

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

УДК 616.345-008.87-08:616.89-092.9

1.5.11. Микробиология (медицинские науки)

doi: 10.48612/agmu/2022.17.4.68.77

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА АКТГ(6-9)-PRO-GLY-PRO НА СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА

* Антон Олегович Ворвуль¹, Ольга Анатольевна Медведева¹, Игорь Иванович Бобынцев¹,
Александра Юрьевна Мухина¹, Оксана Викторовна Шеховцова², Мария Владимировна Свищева¹,
Людмила Александровна Андреева³, Николай Федорович Мясоедов³

¹Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

²Курский онкологический научно-клинический центр им. Г.Е. Островерхова, Курск, Россия

³Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский Институт», Москва, Россия

Аннотация. Хронический стресс является одним из факторов развития дисбиоза кишечника, который может привести к нарушению функционирования центральной нервной системы, поэтому целесообразным является поиск новых подходов к решению данной проблемы. **Цель исследования** – изучить состояние парietальной микробиоты толстой кишки при применении АКТГ₆₋₉-PGP в условиях хронического иммобилизационного стресса. **Материалы и методы исследования.** Подопытные крысы были разделены на 5 групп (n = 11). 1 группа – контроль (нестрессированные животные, которым вводили физиологический раствор), 2 группа – животные, подвергнутые стрессорному воздействию, которым вводили физиологический раствор. В последующие три группы вошли стрессированные животные, которым вводили АКТГ₆₋₉-PGP в разных дозах. В 3 группе доза составила 5 мкг/кг, в 4 группе – 50 мкг/кг, в 5 группе – 500 мкг/кг. Изучены эффекты пептида АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro на состав мукозальной микробиоты толстой кишки у крыс Вистар в условиях хронического иммобилизационного стресса на протяжении 14 дней. Пептид вводили интраперитонеально в дозах 5, 50 и 500 мкг/кг 1 раз в сутки. **Результаты исследования.** Стрессорное воздействие вызвало изменение состава микробиоты в виде уменьшения числа и доли облигатных микроорганизмов и их увеличения среди условно-патогенных микроорганизмов на фоне повышенного содержания кортикостерона в сыворотке крови животных. Применение пептида во всех исследуемых дозах корректировало стресс-индуцированные изменения структуры пристеночной микробиоты толстой кишки на фоне снижения уровня кортикостерона. При этом наиболее близкий по количественным и качественным характеристикам к нестрессированным животным состав микробиоты отмечали в группе животных, которым вводили пептид в дозе 500 мкг/кг. **Заключение.** Применение АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro способствовало нивелированию стрессиндуцированных изменений в составе пристеночной микрофлоры толстой кишки у крыс.

Ключевые слова: пристеночная микробиота, кишечно-мозговая ось, меланокортины, АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro, регуляторные пептиды, хронический стресс, кортикостерон

Для цитирования: Ворвуль А. О., Медведева О. А., Бобынцев И. И., Мухина А. Ю., Шеховцова О. В., Свищева М. А., Андреева Л. А., Мясоедов Н. Ф. Влияние пептида АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro на состояние микробиоценоза толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса // Астраханский медицинский журнал. 2022. Т. 17, № 4. С. 68–77. doi: 10.48612/agmu/2022.17.4.68.77.

ORIGINAL INVESTIGATIONS

Original article

* © Ворвуль А. О., Медведева О. А., Бобынцев И. И., Мухина А. Ю.,
Шеховцова О. В., Свищева М. А., Андреева Л. А., Мясоедов Н. Ф., 2022

EFFECT OF ACTH(6-9)-PRO-GLY-PRO PEPTIDE ON STATE OF COLON MICROBIOCENOSIS IN RATS UNDER CONDITIONS OF CHRONIC RESTRAINT STRESS

Anton O. Vorvul¹, Olga A. Medvedeva¹, Igor I. Bobyntsev¹, Alexandra Yu. Mukhina¹, Oksana V. Shekhovtsova², Maria V. Svishcheva¹, Luidmila A. Andreeva³, Nikolay F. Myasoedov³

¹Kursk State Medical University, Kursk, Russia

²G.E. Ostroverkhov Kursk Oncological Research and Clinical Center, Kursk, Russia

³Institute of Molecular Genetics, Kurchatov Institute, Moscow, Russia

Abstract. Chronic stress is one of the factors in the development of intestinal dysbiosis, which can lead to dysfunction of the central nervous system, so it is advisable to search for new approaches to solving this problem. **The purpose of the study** was to study the state of the parietal microbiota of the large intestine in the application of ACTH6-9-PGP under conditions of chronic immobilization stress. **Materials and methods:** Experimental rats were divided into 5 groups (n = 11): 1 – control (non-stressed animals that were injected with saline), 2 – stressed animals that were injected with saline, 3 – stressed animals who received ACTH6-9-PGP at a dose of 5 µg/kg, 4 – at a dose of 50 µg/kg, 5 – at a dose of 500 µg/kg. The effects of the ACTH(6-9)-Pro-Gly-Pro peptide on the composition of the mucosal microbiota of the large intestine in Wistar rats under conditions of chronic immobilization stress for 14 days were studied. The peptide was administered at doses of 5, 50, and 500 µg/kg intraperitoneally administered once a day. **Research results.** The stress effect caused a change in the composition of the microbiota in the form of a decrease in the number and proportion of obligate microorganisms and their increase among opportunistic microorganisms against the background of an increased content of corticosterone in the blood serum of animals. The use of the peptide in all studied doses corrected stress-induced changes in the structure of the parietal microbiota of the colon against the background of a decrease in the level of corticosterone. At the same time, the composition of the microbiota closest in quantitative and qualitative characteristics to non-stressed animals was observed in the group of animals that were injected with the peptide at a dose of 500 µg/kg. **Conclusion:** the use of ACTH(6-9)-Pro-Gly-Pro contributed to the leveling of stress-induced changes in the composition of the parietal microflora of the large intestine in rats.

Keywords: parietal microbiota, gut-brain axis, melanocortins, ACTH(6-9)-Pro-Gly-Pro, regulatory peptides, chronic stress, corticosterone

For citation: Vorvul' A. O., Medvedeva O. A., Bobyntsev I. I., Mukhina A. Yu., Shekhovtsova O. V., Svishcheva M. A., Andreeva L. A., Myasoedov N. F. Effect of ACTH(6-9)-Pro-Gly-Pro peptide on state of colon microbiocenosis in rats under conditions of chronic restraint stress. Astrakhan Medical Journal. 2022; 17 (4): 68–77. doi: 10.48612/agmu/2022.17.4.68.77. (In Russ.).

Введение. Известно, что хроническое стрессорное воздействие влияет на количественный и качественный состав микробиоты толстой кишки, что может привести к нарушению функций нервной системы за счет изменения взаимоотношений в кишечно-мозговой оси [1].

Перспективным направлением в решении данной проблемы является применение препаратов на основе регуляторных пептидов, которые обладают высокой биологической активностью в низких дозах на фоне отсутствия токсичности и аллергенности [2]. К числу таких препаратов относятся синтетические N-концевые аналоги адренокортикотропного гормона (АКТГ). Известно, что препарат Семакс, действующей субстанцией которого является АКТГ₄₋₇-Pro-Gly-Pro (АКТГ₄₋₇-PGP), обладает стресс-лимитирующим эффектом, оказывая анксиолитическое и антидепрессантное действие [3, 4]. Кроме того, применение АКТГ₄₋₇-PGP предотвращает развитие кишечного дисбиоза у крыс на фоне хронического иммобилизационного стресса (ХИС) [5]. Наряду с АКТГ₄₋₇-PGP в настоящее время был разработан близкий структурный аналог АКТГ₆₋₉-PGP, который способен связываться со всеми типами меланокортиновых рецепторов (MCR), за исключением MC2R [6, 7]. Для АКТГ₆₋₉-PGP показано анксиолитическое, антидепрессантное действие, в том числе и в условиях стресса [8, 9, 10, 11, 12, 13].

На основании вышеизложенного была поставлена **цель исследования** – изучить состояние парietальной микробиоты толстой кишки при применении АКТГ₆₋₉-PGP в условиях хронического иммобилизационного стресса.

Материалы и методы исследования. В опыте были использованы 55 крыс-самцов Вистар

массой 280–300 г. В помещении, где содержали животных, поддерживали температуру воздуха $22 \pm 2^\circ \text{C}$, влажность – $60 \pm 5 \%$ и 12-часовой режим (свет с 8 : 00 до 20 : 00). Животные были обеспечены кормом и водой ad libitum [14].

Исследование одобрено региональным этическим комитетом при Курском государственном медицинском университете (протокол № 3 от 16 ноября 2020 г.). Все эксперименты соответствовали принципам ARRIVE и были проведены в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [14].

Подопытные крысы были разделены на 5 групп ($n = 11$). 1 группа – контроль (нестрессированные животные, которым вводили физиологический раствор), 2 группа – животные, находящиеся в условиях хронического иммобилизационного стресса (ХИС), которым вводили физиологический раствор. В последующие три группы вошли стрессированные животные, которым вводили АКТГ6-9-PGP в разных дозах. В 3 группе доза составила 5 мкг/кг (ХИС + 5 мкг/кг), в 4 группе – 50 мкг/кг (ХИС + 50 мкг/кг), в 5 группе – 500 мкг/кг (ХИС + 500 мкг/кг).

В исследовании использовали N-концевой аналог АКТГ, АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro (His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro), синтезированный в Институте молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт» РАН, который растворяли в физиологическом растворе и вводили интраперитонеально в дозах 5, 50 и 500 мкг/кг ежедневно за 15 мин до начала каждого стрессорного воздействия в объеме из расчета 1 мл на 1 кг массы тела. Интактные и контрольные животные ежедневно получали эквивалентные объемы физиологического раствора (рис. 1).

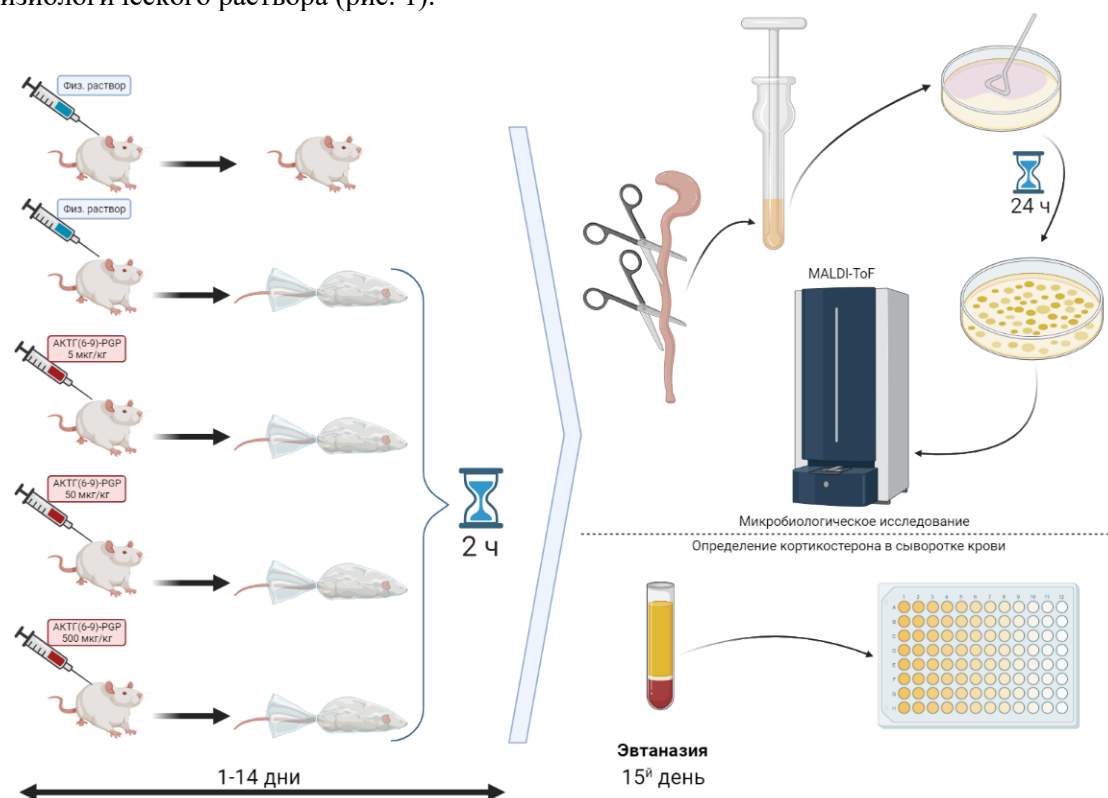


Рис. 1. Дизайн исследования
Fig. 1. Experiment design

Для моделирования ХИС крыс помещали в тесные прозрачные пластиковые вентилируемые пены, размеры которых подбирали индивидуально для каждого животного, амплитуду дыхательных движений контролировали визуально. Стрессорное воздействие проводили ежедневно в течение 2 часов (с 11:00 до 13:00 ч) на протяжении 14 дней.

Через 24 часа после заключительного стрессорного воздействия проводили эвтаназию животных путем забора крови из правого желудочка сердца после двусторонней парастеральной торакотомии под эфирным наркозом.

Качественную и количественную оценку микробиоты слизистой оболочки осуществляли следующим способом [15]: среднюю часть толстой кишки крысы выделяли, промывали стерильным физиологическим раствором для удаления ее содержимого и взвешивали в асептических условиях. Затем

аутопаты гомогенизировали в стерильном фосфатном буфере (рН = 7,0) с помощью гомогенизатора Поттера («Deltalab», Испания) в отношении 1 : 10 (ткань/буфер). С целью разжижения кишечного мускула и экстракции пристеночной микробиоты гомогенаты инкубировали в течение 2 ч при 37°С. Далее приготавливали их разведения в концентрациях 10^{-2} – 10^{-4} и в объеме 0,1 мл каждого разведения засеивали газом 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°С в течение 24 ч.

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

Количественную оценку парietальной микробиоты толстой кишки крыс осуществляли с учетом удельного содержания идентифицированных микроорганизмов в 1 г аутоптата кишки. Оценка производилась на основе числа колониеобразующих единиц (КОЕ), при посеве на чашки Петри материала с наибольшим разведением (оценивались результаты посева, в которых было более 10 колоний микроорганизмов). КОЕ рассчитывали по следующей формуле:

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

где E – общее количество микроорганизмов, k – объем посеянного материала, v – количество чашек Петри, на которых 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:

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

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

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

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

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

Для оценки выраженности стресс-реакции проводили количественную оценку содержания кортикостерона в сыворотке крови с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора «Corticosterone ELISA kit» («Enzo Life Sciences», США) в соответствии с инструкцией производителя.

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). Для подтверждения гипотезы о нормальности распределения применяли критерий Шапиро–Уилка, а для подтверждения гипотезы о равенстве дисперсий – критерий Левене. При принятии гипотезы о нормальности для определения значимых различий между двумя группами применяли t-критерий Стьюдента с поправкой Уэлча для сравнения двух групп, однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным тестом Данетта – для сравнения четырех групп. При отклонении гипотезы – U-критерий Манна–Уитни для сравнения 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. Установлено, что ХИС оказывал выраженное влияние на состав пристеночной микробиоты (табл.) и способствовал снижению числа облигатных микроорганизмов: *Lactobacillus spp.* в 1,3 раза ($p < 0,05$), *Bifidobacterium spp.* – в 1,3 раза ($p < 0,05$), *Escherichia coli* с нормальной ферментативной активностью (ФА) – в 1,6 раза ($p < 0,01$) на фоне увеличения уровня кортикостерона (на 21,3 %, $p < 0,01$) по сравнению с контрольными животными (рис. 2).

Таблица. Количественный состав мукозальной микробиоты толстой кишки крыс при ХИС и при применении АКТГ₆₋₉-PGP (lg КОЕ/г; М ± m)
Table. Quantative analysis of the rats' gut microbiome under chronic restraint stress and administration of АСТН₆₋₉-PGP (lg CFU/g; М ± m)

Идентифицированный микроорганизм	Контроль	ХИС	ХИС+ 5 мкг/кг	ХИС+ 50 мкг/кг	ХИС+ 500 мкг/кг
Lactobacillus spp.	10,79 ± 0,95	8,04 ± 0,58 [×]	10,37 ± 0,74*	9,72 ± 0,78	10,92 ± 0,93*
Bifidobacterium spp.	11,26 ± 1,01	8,46 ± 0,65 [×]	9,91 ± 0,77	10,94 ± 0,93*	11,34 ± 1,08*
E. coli с нормальной ФА	5,65 ± 0,57	3,63 ± 0,33 [×]	4,4 ± 0,52	4,12 ± 0,4	5,05 ± 0,59*
E. coli со сниженной ФА	2,95 ± 0,58	1,08 ± 0,38 [×]	2,61 ± 0,48*	1,67 ± 0,52	2,67 ± 0,54*
Enterobacter spp.	0	2,09 ± 0,54 [×]	0,67 ± 0,35*	1,11 ± 0,41	0,46 ± 0,31*
Citrobacter spp.	0	1,66 ± 0,50 [×]	0,5 ± 0,26*	0,39 ± 0,27*	0**
Proteus spp.	0,93 ± 0,39	2,55 ± 0,45 [×]	1,32 ± 0,39*	0,70 ± 0,36**	1,09 ± 0,47*
Klebsiella spp.	0,96 ± 0,41	2,78 ± 0,47 [×]	2,625 ± 0,51	2,145 ± 0,49	2,56 ± 0,54
Morganella spp.	0	1,63 ± 0,42 [×]	0,54 ± 0,28*	0,57 ± 0,3*	0,37 ± 0,25*
Acinetobacter spp.	0	1,38 ± 0,38 [×]	1,58 ± 0,355	0**	0,18 ± 0,18*
Enterococcus spp.	2,68 ± 0,45	1,18 ± 0,42 [×]	1,4 ± 0,43	1,97 ± 0,4	2,42 ± 0,4*
Staphylococcus (коагулазоотрицательные)	3,07 ± 0,26	4,31 ± 0,30 [×]	3,37 ± 0,27	3,78 ± 0,335	3,21 ± 0,37*
S. aureus	0	1,8 ± 0,45 [×]	0,55 ± 0,34*	0,46 ± 0,31*	0,71 ± 0,37
Candida spp.	1,51 ± 0,36	2,96 ± 0,39 [×]	1,79 ± 0,32*	2,18 ± 0,40	1,43 ± 0,41**

Примечание: [×] – $p < 0,05$ по сравнению с группой 1 (контроль) (по U-критерию Манна–Уитни), [×] – $p < 0,01$ по сравнению с группой 1 (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)

Note: [×] – $p < 0,05$ compared to the group «Control» (Wilcoxon-Mann-Whitney U-test), [×] – $p < 0,01$ compared to the group «Control» (Wilcoxon-Mann-Whitney U-test), * – $p < 0,05$ compared to the group «Chronic restraint stress (CRS)» (Kruskell-Wallis test with post hoc Dunn's test), ** – $p < 0,01$ compared to the group «CRS» (Kruskell-Wallis test with post hoc Dunn's test)

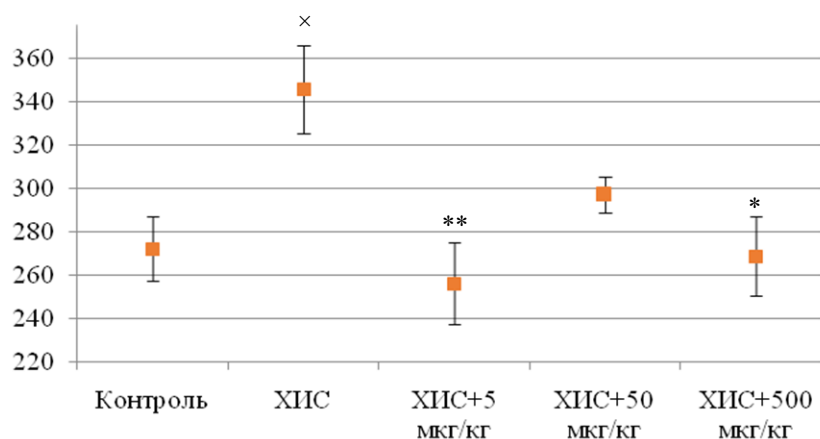


Рис. 2. Уровни кортикостерона у экспериментальных животных (М ± m), нг/мл

Fig. 2. Corticosterone levels in experimental animals (M ± m), ng/ml

Примечание: [×] – $p < 0,01$ по сравнению с группой 1 (контроль) (по t-критерию Стьюдента с поправкой Уэлча), * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «ХИС» (по ANOVA с апостериорным тестом Данетта), ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой «ХИС» (по ANOVA с апостериорным тестом Данетта)

Note: [×] – $p < 0,01$ compared to the group «Control» (Welch's t-test), * – $p < 0,05$ compared to the group «Chronic restraint stress (CRS)» (ANOVA with post hoc Dunett's test), ** – $p < 0,01$ compared to the group «CRS» (ANOVA with post hoc Dunett's test)

Также отмечалось снижение числа *E. coli* со сниженной ФА (в 2,7 раза, $p < 0,01$) и *Enterococcus spp.* (в 2,3 раза, $p < 0,01$). При этом установлено увеличение числа *Proteus spp.* (в 2,7 раза, $p < 0,05$), *Klebsiella spp.* (в 2,9 раза, $p < 0,01$), коагулазоотрицательных бактерий рода *Staphylococcus* (в 1,4 раза, $p < 0,01$) и *Candida spp.* (в 1,96 раза, $p < 0,05$). Кроме того, в условиях стресса в составе микробиоценоза муцинового слоя появились такие представители, как энтеробактеры, цитробактеры, морганеллы, ацинетобактеры и золотистый стафилококк, которые не наблюдались у контрольных животных.

Введение АКТГ₆₋₉-PGR в дозе 5 мкг/кг приводило к значимому повышению числа лактобактерий (в 1,3 раза, $p < 0,05$) и *E. coli* со сниженной ФА (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, $p < 0,05$) и уровня кортикостерона на 34,9 % ($p < 0,01$).

У животных, которым вводили АКТГ₆₋₉-PGR 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*. Уровень кортикостерона у животных данной группы значимо не изменился по сравнению со стрессированными животными, получавшими физиологический раствор ($p > 0,05$).

На фоне внутрибрюшинного введения АКТГ₆₋₉-PGR 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 ФА (в 1,4 раза, $p < 0,05$). Также отмечалось увеличение числа *E. coli* со сниженной ФА (в 2,5 раза, $p < 0,05$) и энтерококков (в 2,1 раза, $p < 0,05$) на фоне значимого снижения числа энтеробактеров, протеев, морганелл, ацинетобактеров, коагулазоотрицательных стафилококков, грибов рода *Candida* (в 1,3–7,7 раз, $p < 0,05$) при отсутствии бактерий рода *Citrobacter* и уменьшении уровня кортикостерона в сыворотке крови на 28,6 % ($p < 0,05$).

Оценка частоты встречаемости (ЧВ) микроорганизмов показала значимые различия между нестрессированными и стрессированными животными для бактерий родов *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Acinetobacter*, а также для вида *S. aureus* ($p < 0,05$) (рис. 3). При применении АКТГ₆₋₉-PGR в дозе 50 мкг/кг значимо снизилась ЧВ *Acinetobacter spp.* ($p < 0,05$), а при введении пептида в дозе 500 мкг/кг – *Citrobacter spp.* ($p < 0,05$).

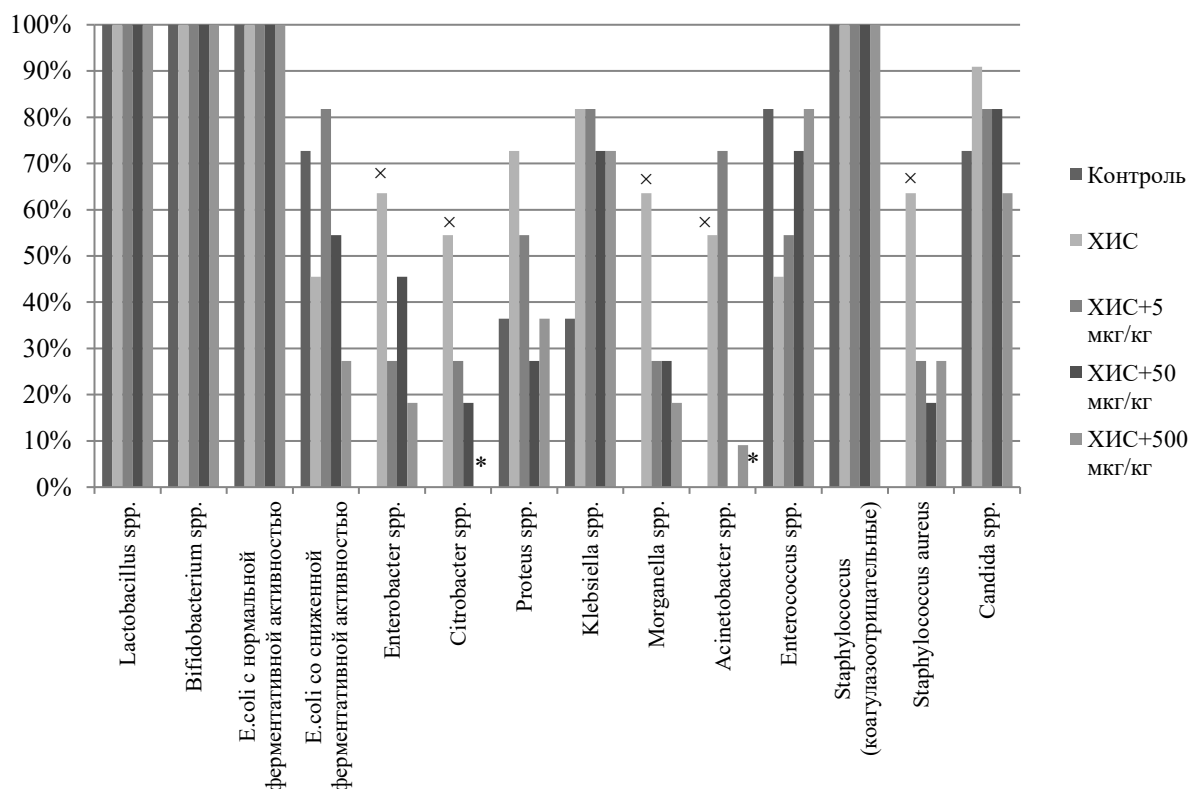


Рис. 3. Частота встречаемости представителей парietальной микробиоты толстой кишки, %

Fig. 3. Frequency of occurrence of representatives of the parietal microbiota of the colon, %

Примечание: × – $p \leq 0,05$ по сравнению с группой группой 1 (контроль) (по точному критерию Фишера),
* – $p \leq 0,05$ по сравнению с группой «ХИС» (по точному критерию Фишера)

Note: × – $p \leq 0,05$ compared to the group «Control» (Fisher's exact test), * – $p \leq 0,05$ compared to the group «Chronic restraint stress (CRS)» (Fisher's exact test)

Во всех исследуемых группах животных в составе микробиоценоза мукозального слоя толстой кишки преобладали лакто- и бифидобактерии. На фоне ХИС отмечалось некоторое уменьшение доли

данных микроорганизмов, а также 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 АКТГ₆₋₉-PGP во всех исследуемых 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) (рис. 4).

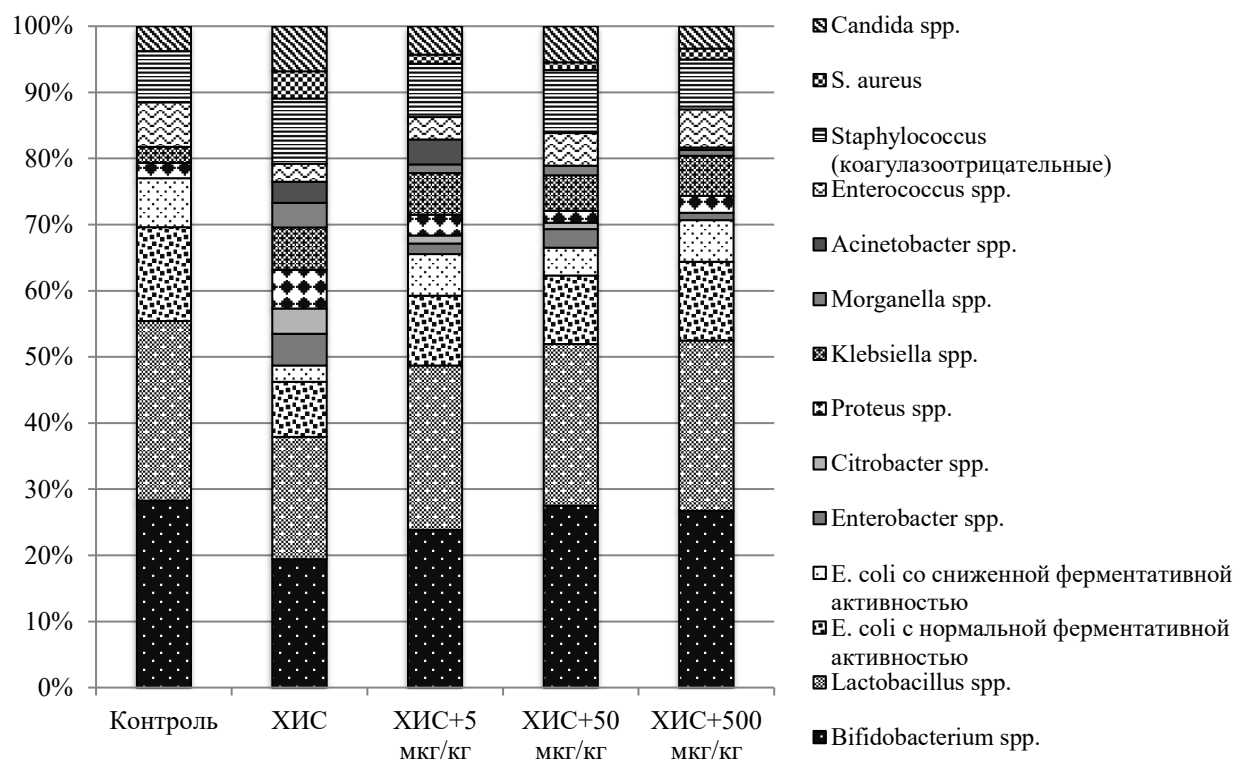


Рис. 4. Доля идентифицированных микроорганизмов в составе микробиоты толстой кишки в экспериментальных группах, %

Fig. 4. Proportion of identified microorganisms in the gut microbiome composition of the animals under study, %

Установленные в результате исследования эффекты пептида АКТГ₆₋₉-PGP на состояние мукозальной микрофлоры могли реализовываться как через центральные, так и через периферические механизмы. Центральное действие пептида заключается в его стресс-лимитирующем эффекте вследствие способности АКТГ₆₋₉-PGP проходить через гематоэнцефалический барьер и взаимодействовать с MC3R и MC4R головного мозга [6, 16]. Реализация периферических эффектов пептида может происходить через его взаимодействие с меланокортиновыми рецепторами кишечника (MC3R и MC4R) [6]. Кишечная микробиота находится в тесном контакте с иммунной системой, поэтому выявленные эффекты пептида могут реализовываться и за счет его иммуномодулирующих свойств [17].

Заключение. Таким образом, хронический (14-дневный) иммобилизационный стресс приводит к значительным изменениям количественного и качественного состава парietальной микробиоты толстой кишки у крыс Вистар, которые выражались в снижении числа и доли облигатных представителей микрофлоры (*Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *E. coli* с нормальной ферментативной активностью) и увеличении и/или появлении условно-патогенных и транзитных микроорганизмов (клебсиелл, протеев, морганелл, энтеробактеров, ацинетобактеров, коагулазоотрицательных стафилококков, *S. aureus* и грибов рода *Candida*). Ежедневное внутрибрюшинное введение АКТГ₆₋₉-PGP в дозах 5, 50 и 500 мкг/кг препятствовало развитию наблюдавшихся стресс-индуцированных сдвигов в микробиоценозе муцинового слоя толстой кишки. Результаты настоящей работы и данные других исследований эффектов N-концевых аналогов АКТГ свидетельствуют о необходимости продолжения изучения

механизмов их влияния на функционирование кишечно-мозговой оси с целью дальнейшего выяснения развития стрессиндуцированных сдвигов в организме и роли меланокортиновой системы в них.

Список источников

1. Foster J. A., McVey Neufeld K. A. Gut-brain axis : how the microbiome influences anxiety and depression // Trends Neurosci. 2013. Vol. 36. P. 305–312.
2. Хавинсон В. Х. Лекарственные пептидные препараты : прошлое, настоящее, будущее // Клиническая медицина. 2020. Т. 98, № 3. С. 165–177.
3. Ворвуль А. О., Бобынцев И. И., Свищева М. В., Медведева О. А., Мухина А. Ю., Андреева Л. А. Пептид АКТГ4–7-PGP корригирует поведение и уровень кортикостерона у крыс в условиях хронического стресса // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2021. Т. 107, № 11. С. 1359–1371.
4. Koroleva S. V., Myasoedov N. F. Semax as a Universal Drug for Therapy and Research // Biology Bulletin 2018. Vol. 45, no. 6. P. 589–600.
5. Svishcheva M. V., Mukhina A. Yu., Medvedeva O. A., Shevchenko A. V., Bobyntsev I. I., Kalutskii P. V., Andreeva L. A., Myasoedov N. F. Composition of Colon Microbiota in Rats Treated with ACTH(4-7)-PGP Peptide (Semax) under Conditions of Restraint Stress // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2020. Vol. 169, no. 3. P. 357–360.
6. Clark A. J., Forfar R., Hussain M., Jerman J., McIver E., Taylor D. ACTH Antagonists // Frontiers in Endocrinology. 2016. Vol. 7. P. 101.
7. Wikberg J. E. S., Muceniece R., Mandrika I., Prusis P., Lindblom J., Post C., Skottner A. New aspects on the melanocortins and their receptors // Pharmacological Research. 2000. Vol. 42, no. 5. P. 393–420.
8. Додонова С. А., Бобынцев И. И., Белых А. Е., Анфилова М. Г., Андреева Л. А., Мясоедов Н. Ф. Сравнительное исследование антидепрессивной активности N-концевых аналогов аденокортикотропного гормона у крыс // Человек и его здоровье : Курский научно-практический вестник. 2019. № 4. С. 83–89.
9. Левицкая Н. Г., Глазова Н. Ю., Себенцова Е. А., Манченко Д. М., Андреева Л. А., Каменский А. А., Мясоедов Н. Ф. Ноотропные и анксиолитические эффекты гептапептида АКТГ6-9Pro-Gly-Pro // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2019. Т. 105, № 6. С. 761–770.
10. Dodonova S. A., Bobyntsev I. I., Belykh A. E., Vorvul' A. O. ACTH6-9-PGP improves memory consolidation processes in rats // Research Results in Pharmacology. 2021. Vol. 7, no. 1. P. 27–32.
11. Vorvul A. O., Bobyntsev I. I., Medvedeva O. A., Mukhina A. Yu., Scishcheva M. V., Azarova Iu. E., Andreeva L. A., Myasoedov N. F. 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 // Neuropeptides. 2022. Vol. 93. P. 102247.
12. Yasenyavskaya A., Samotrueva M., Tsibizova A., Bashkina O., Andreeva L., Myasoedov N. Effects of melanocortins on the behavior of rats in the test of elevated cruciform maze and experimentally induced of social stress // Archiv Euromedica. 2020. Vol. 10, no. 4. P. 35–38.
13. Yasenyavskaya A., Samotrueva M., Tsibizova A., Bashkina O., Andreeva L., Myasoedov N. Effects of neuropeptides on behavior of rats in open field test and experimentally induced social stress // Archiv Euromedica. 2020. Vol. 10, no. 3. P. 25–28.
14. Ворвуль А. О., Бобынцев И. И., Медведева О. А., Азарова Ю. Э., Белых А. Е., Андреева Л. А. Влияние пептида His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro на процессы свободнорадикального окисления в условиях хронического иммобилизационного стресса // Вестник РГМУ. 2021. № 6. С. 66–72.
15. Воробьев А. А., Несвижский Ю. В., Богданова Е. А., Корнеев М. Л., Матюхина О. Б. Исследование пристеночной микрофлоры кишечника крыс // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2005. № 3. С. 61–65.
16. Shevchenko K. V., Nagaev I. Y., Babakov V. N., Andreeva L. A., Shevchenko V. P., Radilov A. S., Myasoedov N. F. Proteolysis of His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro in the blood and brain of rats in vivo // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2015. Vol. 464, no. 1. P. 301–304.
17. Ясенявская А. Л., Цибизова А. А., Андреева Л. А., Мясоедов Н. Ф., Башкина О. А., Смотровева М. А. Влияние нейропептидного соединения АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro на уровень про- и противовоспалительных интерлейкинов // Международный научно-исследовательский журнал. 2022. № 1-2 (115). С. 137–139.

References

1. Foster J. A., McVey Neufeld K. A. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. Trends Neurosci. 2013; 36: 305–312.
2. Khavinson V. Kh. Peptide medicines: past, present, future. Klinicheskayameditsina = Clinical Medicine (Russian Journal). 2020; 98 (3): 165–177. (In Russ.).
3. Vorvul' A. O., Bobyntsev I. I., Svishcheva M. V., Medvedeva O. A., Mukhina A. Yu., Andreyeva L. A. Peptide ACTH4–7-PGP Ameliorates Behaviour and Stabilize Corticosterone Level in Rats Affected with Chronic Stress. Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I. M. Sechenova = Russian Journal of Physiology. 2021; 107 (11): 1359–1371. (In Russ.).
4. Koroleva S. V., Myasoedov N. F. Semax as a Universal Drug for Therapy and Research. Biology Bulletin. 2018; 45 (6): 589–600.

5. Svishecheva M. V., Mukhina A. Yu., Medvedeva O. A., Shevchenko A. V., Bobyntsev I. I., Kalutskii P. V., Andreeva L. A., Myasoedov N. F. Composition of Colon Microbiota in Rats Treated with ACTH(4-7)-PGP Peptide (Semax) under Conditions of Restraint Stress. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2020; 169 (3): 357–360.
6. Clark A. J., Forfar R., Hussain M., Jerman J., McIver E., Taylor D. ACTH Antagonists. *Frontiers in Endocrinology*. 2016; 7: 101.
7. Wikberg J. E. S., Muceniece R., Mandrika I., Prusis P., Lindblom J., Post C., Skottner A. New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacological Research*. 2000; 42 (5): 393–420.
8. Dodonova S. A., Bobyntsev I. I., Belykh A. E., Anfilova M. G., Andreeva L. A., Myasoedov N. F. Comparative study of antidepressive activity of N-terminal analogs of adrenocorticotrophic hormone in rats. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik «Chelovek i ego zdorov'ye» = Kursk Scientific and Practical Bulletin "Man and His Health"*. 2019; (4): 83–89. (In Russ.)
9. Levitskaya N. G., Glazova N. Yu., Sebentsova E. A., Manchenko D. M., Andreyeva L. A., Kamenskiy A. A., Myasoyedov N. F. Nootropic and anxiolytic effects of heptapeptide ACTH6-9Pro-Gly-Pro. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I. M. Sechenova = Russian Journal of Physiology*. 2019; 105 (6): 761–770. (In Russ.)
10. Dodonova S. A., Bobyntsev I. I., Belykh A. E., Vorvul' A. O. ACTH6-9-PGP improves memory consolidation processes in rats. *Research Results in Pharmacology*. 2021; 7 (1): 27–32.
11. Vorvul A. O., Bobyntsev I. I., Medvedeva O. A., Mukhina A. Yu., Scishcheva M. V., Azarova Iu. E., Andreeva L. A., Myasoedov N. F. 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. *Neuropeptides*. 2022; 93: 102247.
12. Yaseniyavskaya A., Samotrueva M., Tsibizova A., Bashkina O., Andreeva L., Myasoedov N. Effects of melanocortins on the behavior of rats in the test of elevated cruciform maze and experimentally induced of social stress. *ArchivEuromedica*. 2020; 10 (4): 35–38.
13. Yaseniyavskaya A., Samotrueva M., Tsibizova A., Bashkina O., Andreeva L., Myasoedov N. Effects of neuropeptides on behavior of rats in open field test and experimentally induced social stress. *Archiv Euromedica*. 2020; 10 (3): 25–28.
14. Vorvul A. O., Bobyntsev I. I., Medvedeva O. A., Azarova Yu. E., Belykh A. E., Andreeva L. A. Effects of His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro peptide on free-radical oxidation processes in conditions of chronic restraint stress. *Bulletin of RSMU*. 2021; (6): 61–66.
15. Vorobyev A. A., Nesvizhsky Yu. V., Bogdanova E. A., Korneev M. L., Matyukhina O. B. Study of the parietal microflora in the rat intestine. *Vestnik Rossiyskoy Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2005; (3): 61–65. (In Russ.)
16. Shevchenko K. V., Nagaev I. Y., Babakov V. N., Andreeva L. A., Shevchenko V. P., Radilov A. S., Myasoedov N. F. Proteolysis of His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro in the blood and brain of rats in vivo. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2015; 464 (1): 301–304.
17. Yaseniyavskaya A. L., Tsibizova A. A., Andreyeva L. A., Myasoyedov N. F., Bashkina O. A., Samotrueva M. A. On the effect of the neuropeptide compound ACTH(6-9)-Pro-Gly-Pro on the level of pro- and anti-inflammatory interleukins. *Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal = International Research Journal*. 2022; (1-2 (115)): 137–139. (In Russ.)

Информация об авторах

А.О. Ворвуть, аспирант, ассистент кафедры патофизиологии, младший научный сотрудник Научно-исследовательского института общей патологии, Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия, e-mail: vorvul1996@mail.ru.

О.А. Медведева, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии, Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия, e-mail: olgafrida@rambler.ru.

И.И. Бобынцев, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патофизиологии, Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия, e-mail: bobig@mail.ru.

А.Ю. Мухина, Александра Юрьевна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия, e-mail: 11lms@mail.ru.

О.В. Шеховцова, кандидат биологических наук, заведующая бактериологической лабораторией с молекулярно-генетическим анализом, Курский онкологический научно-клинический центр им. Г.Е. Островерхова», х. Кислино, Курская обл., Re-mail: shekhovtsovaov@kursksmu.net.

М.В. Свищева, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия, e-mail: mascha.svisheva@yandex.ru.

Л.А. Андреева, кандидат химических наук, руководитель сектора регуляторных пептидов отдела химии физиологически активных веществ, Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский Институт», Москва, Россия, e-mail: landr@img.ras.ru.

Н.Ф. Мясоедов, доктор химических наук, академик РАН, заведующий отделом химии физиологически активных веществ, Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский Институт», Москва, Россия, e-mail: nfm@img.ras.ru

Information about the authors

A.O. Vorvul, post-graduate student, assistant lecturer, junior researcher, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, e-mail: vorvul199@mail.ru.

O.A. Medvedeva, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head of Department, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, e-mail: olgafrida@rambler.ru.

I.I. Bobyntsev, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Department, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, e-mail: bobig@mail.ru.

A. Yu. Mukhina, Cand. Sci. (Med.), Assistant lecturer, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, e-mail: 111ms@mail.ru.

O.V. Shekhovtsova Oksana Victorovna, Cand. Sci. (Biol.), Head of Laboratory, G.E. Ostroverkhov Kursk Oncological Research and Clinical Center, Kislino, Russia, e-mail: shekhovtsovaov@kursksmu.net.

M.V. Svishcheva, Cand. Sci. (Med.), Assistant, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, e-mail: mascha.svisheva@yandex.ru.

L.A. Andreeva, Cand. Sci. (Chem.), Head of the regulatory peptide sector, Institute of Molecular Genetics, Kurchatov Institute, Moscow, Russia, e-mail: landr@img.ras.ru.

N.F. Myasoedov, Dr. Sci. (Chem.), Academician of RAS, Head of the Department of Chemistry of Physiologically Active Substances, Institute of Molecular Genetics, Moscow, Russia, e-mail: nfm@img.ras.ru.*

* Статья поступила в редакцию 17.05.2022; одобрена после рецензирования 01.12.2022; принята к публикации 15.12.2022.

The article was submitted 17.05.2022; approved after reviewing 01.12.2022; accepted for publication 15.12.2022.