

*На правах рукописи*



**Ворвуть Антон Олегович**

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

3.3.3. Патологическая физиология

1.5.11. Микробиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор  
доктор биологических наук, профессор

**Бобынцев Игорь Иванович**  
**Медведева Ольга Анатольевна**

**Официальные оппоненты:**

**Перцов Сергей Сергеевич** – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный деятель науки Российской Федерации, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина», директор

**Червинец Вячеслав Михайлович** – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, профессор

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Защита диссертации состоится «19» декабря 2023 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.25 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d. 37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук, профессор



**Калужин Олег Витальевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### 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 (Sarkar A. et al, 2020). 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, спинномозговые механизмы, гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось (ГГНО), выработка нейромедиаторов, аминокислот с разветвленной цепью, фрагментов желчи и короткоцепочечных жирных кислот (Cryan J.F. et al., 2019). Нарушения в составе кишечной микробиоты могут быть связаны со значительным числом психических расстройств, например, депрессией, тревогой, шизофренией, болезнью Альцгеймера, болезнью Паркинсона и т.д. (Dinan T.G., 2017). Данные факты обусловили появление термина «психобиом», который подчеркивает особое место кишечной микробиоты в функционировании ЦНС (Pennisi E., 2020).

Известно, что различные виды стресса влияют как на функции ЦНС, так и на кишечную микробиоту (Crumeurolle-Arias M. et al., 2014; Savignac H.M. et al. 2014), нарушения состава которой, в свою очередь, коррелируют с эмоциональными и поведенческими проявлениями вызванных стрессом расстройств (Brachman R.A. et al., 2015; Valles-Colomer M. et al., 2019).

Одним из перспективных направлений коррекции стрессиндуцированных изменений в организме является воздействие на состояние регуляторных систем организма. С этой целью целесообразно использование регуляторных пептидов, которые обладают высокой биологической активностью, низкой токсичностью и слабой аллергенностью (Koroleva S.V. et al., 2018). К их числу относятся меланокортины, являющиеся одними из 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 рассматривать их как потенциальную основу для создания новых лекарственных препаратов (Catania A., 2008; Clark A.J. et al., 2016). В различных исследованиях показаны нейротрофический, анальгетический и ноотропный эффекты N-концевых аналогов АКГГ. Также показана активность данных молекул в условиях различного стрессорного воздействия (Yatsenko K.A. et al., 2013; Koroleva S.V. et al., 2018).

### Степень разработанности темы исследования

Одним из наиболее изученных 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 (Levitskaya N. G. et al., 2010; Volodina M.A. et al., 2012). Также известно, что АКТГ<sub>4-7</sub>–Pro-Gly-Pro препятствует развитию нарушений состава микробиоты в условиях хронического иммобилизационного стресса (Svishcheva M.V. et al, 2020). При этом N-концевые фрагменты АКТГ не обладают гормональной активностью, что позволяет различать свойства исходной аминокислотной последовательности от эффектов глюкокортикоидов (Koroleva S.V. et al., 2019).

К высокоактивным меланокортинам относится структурно и функционально близкий семаксу пептид АКТГ<sub>6-9</sub>–Pro-Gly-Pro. Аминокислотная последовательность АКТГ<sub>6-9</sub> (His-Phe-Arg-Trp) является общей для всех природных меланокортинов и минимальной по размеру, необходимой для связывания с каждым типом меланокортиновых рецепторов (MCR) (за исключением MC2R) (Clark A.J. et al., 2016). Присоединение Pro-Gly-Pro (ППП) к С-концу АКТГ<sub>6-9</sub> повышает его устойчивость к деградации эндопептидазами и увеличивает продолжительность биологических эффектов (Ashmarin I.P., 2007). При этом глипролины также обладают собственной физиологической активностью, которая может способствовать эффектам изучаемого пептида (Жуйкова С.Е., 2020). Известно, что АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП проникает через ГЭБ, взаимодействует со структурами мозга (Shevchenko K.V. et al., 2015) и поэтому обладает потенциально широким спектром биологических эффектов.

В настоящее время установлено, что АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП улучшает выработку пищевого рефлекса, обладает анксиолитическим и антидепрессантным действием, улучшает закрепление условного рефлекса пассивного избегания, влияет на болевую чувствительность у крыс (Левицкая Н.Г. и др., 2019; Dodonova S.A. et al., 2020; Dodonova S.A. et al., 2021). АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП облегчал тревожноподобное поведение у крыс с агрессивным и субмиссивным поведением в условиях экспериментального социального стресса (Yasenyavskaya A. et al., 2020). При этом исследования влияния АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП на поведение животных, кишечную микробиоту и их взаимосвязь в условиях хронического стресса ранее не проводились. Поэтому представляется актуальным изучение возможности применения АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП для коррекции индуцированных стрессом нарушений функций нервной системы и состава кишечной микробиоты.

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>-ППП при хроническом иммобилизационном стрессе.

Задачи:

1. Изучить влияние пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП 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>-ППП.

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

4. Исследовать влияние пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП 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>-ППП.

#### **Научная новизна**

Впервые изучено влияние пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП на уровень тревожности, депрессии, эмоционального состояния у крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса. Впервые установлено корригирующее действие пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП на состав пристеночной микробиоты у крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса. Впервые исследованы эффекты пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП 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>-ППП.

#### **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>-ППП 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 микрофото съемка 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>-ППП 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>-ППП 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 достаточным числом исследованных животных, полнотой и широтой литературно-библиографической справки, использованием современных микробиологических, гистологических, этологических, биохимических и иммунологических методов исследования, применением 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.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

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.

Экспериментальные животные были разделены на 5 групп ( $n = 11$ ): 1 – нестрессированные животные, которым вводили 0,9% раствор NaCl (контроль), 2 – животные, подвергавшиеся хроническому иммобилизационному стрессу, которым вводили изотонический раствор NaCl (ХИС), 3–5 – крысы, подвергнутые ХИС, которым вводили АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП в дозах 5, 50 и 500 мкг/кг (ХИС+5, ХИС+50, ХИС+500). 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 использовали N-концевой аналог АКТГ АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП (**His-Phe-Arg-**



**Trp-Pro-Gly-Pro**), синтезированный в Институте молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт». Пептид растворяли в 0,9% растворе NaCl и вводили внутривенно в дозах 5, 50 и 500 мкг/кг ежедневно за 12–15 минут 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 NaCl.

Для **моделирования ХИС** использовали модификации методик Н. Chen et al. (2008), J. Zheng et al. (2009) и S.W. Wang (2009): крыс помещали в тесные прозрачные пластиковые вентилируемые пеналы, размер которых подбирали индивидуально для каждого животного и фиксировали в положении лежа на спине. Стрессорное воздействие проводили ежедневно в течение 2 ч (с 11:00 до 13:00 ч) на протяжении 14 дней.

В тесте **приподнятый крестообразный лабиринт** у экспериментальных животных исследовали уровень тревожности, который оценивали по времени, проведенному в открытых и закрытых рукавах, центральной площадке и по числу свешиваний в течение 5 мин. Двигательную, исследовательскую (горизонтальную) и локомоторную активность, эмоциональность и короткий груминг оценивали в тесте **«открытое поле»**. Двигательную и исследовательскую активность определяли по числу пересеченных квадратов, локомоторную активность – по пройденной дистанции в центральных и периферических квадратах, а также общей пройденной дистанции. Эмоциональность оценивали по числу фекальных болюсов и актов уринации. Выраженность депрессивного поведения у животных изучали в тесте **принудительного плавания**, в котором оценивали общее время иммобилизации (фризинга), число иммобилизаций, среднее время иммобилизации (общее время иммобилизации/число иммобилизаций), время активного плавания (клайминга). Поведение животных анализировали с помощью программного обеспечения SMART 3.0 (PanLab Harvard Apparatus, Испания).

**Методика забора биологического материала.** Через 24 ч после заключительного стрессорного воздействия проводили эвтаназию животных путем забора крови из правого желудочка сердца после парастеральной торакотомии под эфирным наркозом с помощью вакуумной системы S-Monovette® с прокоагулянтом (SARSTEDT, Германия). Забранную кровь в объеме 7,0–7,5 мл центрифугировали при 1500 g в течение 15 мин. Полученную сыворотку аликвотировали по 200 мкл в индивидуальные чистые микропробирки и замораживали при –20 °С, затем хранили при –80 °С. Непосредственно после забоя животного производили забор участка толстой кишки, который использовали для микробиологического и морфологического исследований.

Для **качественной и количественной оценки микробиоты** слизистой оболочки толстой кишки использовали метод Кафарской Л.И. и Коршунова В.М. Аутоптаты 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 газонем 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 часов (Ефимов Б.А., Кафарская Л.И., Коршунов В.М., 2002). 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, которое вычисляли на основе числа выросших колониеобразующих единиц (КОЕ) на чашке Петри с наибольшим разведением, где наблюдалось более 10 колоний. КОЕ рассчитывали по следующей формуле:  $КОЕ = E/(k \times v \times n)$ , 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 lgКОЕ/г ткани.

Для вычисления частоты встречаемости (ЧВ) отдельного микроорганизма или рода бактерий использовали формулу  $ЧВ = (n_i \times 100)/N$ , 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:  $ОСр = (АСр_i \times 100)/N$ , где  $АСр_i$  – абсолютное среднее для i-го микроорганизма в группе, N – сумма абсолютных средних всех идентифицированных микроорганизмов в группе.

**Морфологическое исследование** гистологических препаратов ободочной кишки выполняли на микроскопе Nikon Eclipse Ci (Nicon, Япония) со штатной цифровой камерой. Полученные микрофотографии изучали в программе ImageJ v.1.53i (National Institutes of Health, США, <https://imagej.nih.gov/>). 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.

**Количественное определение уровней цитокинов 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).

**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 четырех 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 четырех групп. Для оценки частот использовали точный критерий Фишера. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

**Состояние функций нервной системы крыс при применении АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в условиях хронического иммобилизационного стресса.** 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 увеличении времени в закрытых рукавах ПКЛ (на 12%,  $p < 0,05$ ) по сравнению с нестрессированными животными (табл. 1). 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 NaCl. Установлено, что внутрибрюшинное введение 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,  $p < 0,05$ ). Увеличение дозы АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП до 500 мкг/кг не приводило к значимому изменению поведения животных.

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

Показатель	Группа				
	Контроль	ХИС	ХИС+5	ХИС+50	ХИС+500
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; 273,17]	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]
Число поворотов	8 [4; 11]	8 [4; 9]	7 [2; 12]	8 [4; 9,5]	4 [0; 8]
Число вытягиваний	6 [1; 7]	5 [1; 7]	9 [0; 10]	5 [3; 7]	4 [0; 5]
Число стоек	2 [0; 13,5]	6 [1; 8]	7 [0; 7,5]	12 [0; 16]	4 [0; 9,5]
Число свешиваний	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-Уолисса с апостериорным тестом Данна).					

Стрессорное воздействие также приводило к увеличению пройденной дистанции в центре открытого поля (в 2,9 раза,  $p < 0,05$ ) (табл. 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,  $p < 0,05$ ), так и уменьшению времени на периферии (на 2,3%,  $p < 0,05$ ). Также необходимо отметить изменение эмоционального состояния у животных, повергнутых ХИС: отмечалось увеличение числа оставленных фекальных болюсов и числа актов короткого груминга (в 2 раза,  $p < 0,05$ ). Применение пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП во всех использованных дозах не оказывало значимого влияния на вертикальную, горизонтальную и ориентировочно-исследовательскую активность. При этом отмечалось снижение эмоциональности после

введения пептида в дозе 50 мкг/кг: в открытом поле наблюдалось снижение числа болюсов (в 4 раза,  $p < 0,01$ ) и числа актов короткого груминга (в 2 раза,  $p < 0,01$ ).

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

Показатель	Группа				
	Контроль	ХИС	ХИС+5	ХИС+50	ХИС+500
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]
Число актов короткого груминга.	2 [0; 2,5]	4 [2; 5]××	5 [3; 6]	2 [1; 3]**	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-Уолисса с апостериорным тестом Данна).					

В тесте принудительного плавания установлено, что ХИС способствует увеличению времени иммобилизации (в 2,1 раза,  $p < 0,05$ ), а также средней продолжительности фризинга (в 1,6 раза,  $p < 0,05$ ) (табл. 3). При этом изменения числа актов иммобилизации, латентного периода первой иммобилизации и частоты иммобилизации не достигали достоверно значимых различий. 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. Введение пептида в дозе

50 мкг/кг не приводило к значимым изменениям поведения животных. АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП 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 NaCl.

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

Показатель	Группа				
	Контроль	ХИС	ХИС+5	ХИС+50	ХИС+500
Длительность иммобилизации, с	33,03 [0; 61,8]	68,47× [24,33; 83,37]	24,23* [1,23; 45,29]	60,7 [1,17; 80,04]	32,97* [0; 47,97]
Число иммобилизаций	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, в 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–Уолисса с апостериорным тестом Данна).					

**Состояние микробиоты толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса и применении АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП.** Установлено, что ХИС оказывал выраженное влияние на состав пристеночной микробиоты и способствовал снижению числа облигатных микроорганизмов (рис. 1): *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 отмечено 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.

Введение АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП 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 изотонический раствор NaCl. У животных, которым вводили АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП 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* ( $p<0,05$ ).

На фоне внутрибрюшинного введения АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП 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 раза ( $p<0,05$ ), ацинетобактеров – в 7,7 раза ( $p<0,05$ ), коагулазоотрицательных стафилококков – в 1,3 раза ( $p<0,05$ ), грибов рода *Candida* – в 2,1 раза ( $p<0,05$ ) при отсутствии бактерий рода *Citrobacter* ( $p<0,01$ ).

Оценка частоты встречаемости микроорганизмов (рис. 2) 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>-ППП 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. ( $p<0,05$ ).

Следует отметить, что во всех группах животных в составе микробиоценоза мукозального слоя толстой кишки преобладали лакто- и бифидобактерии (рис. 3). 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*. Применение АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП во всех использованных дозах приводило к увеличению доли облигатных представителей микробиоты за счет снижения количества факультативных и транзитных микроорганизмов. При этом наиболее близкие значения относительного среднего отмечались в группе животных, которым вводили пептид в наибольшей использованной дозе (500 мкг/кг).

Оценка частоты встречаемости микроорганизмов (рис. 2) 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. ( $p < 0,05$ ).

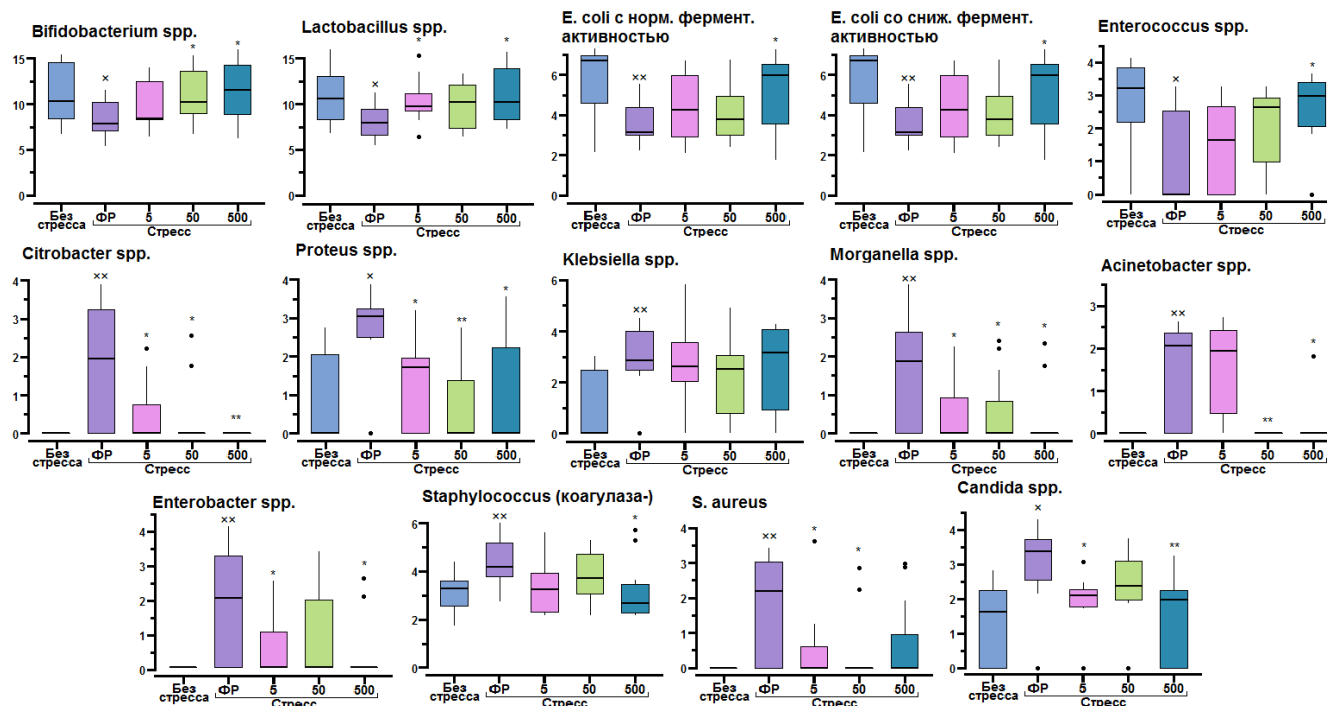


Рисунок 1 – Количественный состав мукозальной микробиоты толстой кишки крыс при ХИС и при применении АКТГ<sub>6-9</sub>-ПГП (1g КОЕ/г)

Примечание – × –  $p < 0,05$ , ×× –  $p < 0,01$  по сравнению с группой «Без стресса» (по U-критерию Манна–Уитни), \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$  по сравнению с группой «стресс+ФР» (по критерию Краскела-Уолисса с апостериорным тестом Данна); ФР – изотонический раствор NaCl.

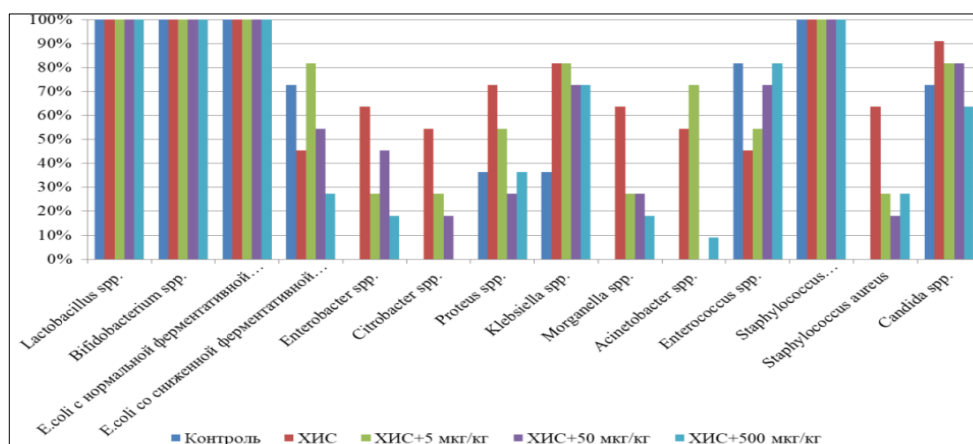


Рисунок 2 – Частота встречаемости представителей парietальной микробиоты толстой кишки

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



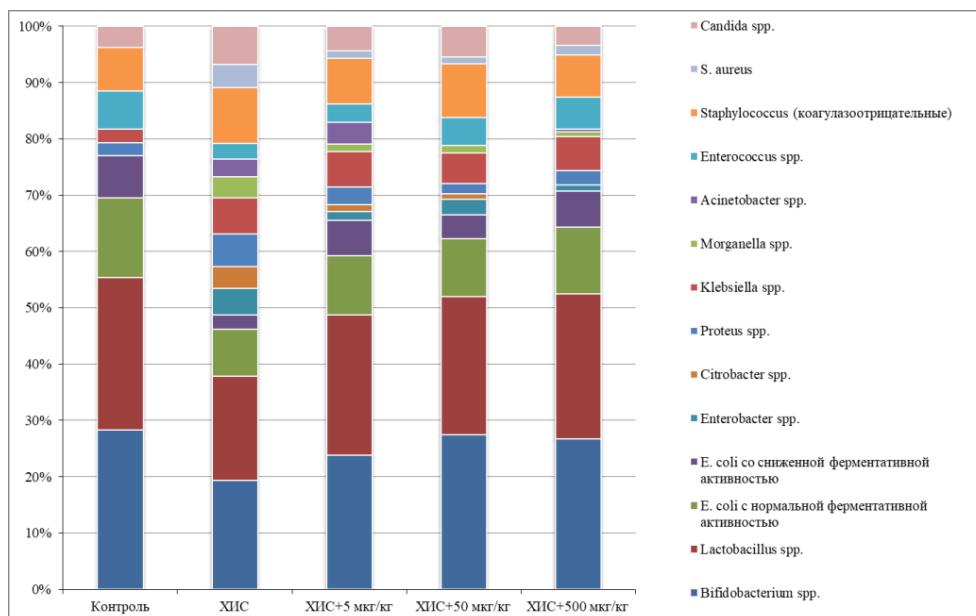


Рисунок 3 – Доля идентифицированных микроорганизмов в составе микробиоты толстой кишки в экспериментальных группах

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

Гистологическое исследование фрагментов толстой кишки в группе контрольных нестрессированных животных не показало патоморфологических изменений в ее стенке. У стрессированных крыс без введения пептида в стенке ободочной кишки определяются выраженные морфологические изменения, сопровождающиеся нарушением архитектоники слизистой оболочки. В просвете кишки и на ее поверхности присутствует большое количество слизи с разрушенными клетками. Во всех оболочках ободочной кишки визуализируется выраженная диффузная полиморфноклеточная инфильтрация. Среди клеток преобладают лимфоциты и гранулоциты. Также отмечается увеличение числа тучных клеток.

После введения АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП в дозе 5 мкг/кг в стенке ободочной кишки сохраняются воспалительно-некротические изменения, сглаженные складки эпителия и поверхностный некроз колоноцитов. На фоне небольшой глубины кишечных крипт отмечается увеличение числа бокаловидных клеток. 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 ободочной кишки в слизистой и подслизистой оболочках определяется очаговая выраженная инфильтрация гранулоцитами. С увеличением дозы АКТГ<sub>6-9</sub>-ПП до 50 мкг/кг выраженность морфологических изменений в ободочной кишке уменьшается. В поверхностных отделах слизистой оболочки сохраняется диффузная выраженная полиморфноклеточная инфильтрация с преобладанием гранулоцитов. Наблюдается отек собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистой основы.

Кишечные крипты сглажены, отмечается увеличение числа бокаловидных клеток. После введения АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП в дозе 500 мкг/кг степень выраженности реактивных изменений в слизистой оболочке ободочной кишки снижается. 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: 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% ( $p < 0,01$ ).

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	ХИС	ХИС+5	ХИС+50	ХИС+500
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, 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, 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–Уоллисса с апостериорным тестом Данна).

**Эффекты пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП на уровни цитокинов, маркеров свободно-радикального окисления и кортикостерона в сыворотке крови.** При исследовании влияния АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП на уровни про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови крыс в условиях ХИС установлено повышение уровней провоспалительных цитокинов. Как видно из рисунка 4, в сыворотке животных 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,  $p < 0,05$ ). Введение АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП корригировало стрессиндуцированные 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.

Введение АКТГ $_{6-9}$ -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 СОД3 (на 6,4%) не было статистически значимым. Увеличение дозы АКТГ $_{6-9}$ -ППП до 50 мкг/кг также приводило к значимому уменьшению уровня 8-ОНдГ (на 30%,  $p < 0,01$ ).

Как видно из рисунка 5, стрессорное воздействие у экспериментальных животных вызывало увеличение концентрации кортикостерона в сыворотке крови на 27% ( $p < 0,01$ ). Применение АКТГ $_{6-9}$ -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, получавшими изотонический раствор NaCl. При увеличении дозы АКТГ $_{6-9}$ -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% ( $p < 0,05$ ).

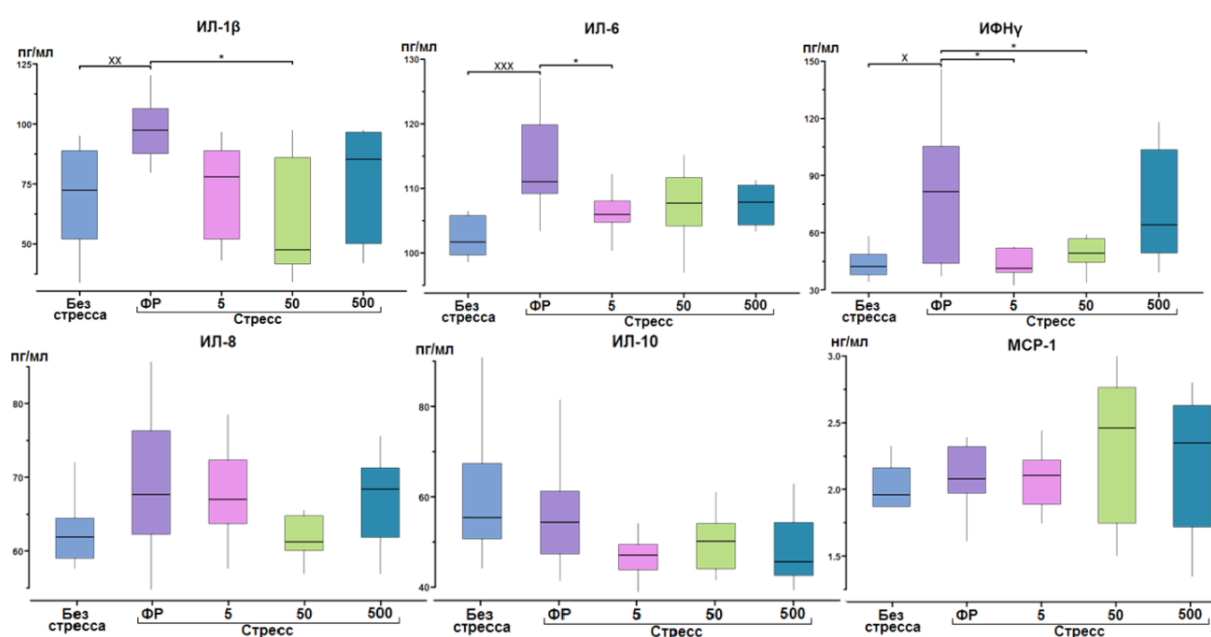


Рисунок 4 – Концентрация цитокинов в сыворотке крыс в условиях ХИС и приведение АКТГ $_{6-9}$ -ППП

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

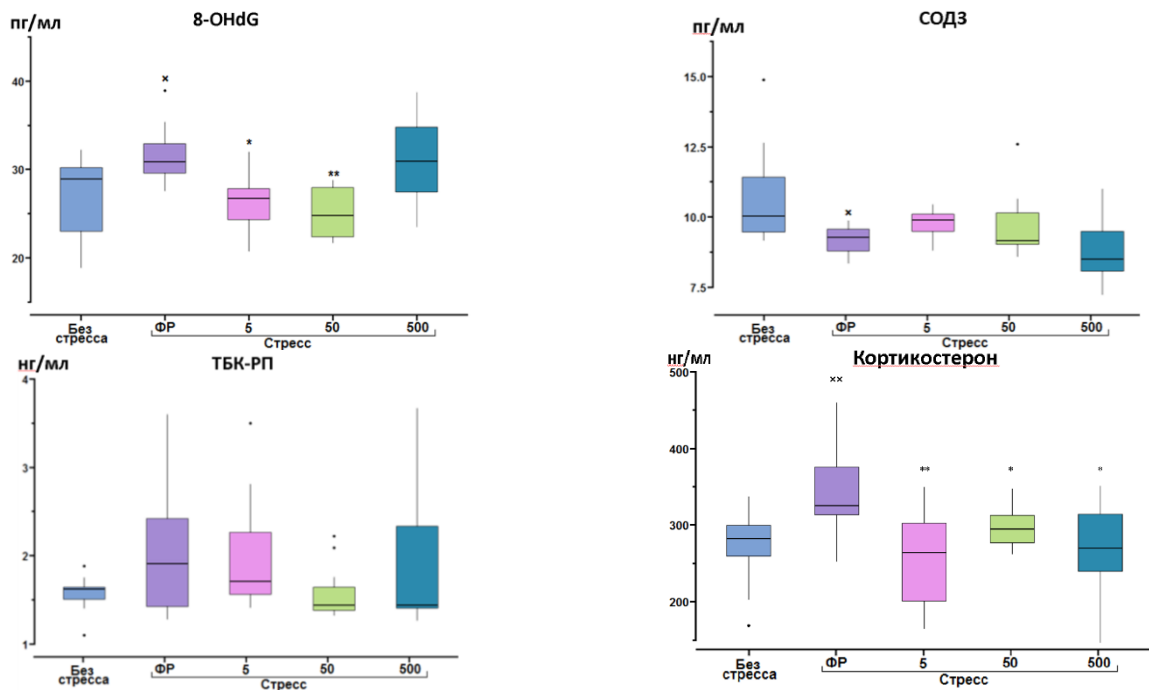


Рисунок 5 – Концентрация 8-OHdG, СОДЗ, ТБК-РП и кортикостерона в сыворотке крови экспериментальных животных в условиях ХИС и при применении АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП

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

Таким образом, 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. N-концевой синтетический аналог адренотропного гормона АКТГ<sub>6-9</sub>-ППП 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>-ППП 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>-ППП 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>-ППП 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>-ППП 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 экссудативных 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>-ППП препятствует стрессиндуцированному 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>-ППП 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>-ППП, перспективах его использования для коррекции стрессиндуцированных сдвигов, повышения адаптивного потенциала организма и полифункциональности регуляторных пептидов семейства меланокортинов.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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. – DOI 10.24075/vrgmu.2021.056. [Scopus, Web of Science]

2. **Ворвуль, А. О.** Пептид АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro корригирует 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.

3. **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.

4. ACTH(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 / **А. О. Vorvul**, I. I. Bobyntsev, O. A. Medvedeva [et al.] // **Neuropeptides**. – 2022. – Vol. 93. – P. 102247. –

DOI: 10.1016/j.nper.2022.102247. [Scopus, Web of Science, Pubmed, Chemical Abstracts]

5. **Ворвиль, А. О.** К вопросу о механизмах повышения проницаемости стенки кишечника при стрессе / **А. О. Ворвиль**, И. И. Бобынцев, О. А. Медведева // Человек и его здоровье. – 2022. – Т. 25, № 2. – С. 43-63. – DOI 10.21626/vestnik/2022-2/05.

6. 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. Ворвиль**, И. И. Бобынцев, О. А. Медведева, Ю. Э. Азарова // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2022. – Т. 174, № 12. – С. 683-686. – DOI 10.47056/0365-9615-2022-174-12-683-686. [Scopus, Web of Science, Pubmed, Springer]

7. Влияние пептида АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro на состояние микробиоценоза толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса / **А. О. Ворвиль**, О. А. Медведева, И. И. Бобынцев [и др.] // **Астраханский медицинский журнал.** – 2022. – Т. 17, № 4. – С. 68-77. – DOI: 10.48612/agmu/2022.17.4.68.77.

8. Анксиолитическая активность аналога АКТГ в условиях хронического иммобилизационного стресса / **А. О. Ворвиль**, И. И. Бобынцев, О. А. Медведева [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2023. – Т. 22, № S6. – С. 83.

9. **Ворвиль, 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. Ворвиль** // 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.

10. **Ворвиль, А. О.** Антидепрессантный эффект пептида His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro в условиях хронического иммобилизационного стресса / **А. О. Ворвиль**, 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. – Том I. – С. 10-12.

11. **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.

12. **Ворвиль 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. Ворвиль** // Молодежный инновационный вестник. – 2023. – Т. 12, № 1. – С. 45–43.

13. Влияние пептида АКТГ<sub>6-9</sub>-Pro-Gly-Pro на морфофункциональное состояние толстой

кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса / А. О. Ворвиль, И. И. Бобынцев, Е. С. Мишина [и др.] // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2023. – Т. 22, № 2. – С. 14-20. – DOI 10.20538/1682-0363-2023-2-14-20. [Scopus, Web of Science]

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКТГ	–	адренкортикотропный гормон
ГГНС	–	гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система
ИЛ	–	интерлейкин
ИФН $\gamma$	–	интерферон-гамма
КМО	–	кишечно-мозговая ось
КОЕ	–	колониеобразующая единица
ППП	–	трипептид пролил-глицил-пролин
СОДЗ	–	экстрацеллюлярная супероксиддисмутаза
ТБК-РП	–	продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой
ХИС	–	хронический иммобилизационный стресс
ЦНС	–	центральная нервная система
МСР-1	–	моноцитарный хемотаксический белок-1
8-OHdG	–	8-оксо-2'-дезоксигуанозин