших коллег, применивших модель социального стресса [119, 120].

АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП проявлял антидепрессивную активность в самых низких (5 мкг/кг) и самых высоких (500 мкг/кг) дозах, тогда как анксиолитическая активность была продемонстрирована в средней дозе (50 мкг/кг). Это явление известно как U-эффект. Это могло бы иметь следующее объяснение. Известно, что передача сигнала от MCRs осуществляется за счет взаимодействия с аденилатциклазой и активации цАМФ-сигнального пути [153]. Однако пути

передачи сигнала могут зависеть от концентрации лиганда и передаваться с активацией других систем вторичных мессенджеров, что может привести к изменениям направления и тяжести эффектов. Например, сигнал от MC3R может передаваться по пути PI3K [173], а от MC5R – по Jak/STAT [84].

Известно, что депрессия является результатом подавления и изменения серотонинергической передачи и передачи катехоламинов [18]. Таким образом, сокращение времени иммобилизации и увеличение скорости лазания связаны с увеличением норадренергической и серотонинергической передачи [185]. ХИС приводит к нарушениям метаболического пути кинуренина с последующим снижением выработки серотонина на фоне дисбактериоза кишечника [178]. Критические уровни 5-гидрокситриптамина имеют решающее значение для регуляции настроения и когнитивного функционирования [285]. Таким образом, мы считаем, что уменьшение времени иммобилизации у крыс, получавших АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП, может быть обусловлено действием пептида на норадренергическую и серотонинергическую системы.

Антидепрессивный эффект АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в самой низкой дозе (5 мкг/кг) может быть связан с действием пептида через активацию рецепторов в ЦНС. Мы предполагаем, что у пептида недостаточно лигандов для взаимодействия с периферическими клетками, тогда как он мог бы проходить через ГЭБ [235] и воздействовать на ЦНС, особенно на гиппокамп. Гиппокамп, который получает серотонинергические сигналы от ствола головного мозга, является одной из основных структур мозга, участвующих в патогенезе депрессивного расстройства [285]. MC3R широко представлены в этой структуре [194], и АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП может реализовать свой антидепрессивный эффект посредством взаимодействия с этими рецепторами.

Высокая доза пептидов позволяет нам предположить, что, возможно, существует достаточное количество лигандов пептида для взаимодействия не только с MCR в ЦНС, но и с MCR на периферических клетках, включая иммунные. MC1R представлены на клеточной мембране фагоцитов, например макрофагов [217] и нейтрофилов [282]. Следовательно, мы предполагаем,



что АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в самой высокой применяемой дозе может реализовать свой эффект через MCR фагоцитов, представленных в стенке кишечника, что может привести к их активации и последующему снижению проницаемости кишечника и транслокации *E. coli*. Более того, недавние работы продемонстрировали, что *E. coli* продуцирует различные нейромедиаторы, например ацетилхолин, дигидроксифенилаланин (предшественник дофамина и катехоламинов) [131] и серотонин [144, 252], которые регулируют настроение и когнитивные функции. Таким образом, антидепрессивная активность АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП, вводимого в дозе 500 мкг/кг, может реализовываться как через центральные (через взаимодействие с MCR и активацию сигнальных путей в ЦНС), так и периферические механизмы (через регуляцию *E. coli* население).

В настоящее время в многочисленных исследованиях показана важная роль проницаемости стенки кишки в коммуникации в оси кишечник-мозг [22], поэтому изучение влияния пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП на морфофункциональное состояние ободочной кишки крыс в условиях стресса являлось одним из важных аспектов данной работы. Было показано, что хронический иммобилизационный стресс приводит к развитию воспалительных процессов в стенке толстой кишки животных. Внутривентрикулярное введение АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в дозах 50 и 500 мкг/кг один раз в сутки на протяжении всего времени стрессорного воздействия препятствовало развитию наблюдавшихся у контрольных животных стресс-индуцированных сдвигов сопровождалось и сопровождалось противовоспалительными эффектами в стенке толстой кишки [15, 123].

Установленные в результате исследования изменения строения стенки ободочной кишки могут быть обусловлены повышением проницаемости слизистой оболочки и транслокацией представителей кишечной микрофлоры в подлежащие оболочки. Ранее было показано, что ключевую роль в повышении проницаемости слизистой оболочки ободочной кишки играет кортикотропин-рилизинг фактор (КРФ), продукция которого повышается при стрессорных воздействиях [222]. Увеличение кишечной парацеллюлярной проницаемости под влиянием КРФ может развиваться за счет зависимого от тучных клеток (ТК)

высвобождения фактора некроза опухоли альфа и протеаз. Установлено, что высвобождаемые при активации ТК триптазы индуцируют разрушение плотных контактов посредством активации рецепторов, активируемых протеазой-2 эпителиальных клеток [222]. Помимо этого, было показано, что фармакологическое ингибирование активации ТК нивелировало вызванную стрессом повышенную проницаемость слизистой оболочки ободочной кишки на различных моделях у животных [249, 262]. Кроме того, КРФ вызывал гиперплазию ТК и увеличение адгезии бактерий и/или их проникновение в слизистую оболочку толстой кишки крыс, тогда как у крыс с дефицитом ТК таких изменений не отмечалось [249].

Кроме того, под действием стрессора могут наблюдаться изменения в системе гемостаза как в направлении активации, так и в направлении угнетения отдельных ее звеньев, в частности, снижение антикоагулянтной и фибринолитической активности крови с одновременной активацией тромбоцитарного звена гемостаза в условиях продолжительного стресса [287], что может быть причиной развития атрофических изменений в стенке толстой кишки.

Установленные нами в данной работе противовоспалительные эффекты АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в стенке ободочной кишки могут быть обусловлены как центральными стресс-лимитирующими эффектами пептида [38, 47], так и его местным действием вследствие биологической полифункциональности, характерной для регуляторных пептидов [51]. Центральные эффекты пептида могут быть обусловлены следующими механизмами. Так, АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП может снижать активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси путем взаимодействия с центральными меланокортиновыми рецепторами вследствие его способности проникать через гематоэнцефалический барьер [235]. Данное обстоятельство может обусловить снижение секреции КРФ в гипоталамусе и, следовательно, АКТГ и глюкокортикоидов. Установленное нами в данном исследовании снижение концентрации кортикостерона в сыворотке крови может являться подтверждением участия вышеописанных механизмов в реализации противовоспалительного эффекта АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП. Кроме того, микробиота толстой

кишки может оказывать влияние на продукцию КРФ в гипоталамусе через продукцию медиаторов и/или действие на блуждающий нерв [158, 279]. Данные о препятствующем действии АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП на развитие кишечного дисбиоза [59] позволяют нам предполагать еще один возможный путь реализации его эффектов – через действие на микробиоту толстого кишечника.

С учетом экспрессии MC1R на поверхности тучных клеток [238] правомочно предполагать, что АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП также может снижать проницаемость слизистой оболочки толстой кишки за счет местного действия через снижение активности тучных клеток.

Также в отдельности фрагмент АКТГ<sub>6-9</sub> и глипролин Pro-Gly-Pro обладают антикоагулянтной, фибринолитической и антитромбоцитарной активностью [43, 234], что может способствовать улучшению микроциркуляции и предотвращению развития дистрофических изменений в стенке толстой кишки.

Выявленные при морфологическом исследовании кишечной стенки эффекты стрессорного воздействия и применения АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП могли реализовываться за счет изменения активности процессов свободнорадикального окисления и изменения продукции про- и противовоспалительных цитокинов [69, 161]. Нами было установлено, что иммобилизационный стресс способствует повышению уровней провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИФН $\gamma$ ) в сыворотке крови крыс. Внутривентриальное введение АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в дозах 5 и 50 мкг/кг один раз в сутки на протяжении всего времени стрессорного воздействия нивелировало развитие наблюдавшихся у контрольных животных стресс-индуцированных сдвигов за счет снижения уровней данных цитокинов в сыворотке крови, а также ингибировало активированные стрессом процессы свободнорадикального окисления.

В основе выявленных эффектов пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП могут лежать его иммуномодулирующие свойства. Установлено, что применение пептида в условиях социального стресса корригировало стрессиндуцированные нарушения как клеточного, так и гуморального звеньев иммунитета, а также восстанавливало активность фагоцитоза [7]. Иммуномодулирующее действие

пептида может быть реализовано путём ингибирования продукции провоспалительных цитокинов посредством взаимодействия с MC3R и MC1R и последующей активацией цАМФ и/или NF-κB [60, 206]. Наблюдаемое дозозависимое влияние пептида на уровни цитокинов можно объяснить наличием U-эффекта, характерного для регуляторных пептидов [61].

Следует отметить, что нами не были установлены достоверно значимые изменения в сыворотке крови уровней ИЛ-8 и MCP-1, которые являются эндогенными факторами хемотаксиса соответственно нейтрофилов и моноцитов/макрофагов. В то же время при гистологическом исследовании клеточного состава стенки толстой кишки отмечено значительное увеличение количества данных видов клеток в данной локализации. Вероятно, в данном случае могло иметь место локальное увеличение содержания данных цитокинов в стенке кишки без изменения их количества в крови. Данное обстоятельство обуславливает необходимость дальнейшего изучения уровней исследованных цитокинов как в сыворотке крови, так и в месте развития воспалительной реакции в стенке толстой кишки.

Интерес представляет и тот факт, что мы не установили значимых изменений в сыворотке крови уровня противовоспалительного ИЛ-10. При этом в других работах показаны противоречивые результаты: отмечалось как его снижение [94, 194], так и повышение на фоне хронического стресса [209]. Известно, что ИЛ-10 является Th2-цитокинном [293], при этом нами было показано повышение Th1-цитокина ИФНγ, что говорит о преобладании клеточного иммунного ответа над гуморальным. Однако нами не было отмечено значимого снижения ИЛ-10 на 15-й день эксперимента. Учитывая этот факт, мы можем предположить, что мы наблюдали процесс смены Th1 на Th2-иммунный ответ, характерный для длительного стресса [67, 129].

Важным обстоятельством при анализе полученных нами результатов может являться тот факт, что при стрессорных воздействиях в стенке кишечника развиваются воспалительные процессы, сопровождающиеся изменением продукции про- и противовоспалительных цитокинов [96], которые оказывают

существенное влияние на психоэмоциональное состояние [69, 161]. Поэтому в основе отмеченного при исследовании поведенческой активности стрессированных животных повышения тревожности и депрессивности может находиться и данный механизм.

Активация свободнорадикального окисления является одним из основных механизмов повреждения клетки при стрессорном воздействии на организм [254, 255], что обуславливает актуальность поиска эффективных подходов к цитопротекции при стрессе.

Следует отметить, что препарат семакс, действующей субстанцией которого является синтетический пептид АКТГ<sub>4-7</sub>-ПП, у стрессированных крыс оказывает корригирующее действие на гистоархитектонику и процессы свободнорадикального окисления в печени, а также на уровень сывороточных трансаминаз [13]. Кроме того, в условиях ишемии мозга семакс оказывает нейропротективное действие за счет повышения уровня BDNF [22].

Выбор маркеров свободнорадикального окисления, использованных в исследовании, связан с их диагностическим и патофизиологическим значением. Так, 8-OHdG является надежным биомаркером генерализованного и клеточного окислительного стресса, выступающим в качестве важного индикатора окислительного повреждения мозга при остром ишемическом инсульте, атеросклероза, сердечно-сосудистых заболеваний, нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, а также психических расстройств, таких как шизофрения и т.д. [193]. Другим выбранным маркером окислительного стресса, является малоновый диальдегид (МДА) – продукт перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот и индикатор опосредованного активными формами кислорода повреждения клеточных мембран, уровни которого измеряют посредством оценки ТБК-РП [180]. СОД является антиоксидантом первой линии, инициирующим активацию процессов защиты от активных форм кислорода [164]. Описаны три изоформы СОД, однако преобладающим антиоксидантным ферментом в сыворотке является внеклеточная СОД3, а её роль не ограничивается только удалением радикалов, но включает

влияние на иммунные реакции и передачу клеточного сигнала [96]. В связи с этим для оценки изменений концентрации СОДЗ в условиях ХИС и на фоне введения пептида в качестве надежного и специфичного метода исследования, позволяющего точно идентифицировать именно данную изоформу фермента, использовали ИФА.

В ходе исследования было показано, что ХИС привел к значимому увеличению содержания продуктов свободнорадикального окисления ДНК/РНК в сыворотке экспериментальных животных. Подобные результаты были получены в аналогичной модели хронического стресса на мышах C57BL/6J [95]. Кроме того, ХИС привел к снижению содержания СОДЗ. Следует отметить, что активация свободнорадикального окисления и снижение концентрации СОДЗ происходили на фоне повышенного содержания в крови кортикостерона. Известно, что повышенный уровень кортикостерона сопровождается снижением активности ферментов антиоксидантной системы [56]. Таким образом, использованная в исследовании модель хронического стресса вызвала активацию процессов свободнорадикального окисления.

Установлено, что ХИС не вызвал достоверных изменений уровня ТБК-РП. При этом в литературе имеются противоречивые данные о содержании этого маркера в сыворотке крови при продолжительном стрессорном воздействии. Так, в ряде исследований хронический стресс вызывал значимое повышение концентрации сывороточных ТБК-РП [128, 145]. Однако отмеченные изменения происходили на фоне хронического непредсказуемого стресса, характеризующегося раздражителями различной силы, в то время как нами была использована модель с монотонным стрессорным воздействием. В тоже время, имеются работы, в которых уровень сывороточных ТБК-РП в сходных с нашими экспериментальных условиях существенно не изменялся, несмотря на значимое повышение концентрации МДА в органах и тканях [21, 56]. Также важно отметить, что, несмотря на быстроту и простоту, флуориметрические и спектрофотометрические методы определения ТБК-РП не всегда надежны в гетерогенных системах в силу способности альдегидов, отличных от МДА,

генерировать производные, поглощающие свет в том же диапазоне длин волн [180]. В то же время, отсутствие значимых сдвигов ТБК-РП в сыворотке крови в условиях хронического стресса также может быть связано с повышением к концу эксперимента активности антиоксидантных механизмов, не изученных в нашей работе. Поэтому для более полного выяснения механизмов установленных нами изменений в процессах свободнорадикального окисления необходимо в дальнейшем выполнить определение ряда дополнительных маркеров в сыворотке крови.

АКТГ<sub>4-7</sub>-ППП в дозах 5 и 50 мкг/кг снизил интенсивность процессов свободнорадикального окисления, что отразилось в значимом снижении уровня 8-OHdG. В связи с этим следует отметить, что имеющий близкие с АКТГ<sub>4-7</sub>-ППП структурные и функциональные свойства АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП (семакс) в сопоставимых дозах оказывает цитопротективное действие на нейроны головного мозга в условиях ишемии, в частности, за счет повышения в них экспрессии BDNF. Исследовано влияние внутрибрюшинного введения крысам-самцам линии Вистар АКТГ<sub>4-7</sub>-ППП (семакс) в дозах 5, 50, 150 и 450 мкг/кг на процессы свободнорадикального окисления в печени и активность трансаминаз сыворотки крови в условиях острого и хронического иммобилизационного стресса. Установлено, что при хроническом стрессе введение пептида во всем диапазоне доз оказывало антиоксидантное действие в гепатоцитах и достоверно повышало активность сывороточных АЛТ и АСТ в дозе 450 мкг/кг. При остром стрессе, напротив, в дозе 150 мкг/кг семакс оказывал прооксидантные эффекты, а направленность изменения активности АЛТ и АСТ зависела от величины использованной дозы: активность АЛТ снижалась после введения семакса в дозах 5 и 50 мкг/кг, но повышалась при дозе 450 мкг/кг. Активность АСТ была достоверно повышена при дозе 5 мкг/кг [13, 23, 273]. Учитывая, что инсульт сопровождается активацией окислительного стресса [17, 52], установленная нами коррекция процессов свободнорадикального окисления при применении АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП также может иметь определенное значение в цитопротекции.

Механизмы цитопротективных эффектов пептида могут быть связаны и с модуляцией активности генов NF- $\kappa$ B и активацией редокс-чувствительного NRF2-сигнального пути, которые были установлены при исследовании защитного действия АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП на клетки SH-SY5Y в условиях цитотоксичности, вызванной пероксидом водорода [60].

Кроме того, известно, что гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось, которая регулирует выработку и высвобождение кортизола, может увеличивать окислительный стресс за счет модуляции генерации активных форм кислорода и митохондриального кальциевого гомеостаза. При этом уровень кортизола имеет положительную корреляцию с концентрацией 8-OHdG в плазме крови [272]. Учитывая имеющуюся у АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП нейротропную активность [63] можно предположить, что его противострессорные эффекты также могут быть связаны с модуляцией стресс-реакции уже на уровне центральной нервной системы, что подтверждается установленном в настоящем исследовании одновременным снижением уровней кортизола и 8-OHdG.

На основании полученных данных можно заключить, что 2-часовая иммобилизация крыс на протяжении 14 дней вызывала значительные изменения состояния нервной системы и состава микробиоты толстой кишки, которые развивались на фоне развития экссудативной воспалительной реакции в стенке кишки и повышения в сыворотке крови уровней провоспалительных цитокинов и маркеров свободнорадикального окисления. Данные сдвиги могли развиваться в результате изменения характера взаимодействия в системе кишечник-мозг как за счет изменения состава пристеночной микрофлоры толстой кишки и повышения проницаемости ее стенки для метаболитов бактерий с одной стороны, так и за счет усиления нервных влияний вследствие стрессорной нейроэндокринной активации (рисунок 24).





Рисунок 25 – Механизмы действия стресса на взаимоотношения кишечник-мозг в условиях стресса (по данным собственных исследований и литературы)

Также следует отметить, что указанные процессы протекали в условиях активации всех трех регуляторных систем организма: нервной (развитие тревоги и депрессии), эндокринной (повышение уровня кортикостерона) и иммунной (активация продукции цитокинов). Применение на протяжении всего эксперимента АКТГ<sub>6,9</sub>-ППП в значительной степени способствовало нивелированию данных стрессиндуцированных сдвигов и нормализации состояния регуляторных систем, что в совокупности позволяет предполагать у пептида наличие стресс-лимитирующего действия (рисунок 25). При этом в основе реализации данных эффектов пептида могут находиться как центральные, так и периферические механизмы за счет его взаимодействия с различными типами меланокортиновых рецепторов, играющих важную роль в развии адаптивных реакций организма.



Рисунок 26 – Установленные стресс-лимитирующие эффекты АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП

Таким образом, N-концевой синтетический аналог адренкортикотропного гормона АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП в условиях хронического иммобилизационного стресса оказывает стресслимитирующее влияние на состояние функций нервной системы и микробиоты толстой кишки и в значительной степени нивелирует стрессиндуцированные сдвиги, в том числе в регуляторных системах организма.

## ВЫВОДЫ

1. Применение АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП в условиях хронического иммобилизационного стресса оказывает стресслимитирующее влияние на состояние нервной системы, состав микробиоты толстой кишки, а также в значительной степени нивелирует индуцированные стрессом сдвиги, в том числе в регуляторных системах организма.

2. Хронический иммобилизационный стресс потенцирует проявления депрессии (в тесте принудительного плавания), уровня тревожности и эмоциональности (в тестах приподнятого крестообразного лабиринта и открытого поля). АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП у стрессированных крыс в дозах 5 и 500 мкг/кг уменьшает проявления депрессии, а в дозе 50 мкг/кг – снижает у них уровень тревожности и эмоциональности.

3. Применение АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП корригирует стресс-индуцированные изменения количественного и качественного состава пристеночной микробиоты толстой кишки за счет увеличения числа и доли облигатных микроорганизмов и снижения представительства факультативных микроорганизмов. Наиболее выраженный эффект отмечается при дозе 500 мкг/кг.

4. Использование АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП в дозах 50 и 500 мкг/кг снижает выраженность стресс-индуцированных морфофункциональных изменений в стенке ободочной кишки, способствуя увеличению глубины кишечных крипт и числа бокаловидных клеток, а также снижая число клеток воспалительного инфильтрата (гранулоцитов, плазматических клеток, макрофагов и лимфоцитов) и тучных клеток, уменьшая выраженность эксудативных и дисциркуляторных расстройств.

5. В условиях хронического иммобилизационного стресса в сыворотке крови экспериментальных животных наблюдается повышение уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ИФН $\gamma$ ). Применение АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП препятствует индуцированному стрессом повышению концентрации указанных цитокинов: в дозе 5 мкг/кг – ИЛ-1 $\beta$  и ИФН $\gamma$  и в дозе 50 мкг/кг – ИЛ-6 и ИФН $\gamma$ .

Влияния пептида на уровень противовоспалительного ИЛ-10, а также МСР-1 не установлено.

6. Хронический иммобилизационный стресс сопровождается увеличением концентрации маркера свободнорадикального повреждения нуклеиновых кислот 8-оксо-2'-дезоксигуанозина и снижением активности внеклеточной супероксиддисмутазы в сыворотке крови экспериментальных животных. Применение АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в дозах 5 и 50 мкг/кг ингибирует внутриклеточный окислительный стресс и снижает уровень 8-оксо-2'-дезоксигуанозина.

7. Применение АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП во всех использованных дозах вызывало выраженное снижение концентрации кортикостерона в сыворотке крови крыс, которое было значительно повышено у них в условиях использованной модели хронического иммобилизационного стресса.

**ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Целесообразно учитывать полученные в настоящей работе данные об эффектах АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП на модели хронического иммобилизационного стресса при разработке и целенаправленном синтезе новых молекул синтетических аналогов регуляторных пептидов семейства меланокортинов.

2. Рекомендуется применение в учебном процессе медицинских и биологических вузов данных о стресслимитирующем действии АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП, перспективах его использования для коррекции стрессиндуцированных сдвигов, повышения адаптивного потенциала организма и полифункциональности регуляторных пептидов семейства меланокортинов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

8-OHdG	–	8-оксо-2'дезоксигуанозин
BDNF	–	мозговой нейротрофический фактор
GF	–	гнотобионты (germ-free)
MCP-1	–	моноцитарный хемотаксический белок-1
MCR	–	меланокортиновый рецептор
TLR	–	Toll-подобный рецептор
АКТГ	–	адренокортикотропный гормон
АЛТ	–	аланинаминотрансфераза
АСТ	–	аспартатаминотрансфераза
ГАМК	–	гамма-аминомасляная кислота
ГГНС	–	гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система
ГЭБ	–	гематоэнцефалический барьер
ИЛ	–	интерлейкин
ИФН- $\gamma$	–	интерферон-гамма
КМО	–	кишечно-мозговая ось
КОЕ	–	колониеобразующая единица
КРФ	–	кортикотропин-рилизинг фактор
ППП	–	трипептид пролил-глицил-пролин
ПОМК	–	проопиомеланокортина
СОДЗ	–	экстрацеллюлярная супероксиддисмутаза
ТБК-РП	–	продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой
ХИС	–	хронический иммобилизационный стресс
ЦНС	–	центральная нервная система

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов, Г. Г. Основы патологоанатомической практики / Г. Г. Автандилов. – Москва : РМАПО, 2007. – 480 с.
2. Адгезивные свойства лактобактерий и эшерихий в различных отделах желудочно-кишечного тракта человека в норме и патологии / Е. А. Богданова, Ю. В. Несвижский, А. А. Воробьев, М. В. Брюхова // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2006. – № 1. – С. 35-37.
3. Анксиолитическая активность аналога АКТГ в условиях хронического иммобилизационного стресса / А. О. Ворвуль, И. И. Бобынцев, О. А. Медведева [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2023. – Т. 22. – № S6. – С. 83.
4. Влияние АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP (семакса) на морфологию печени крыс в условиях острого эмоционально-болевого стресса / О. М. Шепелева, А. В. Иванов, И. И. Бобынцев [и др.] // Человек и его здоровье. – 2017. – № 3. – С. 81-85.
5. Влияние внутрибрюшинного введения АКТГ<sub>4-7</sub>-Pro-Gly-Pro на морфофункциональное состояние гепатоцитов при остром иммобилизационном стрессе / А. В. Иванов, И. И. Бобынцев, О. М. Шепелева [и др.] // Человек и его здоровье. – 2015. – № 4. – С. 86-92.
6. Влияние меланокортинов на интенсивность перекисного окисления липидов в иммунокомпетентных органах крыс-самцов в условиях информационного стресса / А. Л. Ясенявская, М. А. Самотруева, Г. Н. Генатуллина [и др.] // Биомедицина. – 2022. – Т. 18. – № 1. – С. 67-74.
7. Влияние меланокортиновых нейропептидов на поведенческие реакции белых крыс в условиях экспериментального сахарного диабета / А. А. Цибизова, М. У. Сергалиева, Д. А. Орусханова, М. А. Самотруева // Астраханский медицинский журнал. – 2022. – Т. 17. – № 1. – С. 72-78.
8. Влияние нейропептидного соединения АКТГ (6-9)-PRO-GLY-PRO на уровень про-и противовоспалительных интерлейкинов / А. Л. Ясенявская,

А. А. Цибизова, Л. А. Андреева [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал. – 2022. – № 1-2 (115). – С. 137-139.

9. Влияние нейропептидов АКТГ(4-7)-Pro-Gly-Pro и АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro на состояние иммунной системы крыс при экспериментальной депрессии / А. Л. Ясенявская, В. Х. Мурталиева, Л. А. Андреева [и др.] // Астраханский медицинский журнал. – 2019. – Т. 2. – № 1. – С. 82-86.

10. Влияние нейропептидов на психоэмоциональное состояние в условиях «социального» стресса / А. Л. Ясенявская, М. А. Самотруева, А. А. Цибизова [и др.] // Человек и его здоровье. – 2020. – № 3. – С. 37-45.

11. Влияние нейропептидов семейства меланокортинов на уровень апоптотических и нейротрофических факторов в условиях «социального» стресса / А. Л. Ясенявская, А. А. Цибизова, Л. А. Андреева [и др.] // Научные результаты биомедицинских исследований. – 2022. – Т. 8. – № 3. – С. 398-411.

12. Влияние олигопептидов-гомологов фрагмента актг15-18 на состояние печени и надпочечников крыс на модели острого иммобилизационного стресса / О. В. Кудина, С. Ю. Штрыголь, А. А. Колобов, Ю. Б. Ларьяновская // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2017. – Т. 15. – № 4. – С. 30-37.

13. Влияние пептида АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro на состояние микробиоценоза толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса / А. О. Ворвуль, О. А. Медведева, И. И. Бобынцев [и др.] // Астраханский медицинский журнал. – 2022. – Т. 17. – № 4. – С. 68-77.

14. Влияние пептида His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro на процессы свободнорадикального окисления в условиях хронического иммобилизационного стресса / А. О. Ворвуль, И. И. Бобынцев, О. А. Медведева [и др.] // Вестник Российского Государственного Медицинского Университета. – 2021. – № 6. – С. 66-72.

15. Влияние пептида АКТГ<sub>4-7</sub>-ППП на перекисное окисление липидов в печени крыс и активность сывороточных трансаминаз в условиях иммобилизационного стресса / И. И. Бобынцев, А. А. Крюков, О. М. Шепелева,



А. В. Иванов. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78. – № 8. – С. 18-21.

16. Влияние пептида АКТГ<sub>4-7</sub>-ППП на функциональное состояние гепатоцитов крыс при остром и хроническом эмоционально-болевым стрессе / И. И. Бобынцев, О. М. Шепелева, А. А. Крюков [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2015. – Т. 101. – № 2. – С. 171-179.

17. Влияние пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-Pro-Gly-Pro на морфофункциональное состояние толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса / А. О. Ворвуль, И. И. Бобынцев, Е. С. Мишина [и др.] // Бюллетень Сибирской Медицины. – 2023. – Т. 22. – № 2. – С. 14-20.

18. Влияние пептидов АТКГ<sub>6-9</sub>-PGP И АКТГ<sub>4-7</sub>PGP на уровень тревожности у крыс при наказуемом и ненаказуемом поведении / С. А. Додонова, И. И. Бобынцев, А. Е. Белых [и др.] // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2020. – Т. 106. – № 3. – С. 283-293.

19. Влияние семакса на эмоциональное состояние белых крыс в норме и на фоне действия холецистокинина-тетрапептида / Н. Г. Левицкая, Д. А. Виленский, Е. А. Себенцова [и др.] // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2010. – № 2. – С. 231-237.

20. Влияние ТЭС-терапии на показатели системы про/антиоксиданты у крыс с экспериментальным ишемическим инсультом / В. Д. Левичкин, Е. И. Ременякина, И. И. Павлюченко [и др.]. // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 2. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=12581> (дата обращения: 11.11.2021).

21. Влияние фрагмента АКТГ<sub>15-18</sub> и его аналога АКТГ<sub>15-18</sub>Pro-Gly-Pro на последствия острого стрессогенного воздействия / Д. М. Манченко, Н. Ю. Глазова, Е. А. Себенцова [и др.] // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 2022. – Т. 72. – № 4. – С. 561-575.

22. Ворвуль, А. О. Антидепрессантный эффект пептида His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro в условиях хронического иммобилизационного стресса / А. О. Ворвуль, Н. О. Константинов // Молодежная наука и современность : Материалы

88 Международной научной конференции студентов и молодых ученых (г. Курск, 20–21 апреля 2023 г.). – Курск: Изд-во КГМУ, 2023. – Т. I. – С. 10-12.

23. Ворвуль, А. О. К вопросу о механизмах повышения проницаемости стенки кишечника при стрессе / А. О. Ворвуль, И. И. Бобынцев, О. А. Медведева // Человек и его здоровье. – 2022. – Т. 25. – № 2. – С. 43-63.

24. Ворвуль, А. О. Оценка взаимосвязи между кишечной микробиотой и уровнем тревожности при применении пептида АКТГ<sub>6-9</sub>–PRO-GLY-PRO в условиях хронического иммобилизационного стресса / А. О. Ворвуль // Молодежный инновационный вестник. – 2023. – Т. 12, № 1. – С. 45–43.

25. Ворвуль, А.О. Оценка уровней про- и противовоспалительных цитокинов при применении пептида АКТГ<sub>6-9</sub>–Pro-Gly-Pro в условиях хронического иммобилизационного стресса / А. О. Ворвуль // Актуальные проблемы биомедицины–2023 : сборник материалов XXIX Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием (г. Санкт-Петербург, 30-31 марта 2023 г.). – СПб.: Изд-во ПСПбГМУ, 2023. – С. 46-47.

26. Ворвуль, А. О. Пептид АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro корректирует окислительный стресс, вызванный хронической иммобилизацией / А. О. Ворвуль, И. И. Бобынцев, О. А. Медведева // Университетская наука: взгляд в будущее : сборник научных трудов по материалам Международной научной конференции, посвященной 87-летию Курского государственного медицинского университета. (г. Курск, 4 февраля 2022 г.). – Курск: Изд-во КГМУ, 2023. – Т. I. – С. 18-21.

27. Голубева, М. Г. Нейропептид Семакс изменяет функциональную активность эритроцитов и тромбоцитов при иммобилизационном стрессе / М. Г. Голубева // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2010. – Т. 44. – № 2. – С. 45-49.

28. Городецкая, И. В. Влияние тиреоидных гормонов на изменения перекисного окисления липидов, вызванные острым и хроническим стрессом / И. В. Городецкая, Н. А. Корневская // Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук. – 2010. – № 1. – С. 78-84.

29. Действие Семакса и его С-концевого трипептида PGP На экспрессию генов факторов роста и их рецепторов в условиях экспериментальной ишемии

мозга крыс / В. Г. Дмитриева, Л. В. Дергунова, О. В. Поварова [и др.]. // Доклады академии наук. – 2008. – Т. 422. – № 2. – С. 258-261.

30. Дизрегуляционная патология / И. Г. Акмаев, В. В. Александрин, П. Н. Александров [и др.] ; Под ред. академика РАМН Г.Н.Крыжановского; Минздрав России, Российская академия медицинских наук, Медико-биологическое отделение РАМН, НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Российское научное общество патофизиологов. – М. : Издательство "Медицина", 2002. – 632 с.

31. Динамика экспрессии мозгового нейротрофического фактора (BDNF) в коре головного мозга крыс и влияние препарата «Семакс» на его продукцию при моделировании ишемического инсульта / Е. А. Кулага, С. А. Гаврилова, С. В. Буравков, В. Б. Кошелев. // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2013. – Т. 12. – № 3. – С. 39-46.

32. Додонова, С. А. Регуляторные пептиды семейства меланокортинов: биосинтез, рецепция, биологические эффекты / С. А. Додонова, А. Е. Белых, И. И. Бобынцев // Курский Научно-Практический Вестник «Человек и его здоровье». – 2018. – № 1. – С. 99-108.

33. Ефимов, Б. А. Современные методы оценки качественных и количественных показателей микрофлоры кишечника и влагалища / Б. А. Ефимов, Л. И. Кафарская, В. М. Коршунов. // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии. – 2002. – № 4. – С. 72-78.

34. Жуйкова, С. Е. Глипролины – регуляторные пептиды с интегративным действием / С. Е. Жуйкова // Интегративная физиология. – 2020. – Т. 1. – № 4. – С. 303-316.

35. Изменение температурной болевой чувствительности у крыс после введения N-концевых аналогов адренокортикотропного гормона / С. А. Додонова, И. И. Бобынцев, А. Е. Белых [и др.] // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2019. – № 6. – С. 35-39.

36. Исследование протеолиза аминопептидазами аналогов семакса с разными N-концевыми аминокислотами / К. В. Шевченко, Т. В. Вьюнова, И. Ю. Нагаев [и др.] // Биоорганическая химия. – 2011. – Т. 37. – № 4. – С. 1-8.

37. Исследование роли меланокортиновых рецепторов мозга в подавлении потребления пищи при эфирном стрессе у мышей / Н. М. Бажан, Е. В. Куликова, Е. Н. Макарова [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2015. – Т. 101. – № 12. – С. 1337-1346.

38. Кудина, О. В. Влияние олигопептидов-гомологов фрагмента АКТГ<sub>15-18</sub> на показатели углеводного обмена в условиях острого холодового стресса / О. В. Кудина, С. Ю. Штрыголь, А. А. Колобов // Вестник фармации. – 2019. – № 1 (83). – С. 64-70.

39. Левицкая, Н. Г. Меланокортиновая система / Н. Г. Левицкая, А. А. Каменский // Успехи физиологических наук. – 2009. – Т. 40. – № 1. – С. 44-65.

40. Микробное сообщество пристеночного муцина различных отделов желудочно-кишечного тракта человека / А. А. Воробьев, Ю. В. Несвижский, Е. М. Липницкий [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2004. – № 4. – С. 23-28.

41. Микроэкологические изменения муцинового слоя толстой кишки крыс при применении семакса в условиях иммобилизационного стресса / М. В. Свищева, А. Ю. Мухина, О. А. Медведева [и др.] // Астраханский медицинский журнал. – 2019. – Т. 14. – № 4. – С. 60-67.

42. Модифицирующее влияние семакса на уровень интерлейкина-1 $\beta$  при стресс-индуцированных состояниях / М. А. Самотруева, А. Л. Ясенявская, Н. Ф. Мясоедов, Л. А. Андреева // Иммунология. – 2019. – Т. 40. – № 3. – С. 5-9.

43. Морфологические изменения печени крыс при стрессе и их особенности при введении семакса / А. В. Иванов, И. И. Бобынцев, О. М. Шепелева [и др.] // Морфология. – 2017. – Т. 151. – № 1. – С. 39-43.

44. Морфологические особенности толстой кишки крыс при стресс-индуцированном дисбиозе / А. Ю. Мухина, И. И. Бобынцев, О. А. Медведева [и др.] // Человек и его здоровье. – 2019. – № 2. – С. 80-86.

45. Несвижский, Ю. В. Изучение изменчивости кишечного микробиоценоза человека в норме и при патологии / Ю. В. Несвижский // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2003. – № 1. – С. 49-54.

46. Ноотропные и анксиолитические эффекты гептапептида АКТГ<sub>6-9</sub>Pro-Gly-Pro / Н. Г. Левицкая, Н. Ю. Глазова, Е. А. Себенцова [и др.]. // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2019. – Т. 105. – № 6. – С. 761–770.

47. Оценка состояния микробиоценоза толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса и применения Селанка / А. Ю. Мухина, О. А. Медведева, М. В. Свищева [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т. 9. – № 5-6. – С. 805-810.

48. Оценка состояния микробиоценоза толстой кишки экспериментальных животных в условиях иммобилизационного стресса / А. Ю. Мухина, О. А. Медведева, М. В. Свищева [и др.] // Астраханский медицинский журнал. – 2019. – Т. 14. – № 1. – С. 54-60.

49. Патент № 2770583 С1 Российская Федерация, МПК А61К 38/08, С07К 7/06, А61Р 1/14. Применение пептида His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro для профилактики дисбиоза при хроническом иммобилизационном стрессе : № 2021124852 : заявл. 23.08.2021 : опубл. 18.04.2022 / А. О. Ворвуль, О. А. Медведева, И. И. Бобынцев [и др.] ; заявитель федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Курский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

50. Пептид АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP корректирует поведение и уровень кортикостерона у крыс в условиях хронического стресса / А. О. Ворвуль, И. И. Бобынцев, М. В. Свищева [и др.] // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2021. – Т. 107. – № 11. – С. 1359–1371.

51. Пептидная регуляция метаболических процессов при гиперхолестеринемических состояниях организма / Л. А. Ляпина, М. Е. Григорьева, Т. Ю. Оберган [и др.] // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2015. – № 6. – С. 634.

52. Полногеномное секвенирование РНК как метод оценки эффектов синтетических производных меланокортина в норме и условиях острого стресса / И. Б. Филиппенков, В. В. Ставчанский, Н. Ю. Глазова [и др.] // Медицинская генетика. – 2020. – Т. 19. – № 5. – С. 101-102.

53. Протеолиз His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro в крови и мозге крыс *in vivo* / К. В. Шевченко, И. Ю. Нагаев, В. Н. Бабаков [и др.] // Доклады Академии наук. – 2015. – Т. 464. – №3. – С. 373.

54. Рогозинская, Э. Я. Аргининсодержащие пептиды и их влияние на параметры системы гемостаза в норме у крыс / Э. Я. Рогозинская, М. Е. Григорьева, Л. А. Ляпина // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2019. – № 2. – С. 31-36.

55. Рогозинская, Э. Я. Влияние аргининсодержащих пептидов на антикоагулянтную и фибринолитическую активность плазмы крови крыс в условиях *in vitro* / Э. Я. Рогозинская, Л. А. Ляпина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. – Т. 82. – № 12. – С. 23-26.

56. Рогозинская, Э. Я. Противосвертывающие эффекты аргининсодержащих пептидов глипролинового ряда (His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro) по данным тромбоэластографического исследования / Э. Я. Рогозинская, М. Г. Ляпина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 164. – № 8. – С. 197-200.

57. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А. Н. Миронова. – Тула : Гриф и К, 2012. – 944 с.

58. Сравнительное исследование антидепрессивной активности N-концевых аналогов адренкортикотропного гормона у крыс / С. А. Додонова,

И. И. Бобынцев, А. Е. Белых [и др.] // Человек и его здоровье. – 2019. – № 4. – С. 83-89.

59. Стресс-протекторное и иммуномодулирующее действие Семакса в условиях экспериментального информационного стресса / А. Л. Ясенявская, М. А. Самотруева, Н. Ф. Мясоедов, Л. А. Андреева // Человек и его здоровье. – 2019. – № 2. – С. 57-65.

60. Устойчивость His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro к действию лейцинаминопептидазы, карбоксипептидазы и ферментным системам назальной слизи, крови и плазмы крови крыс / К. В. Шевченко, С. А. Дулов, Л. А. Андреева [и др.] // Биоорганическая химия. – 2016. – Т. 42. – № 2. – С. 171-181.

61. Устойчивость пролинсодержащих пептидов в биологических средах / К. В. Шевченко, И. Ю. Нагаев, Л. А. Андреева [и др.] // Биомедицинская химия. – 2019. – Т. 65. – № 3. – С. 180-201.

62. Хавинсон, В. Х. Лекарственные пептидные препараты: прошлое, настоящее, будущее / В. Х. Хавинсон // Клиническая медицина. – 2020. – Т. 98. – № 3. – С. 165-177.

63. Чугунов, А. В. Коррекция свободнорадикального окисления — патогенетический подход к лечению острого ишемического инсульта / А. В. Чугунов, П. Р. Камчатнов, Н. А. Михайлова // Журнал неврологии и психиатрии. – 2009. – Т. 10. – № 2. – С. 65-68.

64. Энзиматическая устойчивость и возможные молекулярные мишени синтетического пептида HFRWPGR / Т. В. Вьюнова, К. В. Шевченко, Л. А. Андреева [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т. 51. – № 5. – С. 9-12.

65. Эффекты пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-Pro-Gly-Pro на уровни про- и противовоспалительных цитокинов у крыс вистар в условиях хронического иммобилизационного стресса / А. О. Ворвуль, И. И. Бобынцев, О. А. Медведева, Ю. Э. Азарова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – Т. 174. – № 12. – С. 683-686.

66. Эффекты Семакса в моделях острого стрессогенного воздействия / Н. Ю. Глазова, Д. М. Манченко, Д. А. Виленский [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2023. – Т. 109. – № 1. – С. 119-135.
67. Эффекты хронического мягкого стресса у крыс Вистар и Август: поведение и содержание моноаминов в стриатуме / Н. А. Крупинана, Н. Н. Хлебникова, И. Н. Орлова [и др.] // Патогенез. – 2012. – Т. 10. – № 2. – С. 50–58.
68. A critical role for the melanocortin 4 receptor in stress-induced relapse to nicotine seeking in rats / X. Qi, H. Yamada, L. W. Corrie [et al.] // Addiction biology. – 2015. – Vol. 20. – № 2. – P. 324-335.
69. A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction / M. M. Kaelberer, K. L. Buchanan, M. E. Klein [et al.] // Science. – 2018. – Vol. 361. – N. 6408. – P. eaat5236.
70. Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats / M. Crumeyrolle-Arias, M. Jaglin, A. Bruneau [et al.] // Psychoneuroendocrinology. – 2014. – Vol. 42. – P. 207-217.
71. АСТН(6-9)-Pro-Gly-Pro ameliorates anxiety-like and depressive-like behaviour and gut mucosal microbiota composition in rats under conditions of chronic restraint stress / A. O. Vorvul, I. I. Bobyntsev, O. A. Medvedeva [et al.] // Neuropeptides. – 2022. – Vol. 93. – P. 102247.
72. АСТН(6–9)PGP Peptide Protects SH-SY5Y Cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tert-Butyl Hydroperoxide, and Cyanide Cytotoxicity via Stimulation of Proliferation and Induction of Prosurvival-Related Genes / M. G. Akimov, E. V. Fomina-Ageeva, P. V. Dudina [et al.]. // Molecules. – 2021. – Vol. 26. – № 7. – URL: /pmc/articles/PMC8036943/ (дата обращения: 11.09.2021).
73. АСТН<sub>6-9</sub>-PGP improves memory consolidation processes in rats / S. A. Dodonova, I. I. Bobyntsev, A. E. Belykh, A. O. Vorvul'. // Research Results in Pharmacology. – 2021. – Vol. 7. – № 1. – P. 27-32.
74. АСТН antagonists / A. J. Clark, R. Forfar, M. Hussain [et al.]. // Frontiers in Endocrinology. – 2016. – Vol. 7. – URL:



<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2016.00101/full> (дата обращения: 16.04.2021).

75. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome / G. Barbara, V. Stanghellini, R. De Giorgio [et al.] // *Gastroenterology*. – 2004. – Vol. 126. – № 3. – P. 693-702.

76. Activity of D-amino acid oxidase is widespread in the human central nervous system / J. Sasabe, M. Suzuki, N. Imanishi, S. Aiso // *Frontiers in synaptic neuroscience*. – 2014. – Vol. 6. – P. 14.

77. Adrenergic and glucocorticoid modulation of the sterile inflammatory response / S. S. Cox, K. J. Speaker, L. A. Beninson [et al.] // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2014. – Vol. 36. – P. 183-192.

78. Adult hippocampal neurogenesis is regulated by the microbiome / E. S. Ogbonnaya, G. Clarke, F. Shanahan [et al.] // *Biological psychiatry*. – 2015. – Vol. 78. – № 4. – P. e7-e9.

79. Agarwal, S. K. Glucocorticoid-Induced Type 1/Type 2 Cytokine Alterations in Humans: A Model for Stress-Related Immune Dysfunction / S. K. Agarwal, G. D. Marshall // *Journal of Interferon & Cytokine Research*. – 1998. – Vol. 18. – № 12. – P. 1059-1068.

80. Amine neuromediators, their precursors, and oxidation products in the culture of *Escherichia coli* K-12 / V. A. Shishov, T. A. Kirovskaya, V. S. Kudrin, A. V. Oleskin // *Applied biochemistry and microbiology*. – 2009. – Vol. 45. – № 5. – P. 494-497.

81. Anhedonic-like behavior correlates with IFN $\gamma$  serum levels in a two-hit model of depression / L. P. Géa, R. Colombo, E. D. d. Rosa [et al.] // *Behavioural Brain Research*. – 2019. – Vol. 373. – P. 112076.

82. Antistress action of melanocortin derivatives associated with correction of gene expression patterns in the hippocampus of male rats following acute stress / I. B. Filippenkov, V. V. Stavchansky, N. Y. Glazova [et al.]. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 18. – P. 10054. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/18/10054/htm> (дата обращения: 28.11.2021).

83. Anxiolytic-Like and Antidepressant-Like Activities of MCL0129 ((1-[(S)-2-(4-Fluorophenyl)-2-(4-isopropylpiperidin-1-yl)ethyl]-4-[4-(2-methoxynaphthalen-1-yl)butyl]piperazine), a Novel and Potent Nonpeptide Antagonist of the Melanocortin-4 Receptor / S. Chaki, S. Hirota, T. Funakoshi [et al.] // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2003. – Vol. 304. – № 2. – P. 818–826.
84. Armario, A. The forced swim test: Historical, conceptual and methodological considerations and its relationship with individual behavioral traits / A. Armario // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. – 2021. – Vol. 128. – P. 74-86.
85. Ashmarin, I. P. Glyprolines in regulatory tripeptides / I. P. Ashmarin // *Neurochemical Journal*. – 2007. – Vol. 1. – № 3. – P. 173-175.
86. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects / M. Messaoudi, R. Lalonde, N. Violle [et al.] // *British Journal of Nutrition*. – 2011. – Vol. 105. – № 5. – P. 755-764.
87. Attenuation of post-myocardial infarction depression in rats by n-3 fatty acids or probiotics starting after the onset of reperfusion / K. Gilbert, J. Arseneault-Bréard, F. Flores Monaco [et al.] // *British Journal of Nutrition*. – 2013. – Vol. 109. – № 1. – P. 50-56.
88. Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice / M. G. Gareau, E. Wine, D. M. Rodrigues [et al.]. // *Gut*. – 2011. – Vol. 60. – № 3. – P. 307-317.
89. Badawy, A. A. B. Tryptophan availability for kynurenine pathway metabolism across the life span: Control mechanisms and focus on aging, exercise, diet and nutritional supplements / A. A. B. Badawy // *Neuropharmacology*. – 2017. – Vol. 112. – P. 248-263.
90. BDNF-опосредованный механизм антистрессорного действия меланокортинов / А. Л. Ясенявская, Л. А. Андреева, Н. Ф. Мясоедов [et al.] // *Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского Биология. Химия*. – 2021. – Т. 7. – № 73. – С. 289-297.

91. BDNF expression in the hippocampus of maternally separated rats: does *Bifidobacterium breve* 6330 alter BDNF levels? / E. O'Sullivan, E. Barrett, S. Grenham [et al.]. – 2011. – Vol. 2. – N. 3. – P. 199-207.
92. Bifidobacteria exert strain-specific effects on stress-related behavior and physiology in BALB/c mice / H. M. Savignac, B. Kiely, T. G. Dinan, J. F. Cryan // *Neurogastroenterology & Motility*. – 2014. – Vol. 26. – N. 11. – P. 1615-1627.
93. Bischoff, S. C. Human mast cells, bacteria, and intestinal immunity / S. C. Bischoff, S. Krämer // *Immunological Reviews*. – 2007. – Vol. 217. – N. 1. – P. 329-337.
94. Bonaz, B. Anti-inflammatory properties of the vagus nerve: potential therapeutic implications of vagus nerve stimulation / B. Bonaz, V. Sinniger, S. Pellissier. // *The Journal of Physiology*. – 2016. – Vol. 594. – N. 20. – P. 5781-5790.
95. Brain and Gut CRF Signaling: Biological Actions and Role in the Gastrointestinal Tract / Y. Tache, M. Larauche, P.-Q. Yuan, M. Million. // *Current Molecular Pharmacology*. – 2017. – Vol. 11. – N. 1. – P. 51-71.
96. Buggy J. J. Binding of  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone to its G-protein-coupled receptor on B-lymphocytes activates the Jak/STAT pathway / J. J. Buggy. // *Biochemical Journal*. – 1998. – Vol. 331. – N. 1. – P. 211-216.
97. Buhner, S. Mast cell–nerve axis with a focus on the human gut / S. Buhner, M. Schemann // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. – 2012. – Vol. 1822. – N. 1. – P. 85-92.
98. *Campylobacter jejuni* infection increases anxiety-like behavior in the holeboard: Possible anatomical substrates for viscerosensory modulation of exploratory behavior / L. E. Goehler, S. M. Park, N. Opitz [et al.] // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2008. – Vol. 22. – N. 3. – P. 354-366.
99. Catania, A. Neuroprotective actions of melanocortins: a therapeutic opportunity / A. Catania. // *Trends in neurosciences*. – 2008. – Vol. 31. – N. 7. – P. 353-360.

100. Category fluency, latent semantic analysis and schizophrenia: a candidate gene approach / K. K. Nicodemus, B. Elvevåg, P. W. Foltz [et al.] // *Cortex*. – 2014. – Vol. 55. – P. 182-191.

101. Central role of the gut epithelial barrier in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation: lessons learned from animal models and human genetics / L. Pastorelli, C. De Salvo, J. R. Mercado [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2013. – Vol. 4. – P. 280.

102. Cervenka, I. Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health / I. Cervenka, L.Z. Agudelo, J.L. Ruas // *Science*. – 2017. – Vol. 357. – N. 6349. – P. eaaf9794.

103. Changes in the Activity and Concentration of Superoxide Dismutase Isoenzymes (Cu/Zn SOD, MnSOD) in the Blood of Healthy Subjects and Patients with Acute Pancreatitis / M. Ściskalska, M. Ołdakowska, G. Marek, H. Milnerowicz // *Antioxidants* 2020, Vol. 9, Page 948. – 2020. – Vol. 9. – N. 10. – P. 948. – URL: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/10/948/htm> (дата обращения: 10.11.2021).

104. Changes in the nociceptive response to thermal stimulation in rats following administration of N-terminal analogs of the adrenocorticotrophic hormone / S. A. Dodonova, I. I. I. Bobyntsev, A. A. E. Belykh [et al.]. // *Bulletin of Russian State Medical University*. – 2019. – N. 6. – P. 33-36.

105. Chronic Early-life Stress in Rat Pups Alters Basal Corticosterone, Intestinal Permeability, and Fecal Microbiota at Weaning: Influence of Sex / N. Moussaoui, J. P. Jacobs, M. Larauche [et al.]. // *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. – 2017. – Vol. 23. – N. 1. – P. 135.

106. Chronic peripheral administration of corticotropin-releasing factor causes colonic barrier dysfunction similar to psychological stress / A. A. Teitelbaum, M. G. Gareau, J. Jury [et al.] // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2008. – Vol. 295. – N. 3. – P. G452-G459.

107. Chronic restraint stress induced changes in colonic homeostasis-related indexes and tryptophan-kynurenine metabolism in rats / C.-C. C. Li, L. Gan, Y. Tan [et al.]. // *Journal of Proteomics*. – 2021. – Vol. 240. – N. 151. – P. 104190.

108. Chronic Restraint Stress Induces Gastric Mucosal Inflammation with Enhanced Oxidative Stress in a Murine Model / M. Yisireyli, A. Alimujiang, A. Aili [et al.]. // *Psychology Research and Behavior Management*. – 2020. – Vol. 13. – P. 383-393.
109. Cohen, S. A Stage Model of Stress and Disease / S. Cohen, P. J. Gianaros, S. B. Manuck. – 2016. – Vol. 11. – № 4. – P. 456-463.
110. Collective unconscious: how gut microbes shape human behavior / T. G. Dinan, R. M. Stilling, C. Stanton, J. F. Cryan // *Journal of psychiatric research*. – 2015. – Vol. 63. – P. 1-9.
111. Collins, S. M. Intestinal bacteria influence brain activity in healthy humans / S. M. Collins, P. Bercik. // *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. – 2013. – Vol. 10. – N. 6. – P. 326-327.
112. Collins, S. M. The adoptive transfer of behavioral phenotype via the intestinal microbiota: experimental evidence and clinical implications / S. M. Collins, Z. Kassam, P. Bercik // *Current opinion in microbiology*. – 2013. – Vol. 16. – N. 3. – P. 240-245.
113. Commensal bacteria and MAMPs are necessary for stress-induced increases in IL-1 $\beta$  and IL-18 but not IL-6, IL-10 or MCP-1 / T. Maslanik, K. Tannura, L. Mahaffey [et al.] // *PloS one*. – 2012. – Vol. 7. – N. 12. – P. e50636.
114. Comparative effects of intranasal neuropeptide Y and HS014 in preventing anxiety and depressive-like behavior elicited by single prolonged stress / E. L. Sabban, L. I. Serova, L. G. Alaluf [et al.] // *Behavioural brain research*. – 2015. – Vol. 295. – P. 9-16.
115. Composition of Colon Microbiota in Rats Treated with ACTH(4-7)-PGP Peptide (Semax) under Conditions of Restraint Stress / M. V. Svishcheva, A. Y. Mukhina, O. A. Medvedeva [et al.]. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2020. – Vol. 169. – N. 3. – P. 357-360.
116. Correction of Long-Lasting Negative Effects of Neonatal Isolation in White Rats Using Semax / M. A. Volodina, E. A. Sebentsova, N. Y. Glazova [et al.]. // *Acta Naturae*. – 2012. – Vol. 4. – N. 1. – P. 86-92.

117. Cortagine, a CRF1 agonist, induces stresslike alterations of colonic function and visceral hypersensitivity in rodents primarily through peripheral pathways / M. Larauche, G. Gourcerol, L. Wang [et al.]. // *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2009. – Vol. 297. – N. 1. – P. 215-227.

118. Corticotropin-releasing factor secretion from dendritic cells stimulated by commensal bacteria / M. Hojo, T. Ohkusa, H. Tomeoku [et al.] // *World Journal of Gastroenterology: WJG*. – 2011. – Vol. 17. – N. 35. – P. 4017.

119. Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat / J. Santos, P. R. Saunders, N. P. M. Hanssen [et al.] // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 1999. – Vol. 277. – N. 2. – P. G391-G399.

120. Corticotropin releasing factor receptor 1 (CRF1) and CRF2 agonists exert an anti-inflammatory effect during the early phase of inflammation suppressing LPS-induced TNF- $\alpha$  release from macrophages via induction of COX-2 and PGE2 / C. Tsatsanis, A. Androulidaki, E. Dermizaki [et al.] // *Journal of cellular physiology*. – 2007. – Vol. 210. – N. 3. – P. 774-783.

121. Cortisol levels and risk for psychosis: initial findings from the North American prodrome longitudinal study / E. F. Walker, H. D. Trotman, B. D. Pearce [et al.] // *Biological psychiatry*. – 2013. – Vol. 74. – N. 6. – P. 410-417.

122. Cryan, J. F. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour / J. F. Cryan, T. G. Dinan // *Nature reviews neuroscience*. – 2012. – Vol. 13. – N. 10. – P. 701-712.

123. Detection of neurotransmitter amines in microorganisms with the use of high-performance liquid chromatography. / E. A. Tsavkelova, I. V Botvinko, V. S. Kudrin, A. V Oleskin // *Doklady Biochemistry*. – 2000. – Vol. 372. – P. 115-117.

124. Determination of enriched histone modifications in non-genic portions of the human genome / J. A. Rosenfeld, Z. Wang, D. E. Schones [et al.] // *BMC genomics*. – 2009. – Vol. 10. – N. 1. – P. 1-11.

125. Dietary 2'-fucosyllactose enhances operant conditioning and long-term potentiation via gut-brain communication through the vagus nerve in rodents / E. Vazquez, A. Barranco, M. Ramirez [et al.] // PLoS One. – 2016. – Vol. 11. – N. 11. – P. e0166070.

126. Dietary intake of heat-killed *Lactococcus lactis* H61 delays age-related hearing loss in C57BL/6J mice / H. Oike, A. Aoki-Yoshida, H. Kimoto-Nira [et al.] // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – N. 1. – P. 23556.

127. Dinan, T.G. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease / T. G. Dinan, J. F. Cryan // Gastroenterology Clinics of North America. – 2017. – Vol. 46. – N. 1. – P. 77-89.

128. Early Life Stress Alters Behavior, Immunity, and Microbiota in Rats: Implications for Irritable Bowel Syndrome and Psychiatric Illnesses / S. M. O'Mahony, J. R. Marchesi, P. Scully [et al.]. // Biological Psychiatry. – 2009. – Vol. 65. – N. 3. – P. 263-267.

129. Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine / F. Smith, J. E. Clark, B. L. Overman [et al.] // American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2010. – Vol. 298. – N. 3. – P. G352-G363.

130. Effects of ACTH<sub>6-9</sub>-Pro-Gly-Pro Peptide on the Levels of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Wistar Rats under Conditions of Chronic Restraint Stress / A. O. Vorvul, I.I. Bobyntsev, O.A. Medvedeva, Y.E. Azarova. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2023. – Vol. 174. – N. 6. – P. 716-718.

131. Effects of electrical lesion of basolateral amygdala nucleus on rat anxiety-like behaviour under acute, sub-chronic, and chronic stresses / H. Ranjbar, M. Radahmadi, P. Reisi, H. Alaei. // Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. – 2017. – Vol. 44. – N. 4. – P. 470-479.

132. Effects of His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro Peptide on Free-Radical Oxidation Processes in Conditions of Chronic Restraint Stress / A. O. Vorvul, I. I. Bobyntsev, O. A. Medvedeva [et al.] // Bulletin of Russian State Medical University. – 2021. – N. 6. – P. 61-66.

133. Effects of Melanocortins on the Behavior of Rats in the Test of Elevated Plus-Maze and Experimentally Induced Social Isolation / A. Yasenyavskaya, M. Samotrueva, A. Tsibizova [et al.] // *Archiv Euromedica*. – 2020. – Vol. 10. – N. 4. – P. 35-38.

134. Effects of neuropeptides on behavior of rats in open field test and experimentally induced social stress / A. Yasenyavskaya, M. Samotrueva, A. Tsibizova [et al.] // *Arch. Euromedica*. – 2020. – Vol. 10. – N. 3. – P. 25-28.

135. Effects of peptides ACTH<sub>6-9</sub>-PGP and ACTH<sub>4-7</sub>-PGP on anxiety levels in rats in punished and unpunished behavior / S. A. Dodonova, I. I. Bobyntsev, A. E. Belykh [et al.] // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2020. – Vol. 50. – N. 9. – P. 1203-1208.

136. Effects of repeated restraint stress on gastric motility in rats / J. Zheng, A. Dobner, R. Babygirija [et al.]. // *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. – 2009. – Vol. 296. – N. 5. – P. 1358-1365.

137. Effects of the ACTH<sub>6-9</sub>-Pro-Gly-Pro peptide on the morphofunctional state of rat colon under conditions of chronic restraint stress / A. O. Vorvul, I. I. Bobyntsev, E. S. Mishina [et al.] // *Bulletin of Siberian Medicine*. – 2023. – Vol. 22. – N. 2. – P. 14-20.

138. Enzymatic stability and possible molecular targets of synthetic peptide HFRWPGP / T. V. V'yunova, K. V. Shevchenko, L. A. Andreeva [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2017. – Vol. 51. – N. 5. – P. 337-339.

139. Eosinophils alter colonic epithelial barrier function: role for major basic protein / G. T. Furuta, E. E. S. Nieuwenhuis, J. Karhausen [et al.] // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2005. – Vol. 289. – N. 5. – P. G890-G897.

140. Eosinophils express muscarinic receptors and corticotropin-releasing factor to disrupt the mucosal barrier in ulcerative colitis / C. Wallon, M. Persborn, M. Jönsson [et al.] // *Gastroenterology*. – 2011. – Vol. 140. – N. 5. – P. 1597-1607.



141. *Escherichia coli* has two homologous glutamate decarboxylase genes that map to distinct loci / D. K. Smith, T. Kassam, B. Singh, J. F. Elliott // *Journal of bacteriology*. – 1992. – Vol. 174. – N. 18. – P. 5820-5826.

142. Evaluation of biomarkers of stress in chronic stress-exposed comorbid depression model Wistar rats / M. Gokul, N. A. Kumar, R. D. Kini [et al.]. // *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. – 2020. – Vol. 30. – N. 5.

143. Evidence for a shift in the Th-1 to Th-2 cytokine response associated with chronic stress and aging / R. Glaser, R. C. MacCallum, B. F. Laskowski [et al.] // *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. – 2001. – Vol. 56. – N. 8. – P. M477-M482.

144. Evolutional study on acetylcholine expression / Y. Horiuchi, R. Kimura, N. Kato [et al.]. // *Life sciences*. – 2003. – Vol. 72. – N. 15. – P. 1745-1756.

145. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced immunomodulation / M. T. Bailey, S. E. Dowd, J. D. Galley [et al.]. // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2011. – Vol. 25. – N. 3. – P. 397-407.

146. Fleshner, M. The gut microbiota: a new player in the innate immune stress response? / M. Fleshner // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2011. – Vol. 25. – N. 3. – P. 395-396

147. Forsythe P. Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease Chapter 17 / P. Forsythe, J. Bienenstock, W. A. Kunze // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2014. – Vol. 817. – P. 115-133.

148. Foster, J. A. Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression / J. A. Foster, K.-A. M. Neufeld // *Trends in neurosciences*. – 2013. – Vol. 36. – N. 5. – P. 305-312.

149. Foster, J. A. Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome / J. A. Foster, L. Rinaman, J. F. Cryan. // *Neurobiology of Stress*. – 2017. – Vol. 7. – P. 124-136.

150. Furness, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology / J. B. Furness // *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. – 2012. – Vol. 9. – N. 5. – P. 286-294.

151. GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota / P. Strandwitz, K. H. Kim, D. Terekhova [et al.] // *Nature microbiology*. – 2019. – Vol. 4. – N. 3. – P. 396-403.

152. GABA-producing *Bifidobacterium dentium* modulates visceral sensitivity in the intestine / K. Pokusaeva, C. Johnson, B. Luk [et al.] // *Neurogastroenterology & Motility*. – 2017. – Vol. 29. – N. 1. – P. e12904.

153. Galley, J. D. Impact of stressor exposure on the interplay between commensal microbiota and host inflammation / J. D. Galley, M. T. Bailey // *Gut microbes*. – 2014. – Vol. 5. – N. 3. – P. 390-396.

154. Gallo-Payet, N. 60 YEARS OF POMC: Adrenal and extra-adrenal functions of ACTH / N. Gallo-Payet // *Journal of Molecular Endocrinology*. – 2016. – Vol. 56. – N. 4. – P. T135-T156

155. Gareau, M. G. Neonatal maternal separation of rat pups results in abnormal cholinergic regulation of epithelial permeability / M. G. Gareau, J. Jury, M. H. Perdue. // *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2007. – Vol. 293. – N. 1. – P. 198-203.

156. Gareau, M. Pathophysiological Mechanisms of Stress-Induced Intestinal Damage / M. Gareau, M. Silva, M. Perdue. // *Current Molecular Medicine*. – 2008. – Vol. 8. – N. 4. – P. 274-281.

157. Gershon, M. D. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract / M. D. Gershon. // *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. – 2013. – Vol. 20. – N. 1. – P. 14-21.

158. Ghalwash, M. Possible cardioprotective role of NaHS on ECG and oxidative stress markers in an unpredictable chronic mild stress model in rats / M. Ghalwash, A. Elmasry, N. M. Abo-Elmaaty Omar. // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2020. – Vol. 99. – N. 3. – P. 321-327.

159. Gosselin, D. MyD88 signaling in brain endothelial cells is essential for the neuronal activity and glucocorticoid release during systemic inflammation / D. Gosselin, S. Rivest // *Molecular psychiatry*. – 2008. – Vol. 13. – N. 5. – P. 480-497.
160. Gould, T. D. The Open Field Test / T. D. Gould, D. T. Dao, C. E. Kovacsics. // *Neuromethods*. – 2009. – Vol. 42. – P. 1-20.
161. Grigorjeva, M. E. Anticoagulation and antiplatelet effects of semax under conditions of acute and chronic immobilization stress / M. E. Grigorjeva, L. A. Lyapina // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2010. – Vol. 149. – N. 1. – P. 44-46.
162. Growing up in a bubble: using germ-free animals to assess the influence of the gut microbiota on brain and behavior / P. Luczynski, K.-A. McVey Neufeld, C. S. Oriach [et al.] // *International Journal of Neuropsychopharmacology*. – 2016. – Vol. 19. – N. 8. – P. 1-17
163. Guthrie, G. D. gamma-Aminobutyric acid uptake by a bacterial system with neurotransmitter binding characteristics / G. D. Guthrie, C. S. Nicholson-Guthrie // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1989. – Vol. 86. – N. 19. – P. 7378-7381.
164. Heim, C. Neurobiology of posttraumatic stress disorder / C. Heim, C. B. Nemeroff // *CNS spectr*. – 2009. – Vol. 14. – N. 1 Suppl 1. – P. 13-24.
165. Heptapeptide semax attenuates the effects of chronic unpredictable stress in rats / K. A. Yatsenko, N. Y. Glazova, L. S. Inozemtseva [et al.]. // *Doklady Biological Sciences*. – 2013. – Vol. 453. – N. 1. – P. 353-357.
166. Higgins, G. A. The role of epigenomic regulatory pathways in the gut-brain axis and visceral hyperalgesia / G. A. Higgins, S. Hong, J. W. Wiley // *Cellular and Molecular Neurobiology*. – 2021. – P. 1-16.
167. Histamine Derived from Probiotic *Lactobacillus reuteri* Suppresses TNF via Modulation of PKA and ERK Signaling / C. M. Thomas, T. Hong, J. P. van Pijkeren [et al.] // *PLOS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – N. 2. – P. e31951.

168. Histamine H2 Receptor-Mediated Suppression of Intestinal Inflammation by Probiotic *Lactobacillus reuteri* / G. Chunxu, M. Angela, R. David [et al.] // *mBio*. – 2022. – Vol. 6. – N. 6. – P. e01358-15.

169. Histamine receptor 2 is a key influence in immune responses to intestinal histamine-secreting microbes / R. Ferstl, R. Frei, E. Schiavi [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2014. – Vol. 134. – N. 3. – P. 744-746.e3.

170. Histone H3K9 methylation regulates chronic stress and IL-6–induced colon epithelial permeability and visceral pain / J. W. Wiley, Y. Zong, G. Zheng [et al.] // *Neurogastroenterology & Motility*. – 2020. – Vol. 32. – N. 12. – P. e13941.

171. Hosoi T. Electrical stimulation of afferent vagus nerve induces IL-1 $\beta$  expression in the brain and activates HPA axis / T. Hosoi, Y. Okuma, Y. Nomura // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2000. – Vol. 279. – N. 1. – P. R141-R147.

172. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS / D. Erny, A. L. H. de Angelis, D. Jaitin [et al.] // *Nature neuroscience*. – 2015. – Vol. 18. – N. 7. – P. 965-977.

173. Host microbiota modulates development of social preference in mice / T. Arentsen, H. Raith, Y. Qian [et al.] // *Microbial ecology in health and disease*. – 2015. – Vol. 26. – N. 0. – P. 29719.

174. Howren, M. B. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: A meta-analysis / M. B. Howren, D. M. Lamkin, J. Suls. // *Psychosomatic Medicine*. – 2009. – Vol. 71. – N. 2. – P. 171-186.

175. Human mast cells express corticotropin-releasing hormone (CRH) receptors and CRH leads to selective secretion of vascular endothelial growth factor / J. Cao, N. Papadopoulou, D. Kempuraj [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2005. – Vol. 174. – N. 12. – P. 7665-7675.

176. Hyland, N. P. A gut feeling about GABA: focus on GABAB receptors / N. P. Hyland, J. F. Cryan // *Frontiers in pharmacology*. – 2010. – Vol. 1. – P. 124.

177. Ighodaro, O. M. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in

the entire antioxidant defence grid / O. M. Ighodaro, O. A. Akinloye. // Alexandria Journal of Medicine. – 2019. – Vol. 54. – N. 4. – P. 287-293.

178. Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome / M. Matsumoto, R. Kibe, T. Ooga [et al.] // Scientific reports. – 2012. – Vol. 2. – N. 1. – P. 1-10.

179. Increased IgA and IgM responses against gut commensals in chronic depression: further evidence for increased bacterial translocation or leaky gut / M. Maes, M. Kubera, J.-C. Leunis, M. Berk // Journal of affective disorders. – 2012. – Vol. 141. – N. 1. – P. 55-62.

180. Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis / J. M. Yano, K. Yu, G. P. Donaldson [et al.] // Cell. – 2015. – Vol. 161. – N. 2. – P. 264-276.

181. Induction of anxiety-like behavior in mice during the initial stages of infection with the agent of murine colonic hyperplasia *Citrobacter rodentium* / M. Lyte, W. Li, N. Opitz [et al.] // Physiology & behavior. – 2006. – Vol. 89. – N. 3. – P. 350-357.

182. Influence of ACTG<sub>4-7</sub>-PGP (Semax) on Morphofunctional State of Hepatocytes in Chronic Emotional and Painful Stress / A. V Ivanov, I. I. Bobyntsev, O. M. Shepeleva [et al.] // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2017. – Vol. 163. – P. 105-108.

183. Influence of semax on the emotional state of white rats in the norm and against the background of cholecystokinin-tetrapeptide action / N. G. Levitskaya, D. A. Vilenskii, E. A. Sebentsova [et al.]. // Biology Bulletin. – 2010. – Vol. 37. – N. 2. – P. 186-192.

184. Ingestion of *Lactobacillus* strain reduces anxiety and improves cognitive function in the hyperammonemia rat / J. Luo, T. Wang, S. Liang [et al.] // Science China Life Sciences. – 2014. – Vol. 57. – N. 3. – P. 327-335.

185. Interaction of dual intracellular signaling pathways activated by the melanocortin-3 receptor. / Y. Konda, I. Gantz, J. DelValle [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 1994. – Vol. 269. – N. 18. – P. 13162-13166.

186. Intranasal infusion of melanocortin receptor four (MC4R) antagonist to rats ameliorates development of depression and anxiety related symptoms induced by single prolonged stress / L. I. Serova, M. Laukova, L. G. Alaluf, E. L. Sabban // Behavioural brain research. – 2013. – Vol. 250. – P. 139-147.

187. Investigating the role of the central melanocortin system in stress and stress-related disorders / E. Micioni Di Bonaventura, L. Botticelli, F. Del Bello [et al.] // Pharmacological Research. – 2022. – Vol. 185. – P. 106521.

188. Involvement of Inflammasome Activation in Lipopolysaccharide-induced Mice Depressive-like Behaviors / Y. Zhang, L. Liu, Y.-L. Peng [et al.] // CNS Neuroscience & Therapeutics. – 2014. – Vol. 20. – N. 2. – P. 119-124.

189. Involvement of the melanocortin MC4 receptor in stress-related behavior in rodents / S. Chaki, S. Ogawa, Y. Toda [et al.] // European Journal of Pharmacology. – 2003. – Vol. 474. – N. 1. – P. 95-101.

190. Involvement of the microbiota-gut-brain axis in chronic restraint stress: disturbances of the kynurenine metabolic pathway in both the gut and brain / Y. Deng, M. Zhou, J. Wang [et al.]. // Gut Microbes. – 2021. – Vol. 13. – N. 1. – P. 1-16.

191. Involvement of  $\alpha$ -MSH in the social isolation induced anxiety-and depression-like behaviors in rat / D. M. Kokare, M. P. Dandekar, P. S. Singru [et al.] // Neuropharmacology. – 2010. – Vol. 58. – N. 7. – P. 1009-1018.

192. Katerji, M. Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field / M. Katerji, M. Filippova, P. Duerksen-Hughes // Oxid Med Cell Longev. – 2019. – Vol. 2019. – P. 1279250

193. Kawasaki, T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways / T. Kawasaki, T. Kawai. // Frontiers in Immunology. – 2014. – Vol. 5.– URL: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00461> (дата обращения: 03.05.2022).

194. Keita, Å. V. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors / Å. V. Keita, J. D. Söderholm // Neurogastroenterology & Motility. – 2010. – Vol. 22. – N. 7. – P. 718-733.

195. Kingsley, T. R. The influence of dietary restriction, germ-free status, and aging on adrenal catecholamines in Lobund-Wistar rats / T. R. Kingsley, N. P. Nekvasil, D. L. Snyder // *Journal of Gerontology*. – 1991. – Vol. 46. – N. 4. – P. B135-B141.

196. Koon, H. W. Immunomodulatory properties of substance P: the gastrointestinal system as a model / H. W. Koon, C. Pothoulakis // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 1088. – N. 1. – P. 23-40.

197. Koroleva, S. V. Semax as a Universal Drug for Therapy and Research / S. V. Koroleva, N. F. Myasoedov. // *Biology Bulletin*. – 2019. – Vol. 45. – N. 6. – P. 589-600.

198. Kraeuter, A.-K. The elevated plus maze test for measuring anxiety-like behavior in rodents / A.-K. Kraeuter, P. C. Guest, Z. Sarnyai // *Pre-Clinical Models: Techniques and Protocols*. – 2019. – P. 69-74.

199. Kraeuter, A.-K., Guest P.C., Sarnyai Z. The Forced Swim Test for Depression-Like Behavior in Rodents. *Methods in Molecular Biology*. – 2019. – Vol. 1916. – P. 75-80.

200. Kynurenine pathway metabolism and immune activation: Peripheral measurements in psychiatric and co-morbid conditions / B. Strasser, K. Becker, D. Fuchs, J. M. Gostner // *Neuropharmacology*. – 2017. – Vol. 112. – P. 286-296.

201. *Lactobacillus plantarum* ameliorates colonic epithelial barrier dysfunction by modulating the apical junctional complex and PepT1 in IL-10 knockout mice / H.-Q. Chen, J. Yang, M. Zhang [et al.] // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2010. – Vol. 299. – N. 6. – P. G1287-G1297.

202. *Lactobacillus reuteri* induces gut intraepithelial CD4<sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> T cells / L. Cervantes-Barragan, J. N. Chai, M. D. Tianero [et al.] // *Science*. – 2017. – Vol. 357. – N. 6353. – P. 806-810.

203. Liu, Z. High serum levels of 8-OHdG are an independent predictor of post-stroke depression in Chinese stroke survivors / Z. Liu, Y. Cai, J. He. // *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. – 2018. – Vol. 14. – P. 587-596.

204. Low, M. J. Receptors for the melanocortin peptides in the central nervous system / M. J. Low, R. B. Simerly, R. D. Cone // *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. – 1994. – Vol. 1. – N. 1. – P. 79-88.

205. Lymphocytes from Chronically Stressed Mice Confer Antidepressant-Like Effects to Naive Mice / R. A. Brachman, M. L. Lehmann, D. Maric, M. Herkenham // *The Journal of Neuroscience*. – 2015. – Vol. 35. – N. 4. – P. 1530 LP - 1538.

206. Lyte, M. The role of microbial endocrinology in infectious disease / M. Lyte // *Journal of Endocrinology*. – 1993. – Vol. 137. – N. 3. – P. 343-345.

207. Lyte, M. Anxiogenic effect of subclinical bacterial infection in mice in the absence of overt immune activation / M. Lyte, J. J. Varcoe, M. T. Bailey // *Physiology & behavior*. – 1998. – Vol. 65. – N. 1. – P. 63-68.

208. Martins-de-Souza, D. Proteome and transcriptome analysis suggests oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia / D. Martins-de-Souza // *Journal of Psychiatric Research*. – 2010. – Vol. 44. – N. 3. – P. 149-156.

209. Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa / R. H. Stead, M. F. Dixon, N. H. Bramwell [et al.] // *Gastroenterology*. – 1989. – Vol. 97. – N. 3. – P. 575-585.

210. McEwen, B. S. Central effects of stress hormones in health and disease: understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators / B. S. McEwen. // *European journal of pharmacology*. – 2008. – Vol. 583. – N. 2-3. – P. 174-185.

211. MCL0042: A nonpeptidic MC4 receptor antagonist and serotonin reuptake inhibitor with anxiolytic- and antidepressant-like activity / S. Chaki, Y. Oshida, S. Ogawa [et al.] // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. – 2005. – Vol. 82. – N. 4. – P. 621-626.

212. Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases / A. Fasano, T. Shea-Donohue. // *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology*. – 2005. – Vol. 2. – N. 9. – P. 416-422.



213. Mechanisms underlying microbial-mediated changes in social behavior in mouse models of autism spectrum disorder / M. Sgritta, S. W. Dooling, S. A. Buffington [et al.] // *Neuron*. – 2019. – Vol. 101. – N. 2. – P. 246-259.

214. Melanocortin-4 receptor in the medial amygdala regulates emotional stress-induced anxiety-like behaviour, anorexia and corticosterone secretion / J. Liu, J. C. Garza, W. Li, X.-Y. Lu // *International Journal of Neuropsychopharmacology*. – 2013. – Vol. 16. – N. 1. – P. 105-120.

215. Melanocortin Receptor Accessory Proteins (MRAPs): Functions in the melanocortin system and beyond / A. A. J. Rouault, D. K. Srinivasan, T. C. Yin [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. – 2017. – Vol. 1863. – N. 10, Part A. – P. 2462-2467.

216. Melanocortin receptors as novel effectors of macrophage responses in inflammation / H. B. Patel, T. Montero-Melendez, K. V. Greco, M. Perretti // *Frontiers in Immunology*. – 2011. – Vol. 2. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2011.00041/full> (дата обращения 20.10.2022)

217. Melanocortin Regulation of Inflammation / W. Wang, D.-Y. Y. Guo, Y.-J. J. Lin, Y.-X. X. Tao // *Frontiers in Endocrinology*. – 2019. – Vol. 10. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2019.00683/full> (дата обращения 20.10.2022)

218. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites / W. R. Wikoff, A. T. Anfora, J. Liu [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – Vol. 106. – N. 10. – P. 3698-3703.

219. Microbiota alteration is associated with the development of stress-induced despair behavior / I. A. Marin, J. E. Goertz, T. Ren [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – N. 1. – P. 43859.

220. Microbiota is essential for social development in the mouse / L. Desbonnet, G. Clarke, F. Shanahan [et al.] // *Molecular psychiatry*. – 2014. – Vol. 19. – N. 2. – P. 146-148.

221. Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 $\beta$ -related inflammation in prefrontal cortex of depressive rats / Y. Pan, X. Y. Chen, Q. Y. Zhang, L. D. Kong // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2014. – Vol. 41. – N. 1. – P. 90-100.

222. Morphofunctional State of the Large Intestine in Rats under Conditions of Restraint Stress and Administration of Peptide ACTH(4-7)-PGP (Semax) / M. V. Svishcheva, Y. S. Mishina, O. A. Medvedeva [et al.]. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2020 170:3. – 2021. – Vol. 170. – N. 3. – P. 384-388.

223. Morphological Changes in the Large Intestine of Rats Subjected to Chronic Restraint Stress and Treated with Selank / A. Y. Mukhina, E. S. Mishina, I. I. Bobyntsev [et al.]. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2020 169:2. – 2020. – Vol. 169. – N. 2. – P. 281-285.

224. Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress / J. D. Soderholm, D. A. Yates, M. G. Gareau [et al.] // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2002. – Vol. 283. – N. 6. – P. G1257-G1263.

225. Nerve growth factor mediates alterations of colonic sensitivity and mucosal barrier induced by neonatal stress in rats / F. Barreau, C. Cartier, L. Ferrier [et al.] // *Gastroenterology*. – 2004. – Vol. 127. – N. 2. – P. 524-534.

226. Neuroprotective Potential of Peptides HFRWPGP (ACTH6–9PGP), KKRRPGP, and PyrRP in Cultured Cortical Neurons at Glutamate Excitotoxicity / Z. V. Bakaeva, A. M. Surin, N. V. Lizunova [et al.]. – 2020. – Vol. 491. – N. 1. – P. 62-66.

227. New aspects on the melanocortins and their receptors / J. E. S. Wikberg, R. Muceniece, I. Mandrika [et al.]. // *Pharmacological Research*. – 2000. – Vol. 42. – N. 5. – P. 393-420.

228. New melanocortin-like peptide of *E. coli* can suppress inflammation via the mammalian melanocortin-1 receptor (MC1R): Possible endocrine-like function for microbes of the gut / X. Qiang, A. S. Liotta, J. Shiloach [et al.] // *NPJ. Biofilms and Microbiomes*. – 2017. – Vol. 3. – N. 1. – P. 1-10.

229. Novel binding motif of ACTH analogues at the melanocortin receptors / Y. Yang, V. Hruby, M. Chen [et al.]. // *Biochemistry*. – 2009. – Vol. 48. – N. 41. – P. 9775-9784.

230. Novoselova, T. V. Pathophysiology of melanocortin receptors and their accessory proteins. Vol. 32 / T. V. Novoselova, L. F. Chan, A. J. L. Clark. – Bailliere Tindall Ltd, 2018. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29678289/> (дата обращения: 17.02.2021).

231. O'Hara, A. M. The gut flora as a forgotten organ / A. M. O'Hara, F. Shanahan // *EMBO reports*. – 2006. – Vol. 7. – N. 7. – P. 688-693.

232. Overman, E. L. CRF induces intestinal epithelial barrier injury via the release of mast cell proteases and TNF- $\alpha$  / E. L. Overman, J. E. Rivier, A. J. Moeser. – Text: electronic // *PloS one*. – 2012. – Vol. 7. – N. 6. – P. e39935. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0039935> (дата обращения: 23.09.2021).

233. Özoğul, F. Production of biogenic amines by *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Hafnia alvei* using a rapid HPLC method / F. Özoğul // *European Food Research and Technology*. – 2004. – Vol. 219. – N. 5. – P. 465-469.

234. Pathways involved in gut mucosal barrier dysfunction induced in adult rats by maternal deprivation: corticotrophin-releasing factor and nerve growth factor interplay / F. Barreau, C. Cartier, M. Leveque [et al.]. // *The Journal of physiology*. – 2007. – Vol. 580. – N. 1. – P. 347-356.

235. Pennisi, E. Meet the psychobiome / E. Pennisi. // *Science (New York, N.Y.)*. – 2020. – Vol. 368. – N. 6491. – P. 570-573.

236. Peptide regulation of metabolic processes under hypercholesterinemia conditions of an organism / L. A. Lyapina, M. E. Grigor'eva, T. Y. Obergan [et al.] // *Biology Bulletin*. – 2015. – Vol. 42. – N. 6. – P. 546-555.

237. Perlikowska, R. Whether short peptides are good candidates for future neuroprotective therapeutics? / R. Perlikowska // *Peptides*. – 2021. – Vol. 140. – P. 170528

238. Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction / J. Demaude, C. Salvador-Cartier, J. Fioramonti [et al.]. // *Gut*. – 2006. – Vol. 55. – N. 5. – P. 655-661.

239. Physical and psychological stress in rats enhances colonic epithelial permeability via peripheral CRH / P. R. Saunders, J. Santos, N. P. M. Hanssen [et al.] // *Digestive diseases and sciences*. – 2002. – Vol. 47. – N. 1. – P. 208-215.

240. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice / N. Sudo, Y. Chida, Y. Aiba [et al.]. // *The Journal of Physiology*. – 2004. – Vol. 558. – N. 1. – P. 263-275.

241. Prenatal stress-induced alterations in major physiological systems correlate with gut microbiota composition in adulthood / A. V. Golubeva, S. Crampton, L. Desbonnet [et al.] // *Psychoneuroendocrinology*. – 2015. – Vol. 60. – P. 58-74.

242. Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats / A. Ait-Belgnaoui, H. Durand, C. Cartier [et al.] // *Psychoneuroendocrinology*. – 2012. – Vol. 37. – N. 11. – P. 1885-1895.

243. Prolonged restraint stress increases IL-6, reduces IL-10, and causes persistent depressive-like behavior that is reversed by recombinant IL-10 / J. L. Voorhees, A. J. Tarr, E. S. Wohleb [et al.] // *PloS one*. – 2013. – Vol. 8. – N. 3. – P. e58488.

244. Protective antithrombotic effects of proline-containing peptides under the influence of stress on the animal organism / L. A. Lyapina, M. E. Grigor'eva, L. A. Andreeva, N. F. Myasoedov. // *Biology Bulletin*. – 2010. – Vol. 37. – N. 4. – P. 392-396.

245. Proteolysis of His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro in the blood and brain of rats in vivo / K. V. Shevchenko, I. Y. Nagaev, V. N. Babakov [et al.]. // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2015. – Vol. 464. – P. 301-304.

246. Psychoactive bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) elicits rapid frequency facilitation in vagal afferents / A. Perez-Burgos, B. Wang, Y.-K. Mao

[et al.] // American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2012. – Vol. 304. – N. 2. – P. G211-G220.

247. Psychological stress disrupts intestinal epithelial cell function and mucosal integrity through microbe and host-directed processes / J. M. Allen, A. R. Mackos, R. M. Jagers [et al.] // Gut Microbes. – 2022. – Vol. 14. – N. 1. – P. 2035661.

248. Psychological stress induces eosinophils to produce corticotrophin releasing hormone in the intestine / P.-Y. Zheng, B.-S. Feng, C. Oluwole [et al.] // Gut. – 2009. – Vol. 58. – N. 11. – P. 1473-1479.

249. Psychotropic effects of Lactobacillus plantarum PS128 in early life-stressed and naïve adult mice / Y. W. Liu, W. H. Liu, C. C. Wu [et al.] // Brain Research. – 2016. – Vol. 1631. – P. 1-12.

250. Role of corticotropin-releasing factor in gastrointestinal permeability / B. K. Rodiño-Janeiro, C. Alonso-Cotoner, M. Pigrau [et al.] // Journal of Neurogastroenterology and Motility. – 2015. – Vol. 21, No. 1. – P. 33-50.

251. Receptor-mediated modulation of murine mast cell function by  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone / S. Adachi, T. Nakano, H. Vliagoftis, D. D. Metcalfe // Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950). – 1999. – Vol. 163. – N. 6. – P. 3363-338.

252. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice / K. M. Neufeld, N. Kang, J. Bienenstock, J. A. Foster // Neurogastroenterology & Motility. – 2011. – Vol. 23. – N. 3. – P. 255-e119.

253. Regional differences in chronic stress-induced alterations in mast cell and protease-activated receptor-2-positive cell numbers in the colon of Ws/Ws rats / Y. S. Kim, M. Y. Lee, H. S. Ryu [et al.] // Journal of neurogastroenterology and motility. – 2014. – Vol. 20. – N. 1. – P. 54.

254. Regulation of gut luminal serotonin by commensal microbiota in mice / T. Hata, Y. Asano, K. Yoshihara [et al.] // PloS one. – 2017. – Vol. 12. – N. 7. – P. e0180745.

255. Regulation of prefrontal cortex myelination by the microbiota / A. E. Hoban, R. M. Stilling, F. J. Ryan [et al.] // *Translational psychiatry*. – 2016. – Vol. 6. – N. 4. – P. e774-e774.

256. Relationship between the gut microbiome and brain function / M. Hasan Mohajeri, G. La Fata, R. E. Steinert, P. Weber. // *Nutrition Reviews*. – 2018. – Vol. 76. – N. 7. – P. 481-496.

257. Richard, H. T. Acid resistance in *Escherichia coli* / H. T. Richard, J. W. Foster // *Advances in applied microbiology*. – 2003. – Vol. 52. – P. 167-186.

258. Rodrigues, A. R. Intracellular signaling mechanisms of the melanocortin receptors: Current state of the art. / A. R. Rodrigues, H. Almeida, A. M. Gouveia. // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2015. – Vol. 72. – N. 7. – P. 1331-1345

259. Rogozinskaya, E. Y. Anticoagulant Effects of Arginine-Containing Peptides of the Glyproline Family (His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro and Thr-LysPro-Arg-Pro-Gly-Pro) Revealed by Thromboelastography / E. Y. Rogozinskaya, M. G. Lyapina // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2017. – Vol. 164. – N. 2. – P. 170-173.

260. Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat / J. Santos, P. C. Yang, J. D. Söderholm [et al.] // *Gut*. – 2001. – Vol. 48. – N. 5. – P. 630-636.

261. Roshchina, V. V. New Trends and Perspectives in the Evolution of Neurotransmitters in Microbial, Plant, and Animal Cells BT - Microbial Endocrinology: Interkingdom Signaling in Infectious Disease and Health / V. V Roshchina // M. Lyte ed. . – Cham : Springer International Publishing, 2016. – P. 25-77.

262. Saunders, P. R. Cholinergic nerves mediate stress-induced intestinal transport abnormalities in Wistar-Kyoto rats / P. R. Saunders, N. P. Hanssen, M. H. Perdue // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 1997. – Vol. 273. – N. 2. – P. G486-G490.

263. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis / S. M. O'Mahony, G. Clarke, Y. E. Borre [et al.] // *Behavioural brain research*. – 2015. – Vol. 277. – P. 32-48.

264. Serotonin activates bacterial quorum sensing and enhances the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in the host / L. D. Knecht, G. O'Connor, R. Mittal [et al.] // *EBioMedicine*. – 2016. – Vol. 9. – P. 161-169.

265. Sies, H. *Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects* / H. Sies. – Text : electronic // *Antioxidants*. – 2020. – Vol. 9. – N. 9. – P. 852. – URL: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/9/852/htm> (дата обращения: 18.12.2021).

266. Sies, H. *Oxidative Stress* / H. Sies, C. Berndt, D. P. Jones. // *Annual Reviews*. – 2017. – Vol. 86. – P. 715-748.

267. Soderholm, J. D. II. *Stress and intestinal barrier function* / J. D. Soderholm, M. H. Perdue // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2001. – Vol. 280. – N. 1. – P. G7-G13.

268. *Stability of His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro to Leucine Aminopeptidase, Carboxypeptidase Y, and Rat Nasal Mucus, Blood, and Plasma* / K. V Shevchenko, S. A. Dulov, L. A. Andreeva [et al.] // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2016. – Vol. 42. – N. 2. – P. 153-161.

269. *Stability of proline-containing peptides in biological media* / K. V. Shevchenko, I. Y. Nagaev, L. A. Andreeva [et al.]. // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. – 2019. – Vol. 13. – N. 3. – P. 179-201.

270. *State of Colon Microbiota in Rats during Chronic Restraint Stress and Selank Treatment* / A. Y. Mukhina, O. A. Medvedeva, M. V. Svishcheva [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2019. – Vol. 167. – N. 2. – P. 226-228.

271. *Stress-Derived Corticotropin Releasing Factor Breaches Epithelial Endotoxin Tolerance* / Y. Yu, Z. Q. Liu, X. Y. Liu [et al.]. // *Plos One*. – 2013. – Vol. 8. – N. 6. – P. e65760. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0065760> (дата обращения: 24.02.2022).

272. *Stress-induced cytokine changes in rats* / H. Himmerich, J. Fischer, K. Bauer [et al.] // *European cytokine network*. – 2013. – Vol. 24. – N. 2. – P. 97-103.

273. Stress neuropeptides evoke epithelial responses via mast cell activation in the rat colon / J. Santos, D. Yates, M. Guilarte [et al.] // *Psychoneuroendocrinology*. – 2008. – Vol. 33. – N. 9. – P. 1248-1256.

274. Stressor exposure has prolonged effects on colonic microbial community structure in *Citrobacter rodentium*-challenged mice / J. D. Galley, A. R. Mackos, V. A. Varaljay, M. T. Bailey. // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – P. 45012.

275. Substance P (SP) induces expression of functional corticotropin-releasing hormone receptor-1 (CRHR-1) in human mast cells / S. Asadi, K.-D. Alysandratos, A. Angelidou [et al.] // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2012. – Vol. 132. – N. 2. – P. 324-329.

276. Substance P induces ion secretion in mouse small intestine through effects on enteric nerves and mast cells / L. Wang, A. M. Stanisz, B. K. Wershil [et al.] // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 1995. – Vol. 269. – N. 1. – P. G85-G92.

277. Suppression of brain mast cells degranulation inhibits microglial activation and central nervous system inflammation / H. Dong, X. Zhang, Y. Wang [et al.] // *Molecular neurobiology*. – 2017. – Vol. 54. – N. 2. – P. 997-1007.

278. Synthesis of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid by Lactic Acid Bacteria Isolated from a Variety of Italian Cheeses / S. Siragusa, M. De Angelis, R. Di Cagno, [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2007. – Vol. 73. – N. 22. – P. 7283-7290.

279. Synthetic corticotropins and the GABA- - receptor system: Direct and delayed effects / T. V Vyunova, L. A. Andreeva, K. V. Shevchenko [et al.]. // *Chemical Biology and Drug Design* – 2023. – Vol. 101. – N.6. – P. 1393-1405

280. Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis / L. Su, L. Shen, D. R. Clayburgh [et al.] // *Gastroenterology*. – 2009. – Vol. 136. – N. 2. – P. 551-563.

281. Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation / A. Catania, S. Gatti, G. Colombo, J. Lipton. // *Pharmacological reviews*. – 2004. – Vol. 56. – N. 1. – P. 1-29.



282. The active Zot domain (aa 288–293) increases ZO-1 and myosin 1C serine/threonine phosphorylation, alters interaction between ZO-1 and its binding partners, and induces tight junction disassembly through proteinase activated receptor 2 activation / S. E. Goldblum, U. Rai, A. Tripathi [et al.] // *The FASEB journal*. – 2011. – Vol. 25. – N. 1. – P. 144-158.

283. The association between three major physiological stress systems and oxidative DNA and lipid damage / C. N. Black, M. Bot, D. Révész [et al.] // *Psychoneuroendocrinology*. – 2017. – Vol. 80. – P. 56-66.

284. The effect of semax and its C-end peptide PGP on the morphology and proliferative activity of rat brain cells during experimental ischemia: A pilot study / V. V. Stavchansky, V. V. Yuzhakov, A. Y. Botsina [et al.] // *Journal of Molecular Neuroscience*. – 2011. – Vol. 45. – N. 2. – P. 177-185.

285. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems / M. Carabotti, A. Scirocco, M. A. Maselli, C. Severi // *Annals of gastroenterology: quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology*. – 2015. – Vol. 28. – N. 2. – P. 203.

286. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression / M. Maes, R. Yirmiya, J. Norberg [et al.]. // *Metabolic Brain Disease* 2008 24:1. – 2008. – Vol. 24. – N. 1. – P. 27-53.

287. The role of the microbiome in the neurobiology of social behaviour / A. Sarkar, S. Harty, K. V. A. Johnson [et al.] // *Biological Reviews*. – 2020. – Vol. 95. – No. 5. – P. 1131-1166. – DOI 10.1111/brv.12603.

288. The Intestinal Microbiota Affect Central Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Behavior in Mice / P. Bercik, E. Denou, J. Collins [et al.] // *Gastroenterology*. – 2011. – Vol. 141. – N. 2. – P. 599-609.e3.

289. The melanocortineric pathway is rapidly recruited by emotional stress and contributes to stress-induced anorexia and anxiety-like behavior / J. Liu, J. C. Garza, H. V Truong [et al.] // *Endocrinology*. – 2007. – Vol. 148. – N. 11. – P. 5531-5540.

290. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner / G. Clarke, S. Grenham, P. Scully [et al.] // *Molecular psychiatry*. – 2013. – Vol. 18. – N. 6. – P. 666-673.
291. The microbiota-gut-brain axis / J. F. Cryan, K. J. O’riordan, C. S. M. Cowan [et al.] // *Physiological Reviews*. – 2019. – Vol. 99. – N. 4. – P. 1877-2013.
292. The microbiota–gut–brain axis: A novel nutritional therapeutic target for growth retardation / M. Qi, B. Tan, J. Wang [et al.] // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2021. – Vol. 62. – N. 18. – P. 4867-489.
293. The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression / M. Valles-Colomer, G. Falony, Y. Darzi [et al.]. // *Nature Microbiology* 2019 4:4. – 2019. – Vol. 4. – N. 4. – P. 623-632.
294. The neuropeptide  $\alpha$ -MSH has specific receptors on neutrophils and reduces chemotaxis in vitro / A. Catania, N. Rajora, F. Capsoni [et al.] // *Peptides*. – 1996. – Vol. 17. – N. 4. – P. 675-679.
295. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation / N. Kelley, D. Jeltema, Y. Duan, Y. He // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – Vol. 20. – N. 13. – P. 3328.
296. The Peptide ACTH<sub>4-7</sub>-PGP Corrects Behavior and Corticosterone Levels in Rats in Chronic Stress / A. O. Vorvul, I. I. Bobyntsev, M. V Svisheva [et al.] // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2022. – Vol. 52. – N. 4. – P. 574-581.
297. The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex / W. Liu, T. Ge, Y. Leng [et al.]. // *Neural Plasticity*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 6871089.
298. Therapeutic effects of stress-programmed lymphocytes transferred to chronically stressed mice / R. B. Scheinert, M. H. Haeri, M. L. Lehmann, M. Herkenham // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 2016. – Vol. 70. – P. 1-7.
299. Thrombophilia as a predictor of persistent residual vein thrombosis / L. Spiezia, D. Tormene, R. Pesavento [et al.]. // *Haematologica*. – 2008. – Vol. 93. – N. 3. – P. 479-480.

300. Ting Wong, C. G. Gaba,  $\gamma$ -hydroxybutyric acid, and neurological disease / C. G. Ting Wong, T. Bottiglieri, O. C. Snead III // *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. – 2003. – Vol. 54. – N. S6. – P. S3-S12.

301. Traina, G. Mast cells in gut and brain and their potential role as an emerging therapeutic target for neural diseases / G. Traina // *Frontiers in cellular neuroscience*. – 2019. – P. 345.

302. Traina, G. Mast cells in the brain—Old cells, new target / G. Traina // *Journal of Integrative Neuroscience*. – 2017. – Vol. 16. – N. s1. – P. S69-S83.

303. Traina, G. The role of mast cells in the gut and brain / G. Traina // *Journal of Integrative Neuroscience*. – 2021. – Vol. 20. – N. 1. – P. 185-196.

304. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota / K. Atarashi, T. Tanoue, K. Oshima [et al.]. // *Nature*. – 2013. – Vol. 500. – N. 7461. – P. 232-236.

305. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. / T. R. Mosmann, H. Cherwinski, M. W. Bond [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 1986. – Vol. 136. – N. 7. – P. 2348 LP-2357.

306. Using protein-based motifs to stabilize peptides / J. Walker, R. Altman, J. Warren, E. Altman. // *The journal of peptide research: official journal of the American Peptide Society*. – 2003. – Vol. 62. – N. 5. – P. 214-226.

307. Vergnolle, N. Clinical relevance of proteinase activated receptors (pars) in the gut / N. Vergnolle // *Gut*. – 2005. – Vol. 54. – N. 6. – P. 867-874.

308. Vorvul, A. Peptide His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro ameliorates gut mucosal microbiota composition in repetitively stressed rats / A. Vorvul, I. Bobyntsev, O. Medvedeva // 9<sup>TH</sup> International congress of pathophysiology and 5<sup>TH</sup> Congress of physiological sciences of Serbia : abstract book of International Congress (Belgrade, 4-6 Jul. 2023). – Belgrade, 2023. – P. 169.

309. Walf, A. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents / A. A. Walf, C. A. Frye. // *Nature Protocols*. – 2007. – Vol. 2. – N. 2. – P. 322-328.

310. Wang, Y. Current progress of research on intestinal bacterial translocation / Y. Wang // *Microbial Pathogenesis*. – 2021. – Vol. 152. – P. 104652.

311. Xiaoyaosan Exerts Therapeutic Effects on the Colon of Chronic Restraint Stress Model Rats via the Regulation of Immunoinflammatory Activation Induced by the TLR4/NLRP3 Inflammasome Signaling Pathway / H. Z. Zhu, Y. D. Liang, W. Z. Hao [et al.] // *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. – 2021. – Vol. 2021. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2021/6673538/> (дата обращения 25.04.2022)

312.  $\beta$ 2-Adrenoceptor-mediated suppression of human intestinal mast cell functions is caused by disruption of filamentous actin dynamics / T. Gebhardt, R. Gerhard, S. Bedoui [et al.] // *European journal of immunology*. – 2005. – Vol. 35. – N. 4. – P. 1124-1132.

313.  $\gamma$ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine / E. Barrett, R. P. Ross, P. W. O'Toole [et al.] // *Journal of Applied Microbiology*. – 2012. – Vol. 113. – N. 2. – P. 411-417.