

*На правах рукописи*

**СВИЩЕВА Мария Владимировна**

**СООТНОШЕНИЕ СОСТОЯНИЯ МИКРОБИОТЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ И  
ПОВЕДЕНЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ У КРЫС НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ  
ГЕПТАПЕПТИДА MET-GLU-HIS-PHE-PRO-GLY-PRO В УСЛОВИЯХ  
ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА**

03.02.03 – Микробиология,

14.03.03 – Патологическая физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой  
степени кандидата медицинских  
наук**

Москва – 2020

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор  
доктор биологических наук, доцент

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

**Официальные оппоненты:**

**Воронина Татьяна Александровна**, доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова» лаборатория психофармакологии, заведующая лабораторией;

**Червинец Вячеслав Михайлович**, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, заведующий кафедрой

**Ведущая организация:** ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России

Защита диссертации состоится «16» февраля 2021г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.08 при ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1 и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 202\_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор



**Калужин Олег Витальевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования. Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.** В настоящее время сформировались представления о кишечно-мозговой оси как о двунаправленной системе связи между центральной нервной системой и желудочно-кишечным трактом (Bercik P. et al., 2012; Bienenstock J. et al., 2014; Foster J.A et al., 2015; Mayer E.A. et al., 2014). Интенсивно накапливающиеся научные данные указывают на важную роль толстокишечной микробиоты в регулировании нормального функционирования данной оси (Bailey M.T., 2014; Carabotti M. et al., 2015). Установлено, что микробная регуляция бинаправленного сообщения между пищеварительной и нервной системами может реализовываться посредством секреции молекул «микробной сигнализации» (Fung, T.C. et al., 2017; Genton L. et al., 2003; Leonard, B.E., 2006; Desbonnet L. et al., 2008). Воздействие стрессоров вызывает активацию кишечно-мозговой оси нейрогуморальным путем, что способствует изменению барьерной функции кишки с увеличением параклеточной проницаемости и, как следствие, к абберациям состава толстокишечного микробиоценоза (Gareau, M.G. et al., 2008; Maes M. et al., 2013; Leunis J.C. et al., 2008). В свою очередь, изменение состояния кишечной микробиоты влияет на восприимчивость к стрессу, уровень тревожности, когнитивные способности (Galley J.D. et al., 2014).

В связи с вышеизложенным представляется актуальным исследование и разработка патогенетических принципов коррекции нарушений состава микробиоты толстой кишки с применением препаратов, обладающих стресслимитирующим эффектом. Для увеличения устойчивости к действию различных стрессоров и коррекции стрессиндуцированных сдвигов в настоящее время используются препараты, не обладающие выраженными побочными эффектами и имеющие высокую биодоступность, в том числе созданные на

основе регуляторных пептидов. К их числу относится производное фрагмента адренокортикотропного гормона гептапептид метионин-глутамин-гистидин-фенилаланин-пролин-глицин-пролин (АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP) семакс. Для пептида АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP установлено церебропротективное, антигипоксическое и ноотропное действие, а также ряд местных эффектов за счет взаимодействия с мелакортиновыми рецепторами различных типов. При этом установлено гастропротективное действие семакса в условиях стресса, иммуномодулирующий, кардиопротекторный и антикоагулянтный эффекты (Бакаева З.В. и др., 2009; Горбачева А.М. и др., 2016; Григорьева М.Е. и др., 2010; Долотов О.В. и др., 2015; Королева С.В. и др., 2018; Романова Г.А. и др., 2006; Самокруева М.А. и др., 2018). Отсутствие гормональной активности, высокая биодоступность, безопасность применения и плеiotропность фармакологических эффектов определили выбор пептида АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP как средства патогенетической коррекции стрессиндуцированных изменений состава пристеночной микробиоты толстой кишки.

**Цель работы** – изучение изменений состояния микробиоты, морфофункциональных показателей толстой кишки и поведенческих реакций у крыс на фоне применения гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro в условиях хронического иммобилизационного стресса.

#### **Задачи исследования**

1. Исследовать влияние введения пептида АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP на состав пристеночной микробиоты крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса.
2. Определить морфометрические характеристики толстой кишки у крыс после введения пептида АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP в условиях хронического иммобилизационного стресса.
3. Изучить влияние введения пептида АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP в условиях хронического иммобилизационного стресса на функциональное состояние

нервной системы у крыс с использованием поведенческих тестов «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт».

4. Определить уровень кортикостерона в сыворотке крови экспериментальных животных при хроническом иммобилизационном стрессе и в условиях применения пептида АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR.

5. Изучить характер и силу корреляционных взаимосвязей определяемых показателей и оценить их патогенетическую роль в условиях хронического иммобилизационного стресса и применения пептида АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR.

**Научная новизна.** Впервые в эксперименте исследовано влияние введения АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR на качественный и количественный состав пристеночной микробиоты толстой кишки в условиях хронического иммобилизационного стресса. Впервые изучены морфофункциональные показатели стенки толстой кишки после введения АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR в условиях стресса. Впервые изучено влияние многократного введения АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR в условиях хронического иммобилизационного стресса на поведение крыс с использованием тестов «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт». Впервые исследовано влияния введения АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR на уровень кортикостерона сыворотки крови крыс при хроническом иммобилизационном стрессе. Впервые установлены эффективные дозы АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR, обладающие значительным корригирующим воздействием в отношении стрессиндуцированных сдвигов изучаемых показателей в условиях хронического иммобилизационного стресса. Впервые проведена патофизиологическая оценка корреляционных взаимосвязей определяемых показателей в условиях хронического иммобилизационного стресса и введения АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR.

**Теоретическая и практическая значимость исследования.** Полученные в работе экспериментальные данные расширяют существующие представления о патогенетических механизмах формирования стрессиндуцированного дисбиоза. Результаты работы способствуют обоснованию возможности применения

пептида АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP для фармакологической коррекции стрессиндуцированных изменений состава микробиоценоза толстой кишки.

На основании экспериментальных данных получен патент «Применение пептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (семакса) для коррекции дисбиоза при хроническом иммобилизационном стрессе» (патент на изобретение №2709527 от 18.12.2019 г.).

Результаты проделанной работы свидетельствуют о широком спектре физиологических и фармакологических эффектов регуляторных пептидов, дополняют существующие представления о регуляции и функционировании оси «кишечник-мозг» и способствуют разработке новых путей патогенетически обоснованной коррекции стрессиндуцированных сдвигов в организме.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Применение пептида АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP способствует коррекции стрессиндуцированных нарушений состава мукозной микробиоты толстой кишки, морфометрических показателей ее стенки.

2. Нормализация при применении пептида АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP состава мукозной микробиоты толстой кишки, морфометрических показателей ее стенки на фоне коррекции состояния нервной системы и уровня кортикостерона являются подтверждением функциональных взаимосвязей в кишечно-мозговой оси.

3. Стрессиндуцированные нарушения состояния толстокишечной микробиоты и поведенческих реакций в условиях введения пептида АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP сопровождаются выраженными изменениями силы и направленности корреляционных взаимосвязей между определяемыми показателями.

**Степень достоверности и апробация работы.** Степень достоверности сформулированных в результате выполненной работы научных положений и выводов определяется полнотой литературно-библиографической справки, использованием общепринятых современных методов экспериментального моделирования, получения исследуемого материала и его изучения,

статистической обработки полученных результатов, которые адекватны задачам диссертационного исследования.

Материалы диссертационного исследования представлены и обсуждены на 83-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежная наука и современность», посвященной 83-летию КГМУ и 85-летию со дня рождения член-корреспондента РАМН, профессора А.В. Завьялова (Курск, 2018); Всероссийской научно-практической конференции «Павловские чтения» (Курск, 2018); 9-й Международной дистанционной научной конференции «Инновации в медицине», посвященной 83-летию Курского государственного медицинского университета (Курск, 2018); 84-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежная наука и современность», посвященной 84-летию Курского государственного медицинского университета и 100-летию со дня рождения профессора Г.М. Ткаченко (Курск, 2019); V Всероссийской научно-практической конференции «Павловские чтения» (Курск, 2019); 85-й Международной дистанционной научной конференции студентов и молодых ученых «Молодежная наука и современность» (Курск, 2020).

Апробация диссертации состоялась на совместном заседании кафедр микробиологии, вирусологии, иммунологии; патофизиологии; нормальной физиологии им. А.В. Завьялова; гистологии, эмбриологии, цитологии; патологической анатомии; фармакологии; общей гигиены; анатомии человека ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 17 от «30» июня 2020 г.).

**Внедрение результатов исследования.** Материалы диссертации используются в лекционных курсах кафедр микробиологии, вирусологии, иммунологии, патофизиологии, фармакологии Курского государственного медицинского университета; научно-исследовательской работе сектора регуляторных пептидов отдела химии физиологически активных веществ ФГБУ

Института молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения диссертации соответствуют формулам специальностей 03.02.03 – Микробиология и 14.03.03 – Патологическая физиология. Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследования специальностей, конкретно – пунктам 2, 6, 7 и пунктам 2, 7, 8, 10 паспортов, соответствующих специальностей.

**Публикации.** По материалам диссертации в центральной и региональной печати опубликовано 14 работ, включая 6 – в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (2 из них – в журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus), 1 – патент РФ на изобретение.

**Личный вклад автора в исследование.** Личный вклад автора осуществлялся на всех этапах работы в форме определения направления и планирования исследования, непосредственного выполнения серий эксперимента на всех этапах. Выполнены статистическая обработка, анализ и трактовка полученных результатов, сформулированы выводы и практические рекомендации, написаны статьи и тезисы, диссертация и автореферат. Личный вклад автора составляет 80-85%.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора данных литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, библиографического списка, включающего 263 источника, в том числе 86 отечественных и 177 зарубежных источника. Диссертация изложена на 160 страницах машинописного текста, содержит таблиц – 20, рисунков – 19.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Эксперименты выполнены на 60 крысах-самцах Вистар массой 200-230 г, полученных из SPF-вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Содержание животных и экспериментальные исследования проводились в соответствии с принципами Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей, «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Москва, 2012) под контролем регионального этического комитета (протокол № 3 от «30» октября 2017 г.).

В работе использовали пептид Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR), синтезированный в Институте молекулярной генетики РАН и являющийся действующей субстанцией фармакологического препарата семакс, который растворяли в изотоническом растворе хлорида натрия и за 12-15 минут до моделирования иммобилизационного стресса вводили интраперитонеально экспериментальным животным в дозах 5, 50, 150 и 450 мкг/кг в объеме из расчета 1 мл на 1 кг массы тела крысы. Нестрессированным и стрессированным контрольным животным вводили эквивалентные объемы физиологического раствора в аналогичные промежутки времени.

**Моделирование хронического иммобилизационного стресса (ХИС)** осуществляли с использованием модификации методик Chen H. et al. (2008), Wang S.W. (2002) и Zheng J. et al. (2009). Животных помещали в индивидуальные прозрачные пластиковые пеналы с отверстиями для вентиляции, которые соответствовали размерам крысы, и фиксировали в положении на спине. Иммобилизацию проводили ежедневно по 2 часа в течение 14 дней (Kim M. H. et al., 2014).

**Исследования функционального состояния нервной системы крыс.**

Поведение животных в тесте «открытое поле» (ОП) оценивали в

экспериментальной установке фирмы PanLab (Испания), поведенческие показатели регистрировали с использованием программы для видеослежения SMART 3.0 и программного расширения для детектирования тела животного. В течение 5 минут оценивали двигательную (горизонтальную) и исследовательскую (вертикальную) активность, эмоциональность, короткий груминг. Вертикальную активность оценивали путем подсчета центральных и периферических стоек. Эмоциональность животного определяли по количеству фекальных болюсов и актов уринации. Кроме этого, регистрировали время и дистанцию в центральных и периферических квадратах.

При исследовании поведения животных **в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ)** в течение 5 минут регистрировали время нахождения крыс в открытых и закрытых рукавах, на центральной площадке, а также число свешиваний из открытых рукавов установки с использованием программы для видеослежения SMART 3.0 (PanLab, Испания).

**Методика забора биологического материала.** Животных выводили из эксперимента под наркозом путем обескровливания с использованием закрытых систем для взятия крови S-Monovette® с активатором свертывания для получения сыворотки производства SARSTEDT (Германия). Непосредственно после забоя животного производили забор участка толстой кишки, который использовали для микробиологического и морфологического исследований.

**Исследование мукозной микробиоты толстой кишки крыс** проводили по стандартной методике Кафарской Л.И. и Коршунова В.М. (Богданова Е.А. и др., 2006). Качественное исследование микробиоты осуществляли с помощью масс-спектрометра Maldi Biotyper Microflex (Bruker, США). Количество микроорганизмов в 1 грамме аутопсийного материала рассчитывали исходя из подсчета числа выросших колоний – колониеобразующих единиц (КОЕ). Для расчета использовали стандартную формулу, содержание микроорганизмов выражали как lg КОЕ/г массы исследуемого материала. Частоту встречаемости и

относительное среднее идентифицируемого рода определяли согласно стандартным формулам расчета (Плоскирева А.А. и др., 2015).

**Морфологическое исследование толстой кишки** проводили по стандартной методике с использованием гистологических срезов толстой кишки толщиной 5-7 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином. На микрофотографиях изучали гистоархитектонику толстой кишки, глубину крипт, число бокаловидных клеток, наличие и выраженность некротических и воспалительных изменений, количество нейтрофилов, лимфоцитов, макрофагов, плазмоцитов, число разных типов тучных клеток.

**Определение уровня кортикостерона в сыворотке крови крыс** проводили методом ИФА с использованием тест-системы «Corticosterone ELISA Kit ADI-900-097» (Enzo, США) на иммуноферментном анализаторе «Lazurite» (Dy nex Technologies Inc.", США) в соответствии с протоколом производителя.

**Статистическую обработку данных** проводили с помощью программы «Statistica Trial» и пакета прикладных программ Microsoft Office Excel 2010. С целью проверки гипотезы о характере распределения исследуемых данных применяли тест Колмогорова–Смирнова. При подтверждении гипотезы о нормальном распределении: использовали параметрический непарный  $t$ -критерий Стьюдента, при отклонении гипотезы – непараметрический непарный  $U$ -критерий Манна–Уитни. Значимость полученных результатов оценивали с помощью дисперсионного анализа (one-way ANOVA и с применением критерия Крускала–Уоллиса) Характер корреляционных взаимосвязей между признаками устанавливали при помощи коэффициента ранговой корреляции Спирмена ( $r_s$ ). Результаты считали достоверными при  $p \leq 0,05$

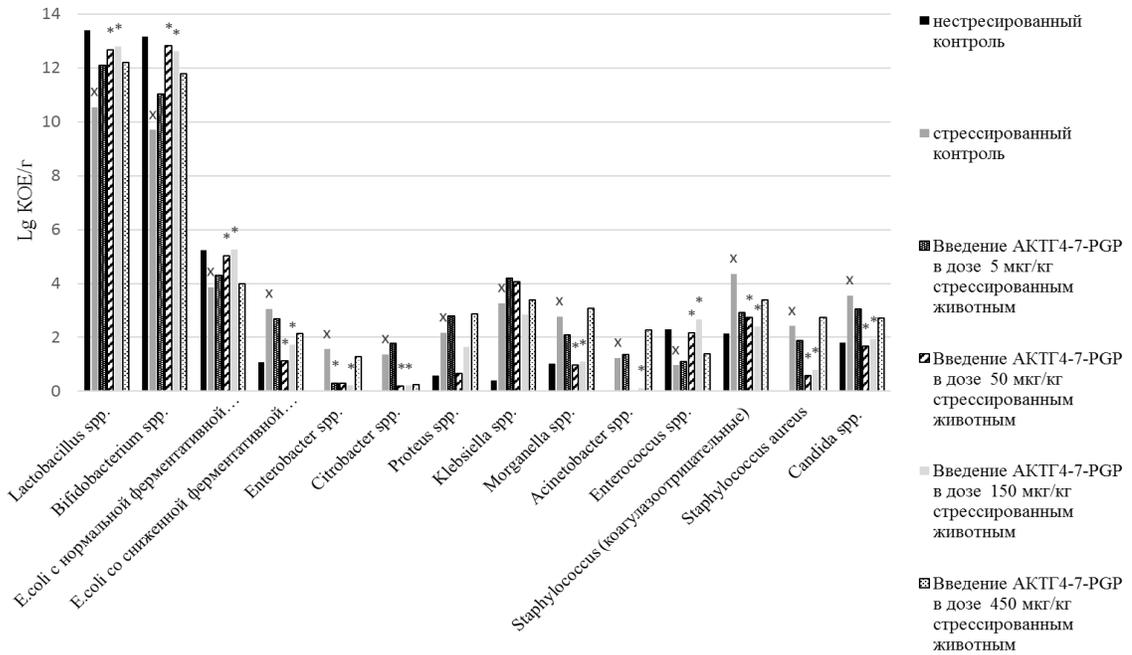
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Состояние микробиоты толстой кишки крыс при ХИС в условиях применения АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP.**

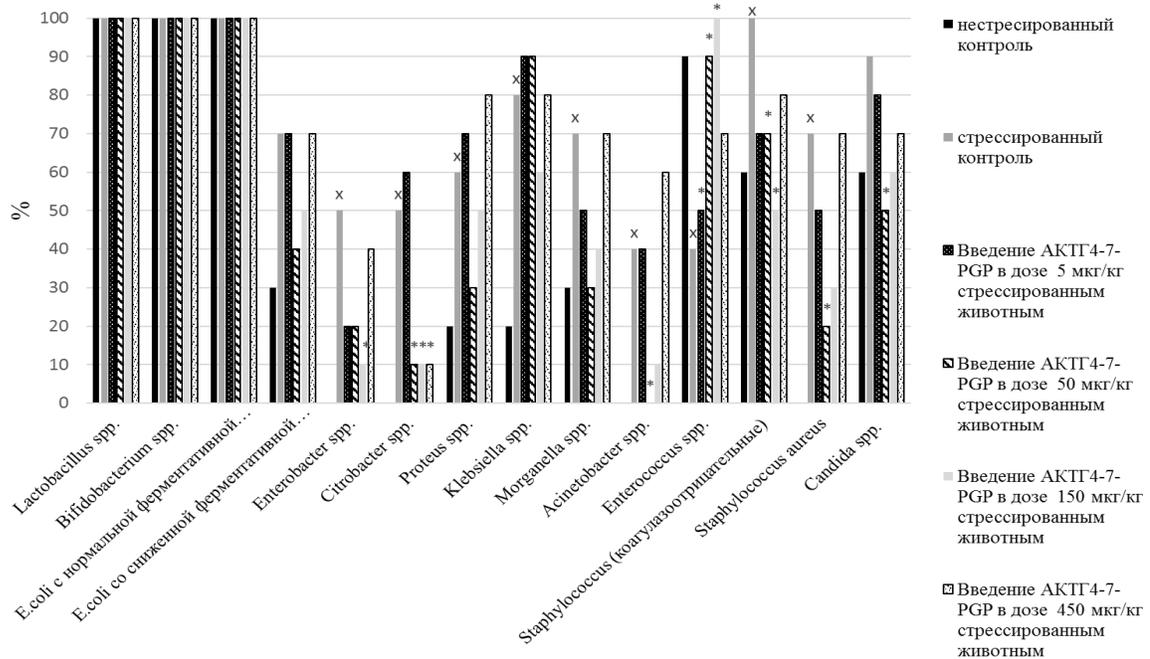
У стрессированных животных состояние пристеночной микробиоты

характеризовалось уменьшением содержания облигатных бактерий: лактобактерий, бифидобактерий и кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью на фоне роста числа факультативных микроорганизмов: кишечных палочек со сниженной ферментативной активностью, клебсиелл, морганелл, протеев, коагулазоотрицательных стафилококков, грибов рода *Candida*, а также появления микроорганизмов, идентифицированных как *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter* и *Staphylococcus aureus* (рисунок 1А).

Применение пептида АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP в дозе 5 мкг/кг приводило к снижению количества энтеробактеров. Достоверных отличий между значениями Ig КОЕ/г других представителей микробиоценоза толстой кишки крыс не установлено. Использование АКТГ<sub>4-7</sub>- PGP в дозах 50 и 150 мкг/кг эффективно корригировало стрессиндуцированный дисбиоз. Так, введение пептида в дозе 50 мкг/кг привело к восстановлению значений количественных и качественных показателей 9 из 14 представителей микробиоты толстой кишки (лактобацилл, бифидобактерий, кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью и со сниженной ферментативной активностью, цитробактеров, морганелл, коагулазоотрицательных и золотистых стафилококков, а также грибов рода *Candida*). При применении АКТГ<sub>4-7</sub>- PGP в дозе 150 мкг/кг произошло восстановление количественного и качественного состава микробиоты, определяемые показатели 11 из 14 идентифицированных микроорганизмов достигли уровня значений нестрессированных животных (лактобациллы, бифидобактерии, кишечные палочки с нормальной и со сниженной ферментативной активностью, энтеробактеры, цитробактеры, морганеллы, ацинетобактеры, коагулазоотрицательные и золотистые стафилококки, грибы рода *Candida*). Введение пептида в дозе 450 мкг/кг не оказывало влияние на содержание облигатных и факультативных представителей микробиоты.



А

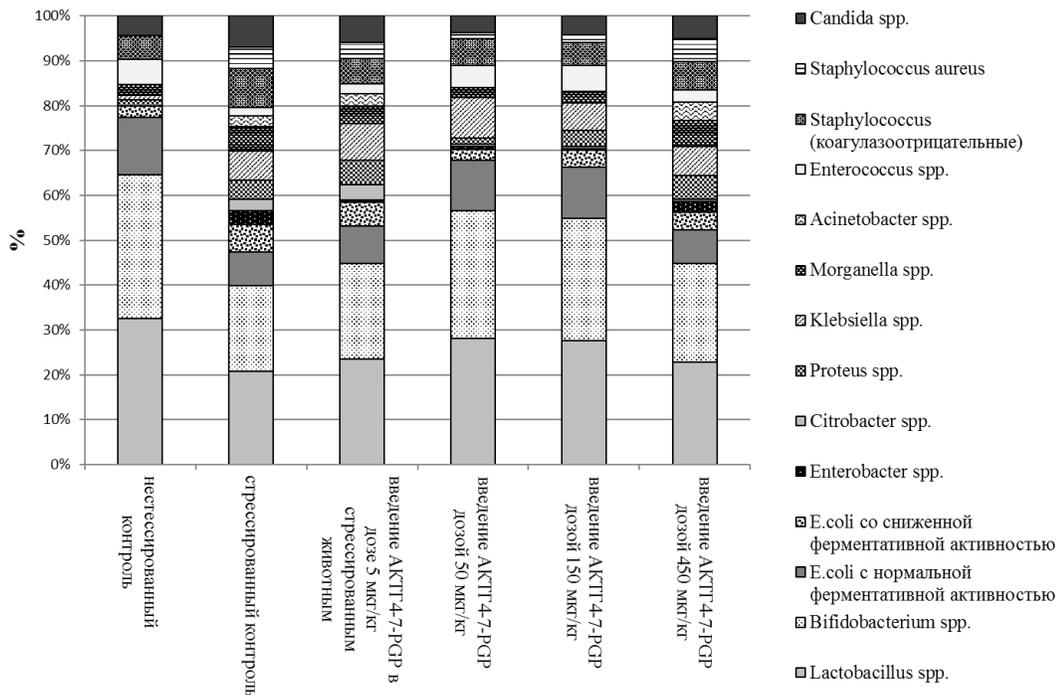


Б

**Рисунок 1 – Содержание (lg КОЕ/г,  $M \pm m$ ) А и частота встречаемости (% ,  $P \pm m_p$ ) Б представителей пристеночной микробиоты толстой кишки при применении Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro в условиях ХИС**

**В условиях воздействия иммобилизационного стресса достоверно**

возросла частота встречаемости факультативных представителей толстокишечной микробиоты: протеев, морганелл, коагулазоотрицательных и золотистого стафилококков, кишечных палочек со сниженной ферментативной активностью, клебсиелл, энтеробактера, цитробактера, ацинетобактера. Лактобактерии, бифидобактерии, и кишечные палочки с нормальной ферментативной активностью встречались в 100% случаев во всех экспериментальных группах (рисунок 1Б). Наиболее эффективно значения определяемого показателя корректировались при введении АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR в дозах 50 и 150 мкг/кг за счет снижения частоты встречаемости факультативных представителей микробиоценоза.



**Рисунок 2 – Доля каждого рода представителей пристеночной микробиоты толстой кишки при применении Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro в условиях ХИС, %**

Доля лактобактерий и бифидобактерий преобладала в популяции всех опытных групп (рисунок 2). При стрессировании относительное среднее данных представителей существенно сократилось, как и доля кишечной палочки с нормальной ферментативной активностью, при этом определяемый показатель

для кишечной палочки со сниженной ферментативной активностью и других бактерий относящихся к группе факультативных представителей микробиоты возрос.

Применение пептида в дозе 5 мкг/кг не приводило к существенным изменениям структуры микробиоценоза толстой кишки крыс. Наибольший эффект определялся при использовании АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP в дозе 50 мкг/кг, при этом числовые значения относительного среднего максимально приближались к значениям данного показателя у контрольных нестрессированных животных. При использовании АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP в дозе 150 мкг/кг отмечается увеличение значений показателя относительного среднего для облигатных представителей толстокишечного микробиоценоза и, как следствие, значительное уменьшение доли факультативных условно-патогенных микроорганизмов. При применении пептида в дозе 450 мкг/кг значимых отличий в структуре микробиоценоза толстой кишки крыс в сравнении со стрессированным контролем не установлено (рисунок 2).

### **Изменения морфофункционального состояния толстой кишки в условиях ХИС и при применении АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP.**

По результатам исследования аутопсийного материала контрольной стрессированной группы в результате воздействия иммобилизационного стресса в стенке толстой кишки наблюдались выраженные воспалительные явления, сочетающиеся с дистрофическими, дисциркуляторными и дезорганизационными расстройствами (таблица 2).

**Таблица 1 – Морфометрические показатели толстой кишки крыс при применении Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro в условиях ХИС, (M±m)**

Показатель \ Группа	Контроль без стресса n=10	Животные, подвергшиеся хроническому иммобилизационному стрессу				
		Контроль n=10	Введение АКТГ <sub>4-7</sub> -PGP в дозе			
			5 мкг/кг n=10	50 мкг/кг n=10	150 мкг/кг n=10	450 мкг/кг n=10

Глубина крипт (мкм)	174,9±0,78	142,4±1,93 <sup>xx</sup>	143,6±3,2	149,7±1,62* *	151,2±1,41* *	157,1±3,53* *
Бокаловидные клетки	67,2±1,77	58,5±1,12 <sup>xx</sup>	61±2,39	62,2±1,21* *	63,66±1,63* *	75±1,38**
ТК 1 типа	5±0,32	19,6±0,48 <sup>xx</sup>	22,7±0,83* *	11,2±0,5**	7,7±0,37**	8,8±0,59**
ТК 2 типа	5,9±0,21	14,5±0,51 <sup>xx</sup>	13,9±0,64	10,7±0,46**	7,9±0,42**	8±0,44**
ТК 3 типа	5,5±0,33	17,1±0,62 <sup>xx</sup>	15,6±0,59	14,8±0,61* *	11,6±0,5**	8,6±0,56**
ТК 4 типа	4,9±0,26	13,4±0,47 <sup>xx</sup>	13,4±0,64	15,3±0,43**	11,2±0,51**	10,3±0,72**
Нейтрофилы (%)	1,6±0,14	7,3±0,52 <sup>xx</sup>	6,1±0,59	3,6±0,29**	3,3±0,2**	3,3±0,27**
Лимфоциты (%)	19,4±0,53	36,9±0,82 <sup>xx</sup>	33,1±0,99* *	24,6±0,78**	24,7±0,91**	24,1±0,81**
Макрофаги (%)	4±0,34	12,5±0,72 <sup>xx</sup>	10,7±0,54	14,6±0,49* *	15,5±0,77* *	17,1±0,65**
Плазмоциты (%)	10,2±0,37	14,4±0,81 <sup>xx</sup>	12,3±0,56* *	12±0,56* *	12,8±0,93	18,3±1,16**

*Примечание: в данной и последующих таблицах <sup>x</sup>-  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой «нестрессированный контроль», <sup>xx</sup>-  $p \leq 0,01$  по сравнению с группой «нестрессированный контроль», \* -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой «стрессированный контроль», \*\* -  $p \leq 0,01$  по сравнению с группой «стрессированный контроль».*

Применение АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP дозозависимо нивелировало стрессиндуцированные патоморфологические изменения толстой кишки за счет увеличения скорости адаптации, снижения числа воспалительных клеточных элементов и изменения активности тучных клеток.

### **Поведенческие показатели функционального состояния нервной системы у крыс в условиях ХИС и при применении АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP.**

Исследование поведенческих реакций у экспериментальных животных проводили дважды – до начала опытов и по их окончании. Результаты тестирования в начале эксперимента показали отсутствие достоверных отличий во всех подопытных группах животных, что свидетельствовало об одинаковых исходных условиях в группах, и является важным условием для адекватного анализа полученных экспериментальных данных.

**Влияние ХИС и применения АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP на поведенческие реакции крыс в тесте «открытое поле».** В условиях стресса отмечались достоверно

значимые сдвиги исследованных поведенческих показателей у крыс контрольной группы: изменение горизонтальной двигательной активности в виде увеличения числа пересеченных центральных квадратов и дистанции, пройденной в них, а также времени, проведенного животными в центральных и периферических квадратах (таблица 2). Кроме того, стрессорное воздействие способствовало усилению эмоциональности, о чем свидетельствует достоверное увеличение количества уринаций, а также тенденция к увеличению числа фекальных болюсов. Статистически значимая активация короткого груминга у стрессированных крыс свидетельствует о повышении уровня тревожности.

Введение АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP в дозе 5 мкг/кг не вызывало статистически значимых сдвигов исследованных показателей в сравнении с контрольной группой стрессированных животных.

Увеличение дозы пептида до 50 мкг/кг приводило к ослаблению эмоциональности в виде уменьшения уринаций. При этом отмечалось снижение груминга, что может указывать на снижение уровня фрустрации у крыс.

При введении АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP в дозе 150 мкг/кг сохранялась направленность изменений поведенческих реакций, наблюдавшаяся в предыдущей опытной группе при тенденции к увеличению их выраженности: отмечалось уменьшение горизонтальной двигательной активности в центральной части установки: снижалось число пересеченных центральных квадратов (таблица 2). Уровни тревожности и эмоциональности также имели тенденцию к снижению.

**Таблица 2 – Поведенческие показатели в тесте ОП при применении Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro в условиях ХИС, (Me (Q1-Q3))**

Группа Показатель	Контроль без стресса n=10	Животные, подвергшиеся хроническому иммобилизационному стрессу				
		Контроль n=10	Введение АКТГ <sub>4-7</sub> -PGP в дозе			
			5 мкг/кг n=10	50 мкг/кг n=10	150 мкг/кг n=10	450 мкг/кг n=10
Центральные квадраты						
Число	0	2 <sup>x</sup>	0,5	1	0*	0,5

пересеченных квадратов	(0; 1)	(1; 2)	(0; 2)	(0; 4)	(0; 2)	(0; 2)
Время, проведенное в центральных квадратах	0 (0; 0,37)	0,7 <sup>x</sup> (0,6; 1,55)	0,24 (0; 0,64)	0,28 (0; 2,91)	0 (0; 1,17)	0,15 (0; 0,94)
Пройденная дистанция	0 (0; 15,9)	27,08 <sup>x</sup> (2,26; 45,85)	4 (0; 35,66)	10,09 (0; 77,62)	0 (0; 49,6)	6,62 (0; 28,91)
<b>Периферические квадраты</b>						
Число пересеченных квадратов	20 (15; 27)	28,5 (17; 44)	21 (12; 28)	22,5 (17; 38)	29,5 (24; 39)	28,5 (19; 53)
Время, проведенное в периферических квадратах	300 (299,63; 300)	299,31 <sup>x</sup> (298,45; 299,94)	299,77 (299,36; 300)	299,73 (297,1; 300)	300 (298,83; 300)	299,85 (299,06; 300)
Пройденная дистанция	507,38 (417,68; 694,21)	735,81 (412,34; 1017,08)	493,67 (312,55; 709,77)	589,63 (454,48; 947,76)	712,32 (600,66; 1039,98)	690,31 (571,55; 1134,17)
<b>Общие показатели</b>						
Количество болюсов	1 (0; 1)	1,5 (1; 2)	2 (1; 2)	1 (1; 2)	1 (1; 1)	1 (0; 3)
Количество уринаций	0 (0; 2)	1,5 <sup>x</sup> (1; 2)	1 (1; 2)	1* (0; 1)	1* (1; 1)	2 (1; 2)
Грумминг	0 (0; 1)	2 <sup>x</sup> (1; 3)	1 (0; 2)	0,5* (0; 1)	0** (0; 1)	1 (0; 2)

Дальнейшее увеличение дозы АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR до 450 мкг/кг сопровождалось нивелированием выявленных в предыдущих двух группах эффектов.

**Изменения поведенческих показателей крыс в приподнятом крестообразном лабиринте при применении АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR в ХИС.** В результате воздействия стресса происходило значительное изменение поведенческой активности крыс в ПКЛ: достоверно увеличивалось время, проведенное как в закрытых рукавах экспериментальной установки, и уменьшалось в открытых рукавах (таблица 3). О стрессиндуцированном росте уровня тревожности свидетельствует и снижение числа свешиваний из открытых рукавов.

Применение АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR способствовало снижению вызванного стрессом

повышения уровня тревожности у крыс, имело анксиолитическую направленность и зависело от величины использованной дозы. При этом введение АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP в дозе 5 мкг/кг вызывало существенное увеличение времени нахождения животных на центральной площадке и уменьшение времени нахождения животных в закрытых рукавах.

**Таблица 3 – Уровень тревожности крыс в ПКЛ при применении Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro в условиях ХИС, (Me (Q1-Q3))**

Показатель \ Группа	Контроль без стресса n=10	Животные, подвергшиеся хроническому иммобилизационному стрессу				
		Контроль n=10	Введение АКТГ <sub>4-7</sub> -PGP в дозе			
			5 мкг/кг n=10	50 мкг/кг n=10	150 мкг/кг n=10	450 мкг/кг n=10
Время, проведенное в открытых рукавах	34,04 (21,42; 43,6)	16,24 <sup>x</sup> (8,52; 30,2)	25,32 (13,68; 40,35)	31,39* (21,16; 37,57)	34,1** (24,32; 44,29)	29,45 (14,88; 44,77)
Время, проведенное в закрытых рукавах	250,07 (240,62; 275,96)	276,91 <sup>x</sup> (264,52; 279,24)	254,23** (249,62; 263,9)	255,95** (242,53; 262)	253,01** (243,95; 269,08)	257,58* (237,16; 267,45)
Время, проведенное на центральной площадке	10,92 (2,72; 23,65)	8,02 (4,96; 12,24)	16,77* (11,22; 25,45)	14,18* (10,57; 16,93)	7,73 (4,85; 11,27)	10,21 (8,4; 17,67)
Число свешиваний	7 (6; 9)	4 <sup>x</sup> (4; 8)	5 (3; 9)	6 (5; 7)	7,5 (5; 8)	5,5 (2; 10)

Однако наибольшее снижение показателей стрессиндуцированной тревожности наблюдалось после введения пептида в дозах 50 и 150 мкг/кг, достигая в ряде случаев уровня контрольных нестрессированных животных. Дальнейшее увеличение используемой дозы АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP до 450 мкг/кг не приводило к значительному росту анксиолитического эффекта.

**Содержание кортикостерона в сыворотке крови крыс в условиях ХИС и применения АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP.** По окончании эксперимента уровень кортикостерона в сыворотке крови стрессированных крыс возрос на 58,9%

( $p \leq 0,01$ ), что свидетельствует о перестройке продукции адаптивных гормонов в условиях использованной стрессорной модели и предполагает развитие у крыс стрессорной реакции в стадии резистентности (рисунок 3). Введение АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP во всех дозах сопровождалось статистически достоверным снижением содержания уровня гормона в сыворотке крови. Применение пептида в дозе 5 мкг/кг приводило к уменьшению содержания кортикостерона на 28,6% ( $p \leq 0,01$ ). Увеличение вводимой дозы препарата до 50 мкг/кг сопровождалось снижением уровня гормона на 34,2% ( $p \leq 0,01$ ), которое было наибольшим среди всех подопытных групп. Введение пептида в дозе 150 мкг/кг вызывало снижение уровня гормона на 27% ( $p \leq 0,01$ ), а в дозе 450 мкг/кг – на 32,2% ( $p \leq 0,01$ ).

**Корреляционные взаимосвязи между состоянием микробиоты, нервной системы и стенки толстой кишки в условиях ХИС и применения АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP.** Воздействие ХИС способствовало формированию значительного числа различных по направленности и силе корреляционных взаимосвязей между исследованными показателями, которые могут быть следствием напряжения адаптивных реакций организма в условиях продолжительного стрессорного воздействия. Введение АКТГ<sub>4-7</sub>-PGP оказывало значительное влияние на характер корреляционных взаимоотношений между исследованными показателями, которое зависело от величины использованной дозы пептида.

## **ВЫВОДЫ**

1. Хронический стресс в виде многократной (в течение 14 дней) иммобилизации крыс вызывал в составе мукозной микробиоты толстой кишки формирование стрессиндуцированного дисбиоза в виде уменьшения содержания облигатных представителей на фоне увеличения количества и появления ранее не идентифицируемых факультативных бактерий. При этом стрессорное воздействие не оказывало влияние на частоту встречаемости облигатных представителей микробиоценоза, но изменяло данный показатель для условно-патогенных представителей данного биотопа, а также структуру

популяции.

2. Применение пептида АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR в дозах 50 мкг/кг и 150 мкг/кг корригировало стрессиндуцированный дисбиоз вследствие роста количества и доли облигатных представителей микробиоты кишечника, а также снижения удельного содержания факультативных микроорганизмов, частоты их встречаемости и доли в исследуемой популяции.

3. Морфофункциональное состояние толстой кишки после ХИС характеризовалось развитием атрофических проявлений, признаками экссудативного воспаления, увеличением числа и изменением функциональной активности тучных клеток. Применение АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR вызывало дозозависимое нивелирование стрессиндуцированных патоморфологических изменений в стенке толстой кишки.

4. Введение пептида АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR в условиях ХИС способствовало коррекции стрессиндуцированных сдвигов в поведении у крыс в виде уменьшения уровней тревожности и эмоциональности (в дозах 50 и 150 мкг/кг), горизонтальной двигательной активности (в дозе 150 мкг/кг). Характер эффектов пептида при этом имел анксиолитическую направленность.

5. Используемая в работе модель ХИС вызывала увеличение содержания кортикостерона в сыворотке крови, характерное для стресс-реакции в стадии резистентности. Введение АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR во всех использованных дозах вызывало значительное снижение уровня гормона в крови экспериментальных животных.

6. ХИС способствовал формированию многочисленных корреляционных связей различной направленности и силы между исследованными показателями, отражающими развитие стрессиндуцированных сдвигов в организме. Введение стрессированным крысам АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR оказывало выраженное дозозависимое влияние на корреляционные взаимоотношения изученных параметров за счет уменьшения количества

взаимосвязей и изменения их характера.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Учитывать установленные эффекты при введении пептида АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR в отношении состояния микробиоты толстой кишки на изученной модели в случае возможного его использования у пациентов, находящихся в условиях продолжительного стрессорного воздействия.

2. Использовать в учебном процессе медицинских ВУЗов данные о полифункциональности регуляторных пептидов на примере биологических эффектов пептида АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Кабанова С.А. Влияние пептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (семакса) на состояние толстокишечной микробиоты при хроническом иммобилизационном стрессе / С.А. Кабанова, Е.А. Шкурат, **М.В. Свищева** // Молодежная наука и современность: материалы 85-ой Международной научной конференции студентов и молодых ученых, посвященной 85-летию КГМУ. – Курск, 2020. – С. 91-94.

2. Колупаев Н.С. Анализ частоты встречаемости представителей мукозной микробиоты толстой кишки крыс в условиях иммобилизационного стресса / Н.С. Колупаев, **М.В. Свищева** // Молодежная наука и современность: материалы 84-й Международной научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием, посвященной 84-летию КГМУ и 100-летию со дня рождения профессора Г.М. Ткаченко. – Курск, 2019. – Ч. 1. – С. 111-113.

3. Микрoэкологические изменения муцинового слоя толстой кишки крыс при применении семакса в условиях иммобилизационного стресса / **М.В. Свищева**, А.Ю. Мухина, О.А. Медведева, А.В. Шевченко, И.И. Бобынцев, П.В. Калуцкий, Л.А. Андреева, Н.Ф. Мясоедов // **Астраханский медицинский журнал**. – 2019. - №4. – С. 60-67.

4. Морфологические особенности толстой кишки крыс при стресс-

индуцированном дисбиозе / А.Ю. Мухина, Бобынцев И.И., Медведева О.А., Мишина Е.С., **Свищева М.В.**// **Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»**. – 2019. – № 2. – С. 80-86.

5. Морфофункциональное состояние толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса и при применении пептида АКТГ<sub>(4-7)</sub>-PGP (Семакса) / **М.В. Свищева**, Е.С. Мишина, О.А. Медведева, И.И. Бобынцев, А.Ю. Мухина, П.В. Калущкий, Л.А. Андреева, Н.Ф. Мясоедов// **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2020. – Том 170, – № 9. – С. 383-387.

6. Мухина А.Ю. Влияние гипокинезии и иммобилизационного стресса на состояние микробиоценоза толстой кишки крыс / А.Ю. Мухина, А.В. Шевченко, **М.В. Свищева** // Молодежная наука и современность: материалы 83-й всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием, посвященной 83-летию КГМУ и 85- летию со дня рождения член-корреспондента РАМН, профессора А.В. Завьялова. – Курск, 2018. – Ч. 1. – С. 69.

7. Мухина А.Ю. Влияние иммобилизационного стресса на состояние микробиоты толстой кишки крыс / А.Ю. Мухина, **М.В. Свищева**, А.В. Шевченко // Взаимодействие науки и общества: проблемы и перспективы: материалы международной научно-практической конференции. – Челябинск, 2018. – Ч.2. – С. 131-133.

8. Мухина А.Ю. Микроэкология толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса / А.Ю. Мухина, **М.В. Свищева**, А.В. Шевченко // Инновации в медицине: материалы девятой международной дистанционной научной конференции, посвященной 83-летию Курского государственного медицинского университета. – Курск, 2018 – С. 73-76.

9. Оценка состояния микробиоценоза толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса и при применении селанка / А.Ю.

Мухина, О.А. Медведева, **М.В. Свищева**, А.В. Шевченко, Н.Н. Ефремова, И.И. Бобынцев, П.В. Калуцкий, Л.А. Андреева, Н.Ф. Мясоедов // **Инфекция и иммунитет.** – 2019. – № 5-6. – С. 805-810.

10. Оценка состояния микробиоценоза толстой кишки экспериментальных животных в условиях иммобилизационного стресса / А.Ю. Мухина, О.А. Медведева, **М.В. Свищева**, А.В. Шевченко, Н.Н. Ефремова, И.И. Бобынцев, П.В. Калуцкий // **Астраханский медицинский журнал.** – 2019. - № 1. – С. 54-60.

11. **Свищева М.В.** Анализ состояния толстокишечной микробиоты при стрессе / М.В. Свищева, А.Ю. Мухина, А.В. Шевченко // Университетская наука: взгляд в будущее: материалы Международной научной конференции, посвященной 85-летию Курского государственного медицинского университета. – Курск, 2020. – С. 92-96.

12. **Свищева М.В.** Состояние толстокишечного микробиоценоза при иммобилизационном стрессе / М.В. Свищева, А.Ю. Мухина, О.А. Медведева // Молодежь - практическому здравоохранению: материалы XIII Всероссийская с международным участием научная конференция студентов и молодых ученых-медиков. – Иваново, 2019. – С. 306-308.

13. Composition of Colon Microbiota in Rats Treated with ACTH(4-7)-PGP Peptide (Semax) under Conditions of Restraint Stress / **M.V. Svishcheva** [et al.] // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine.** – 2020. – Vol. 169, Iss. 3. – P. 357-360.

14. **Патент №2709527** РФ, МПК А 61 К 38/08, А 61 Р 1/14. Применение пептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (семакса) для коррекции дисбиоза при хроническом иммобилизационном стрессе / **М.В. Свищева**, А.Ю. Мухина, О.А. Медведева, П.В. Калуцкий, А.В. Шевченко, И.И. Бобынцев, Л.А. Андреева, Н.Ф. Мясоедов; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России – № 2019124360; заявл. 29.07.2019; опубл. 18.12.2019, Бюл. № 35. – 23 с.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АКТГ – адренотропный гормон

АКТГ<sub>4-7</sub>-PGR – метионин-глутамин-гистидин-фенилаланин-пролин-глицин-пролин

КОЕ – колониобразующая единица

ОП – открытое поле

ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт

ТК – тучные клетки

ХИС – хронический иммобилизационный стресс