

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА HIS-PHE-ARG-TRP-PRO-GLY-PRO НА ПРОЦЕССЫ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА

А. О. Ворвуль¹✉, И. И. Бобынцев¹, О. А. Медведева¹, Ю. Э. Азарова¹, А. Е. Белых¹, Л. А. Андреева²

¹ Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

² Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Изучение влияния регуляторных пептидов на развитие стресс-индуцированных сдвигов в организме имеет важное фундаментальное и прикладное значение. В настоящее время в медицине используют целый ряд нейротропных препаратов пептидной природы, оказывающих влияние на развитие стрессорной реакции, а также ведут исследование новых перспективных молекул. Целью работы было изучить эффекты синтетического аналога аденокортикотропного гормона (АКТГ) АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro в дозах 5, 50 и 500 мкг/кг на процессы свободнорадикального окисления у крыс Вистар в условиях двухнедельного хронического иммобилизационного стресса (ХИС). Уровни 8-оксо-2'-дезоксигуанозина (8-OHdG) и супероксиддисмутазы 3 (СОД3) в сыворотке крови оценивали с применением иммуноферментного анализа, а уровни продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП), оценивали флуориметрическим методом. ХИС приводил к значимому повышению уровня 8-OHdG на 18,4% ($p = 0,01$) и снижению СОД3 на 14,3% ($p = 0,01$), но не влиял на уровень ТБК-РП. Применение АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro в дозах 5 и 50 мкг/кг значимо снижало содержание 8-OHdG на 19,8% ($p = 0,03$) и 30% ($p = 0,001$) соответственно. Таким образом, установлено, что ХИС приводит к развитию окислительного стресса у животных. Введение АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro в дозах 5 и 50 мкг/кг оказывает ингибирующее влияние на стресс-индуцированные процессы свободнорадикального окисления.

Ключевые слова: регуляторные пептиды, His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro, свободнорадикальное окисление, окислительный стресс, хронический иммобилизационный стресс

Вклад авторов: А. О. Ворвуль — выполнение экспериментов, количественная оценка маркеров окислительного стресса, сбор и статистическая обработка данных, написание рукописи; И. И. Бобынцев — концепция и дизайн исследования, написание рукописи; О. А. Медведева — концепция и дизайн исследования; Ю. Э. Азарова — количественная оценка маркеров окислительного стресса; А. Е. Белых — написание рукописи; Л. А. Андреева — концепция и дизайн исследования, синтез пептида.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Курского государственного медицинского университета (протокол № 3 от 16 ноября 2020 г.). Все эксперименты соответствовали руководящим 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.

✉ **Для корреспонденции:** Антон Олегович Ворвуль
ул. К. Маркса, д. 3 г. Курск, 305041, Россия; vorvul1996@mail.ru

Статья получена: 28.10.2021 **Статья принята к печати:** 14.11.2021 **Опубликована онлайн:** 28.11.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.056

EFFECTS OF HIS-PHE-ARG-TRP-PRO-GLY-PRO PEPTIDE ON FREE-RADICAL OXIDATION PROCESSES IN CONDITIONS OF CHRONIC RESTRAINT STRESS

Vorvul AO¹✉, Bobytsev II¹, Medvedeva OA¹, Azarova YuE¹, Belykh AE¹, Andreeva LA²

¹ Kursk State Medical University, Kursk, Russia

² Institute of Molecular Genetics, RAS, Moscow, Russia

Studying the effects of regulatory peptides on the stress-induced shifts in the bodily processes is of great fundamental and applied significance. Currently, a wide range of peptide neurotropic drugs, affecting the stress response development, are used in medicine, and new promising molecules are being studied. The study was aimed to assess the effects of the adrenocorticotrophic hormone (ACTH) synthetic analog, ACTH(6-9)-Pro-Gly-Pro, administered at a dose of 5, 50 and 500 µg/kg, on the free-radical oxidation processes in Wistar rats, subjected to chronic restraint stress (CRS) during two weeks. Serum levels of 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and superoxide dismutase 3 (SOD3) were assessed by enzyme immunoassay, and the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were assessed by fluorimetric method. CRS lead to the significant increase in the 8-OHdG levels by 18.4% ($p = 0.01$) and the decrease in the SOD3 levels by 14.3% ($p = 0.01$), however, it had no effect on the levels of TBARS. ACTH(6-9)-Pro-Gly-Pro, administered at a dose of 5 and 50 µg/kg, significantly decreased the levels of 8-OHdG by 19.8% ($p = 0.03$) and 30% ($p = 0.001$), respectively. Thus, it was found that CRS resulted in oxidative stress in animals. ACTH(6-9)-Pro-Gly-Pro administration at a dose of 5 and 50 µg/kg inhibits the stress-induced free-radical oxidation processes.

Keywords: regulatory peptides, His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, ACTH(6-9)-Pro-Gly-Pro, free-radical oxidation, oxidative stress, chronic restraint stress

Author contribution: Vorvul AO — performing experiments, quantification of oxidative stress markers, data acquisition and statistical processing, manuscript writing; Bobytsev II — study concept and design, manuscript writing; Medvedeva OA — study concept and design; Azarova YuE — quantification of oxidative stress markers; Belykh AE — manuscript writing; Andreeva LA — study concept and design, peptide synthesis.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Kursk State Medical University (protocol № 3 dated November 16, 2020). All the experiments were in line with the ARRIVE guidelines and were performed in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anton O. Vorvul
Karla Marksa, 3, Kursk, 305041, Russia; vorvul1996@mail.ru

Received: 28.10.2021 **Accepted:** 14.11.2021 **Published online:** 28.11.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.056

Активация свободнорадикального окисления является одним из основных механизмов повреждения клетки при стрессорном воздействии на организм [1, 2], что обуславливает актуальность поиска эффективных подходов к цитопротекции при стрессе.

Одним из перспективных направлений в решении обозначенной выше проблемы может быть использование пептидных молекул [3, 4]. Преимуществом применения препаратов на основе регуляторных пептидов является отсутствие у них токсичности и аллергенности при

наличии широкого спектра физиологического и фармакологического действия [5]. К числу таких молекул принадлежат регуляторные пептиды из группы N-концевых аналогов аденокортикотропного гормона (АКТГ). Известно, что препарат семакс, действующей субстанцией которого является синтетический пептид АКТГ(4-7)-Pro-Gly-Pro, у стрессированных крыс оказывает корригирующее действие на гистоархитектонику и процессы свободнорадикального окисления в печени, а также на уровень сывороточных трансаминаз [6]. Кроме того, в условиях ишемии мозга семакс оказывает нейропротективное действие за счет повышения уровня экспрессии мозгового нейротрофического фактора (BDNF) [7].

Структурно и функционально родственным семаксу пептидом является His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro (АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro). Последовательность His-Phe-Arg-Trp, соответствующая участку АКТГ(6-9), является активным центром АКТГ, который взаимодействует со всеми типами меланокортиновых рецепторов (MCR), кроме MC2R [8]. При этом присоединение трипептида Pro-Gly-Pro к C-концу этой молекулы повышает ее устойчивость к действию карбоксипептидаз на фоне сохранения нейротропных эффектов. Подобно семаксу, АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro обладает широким спектром нейротропных эффектов, в т. ч. и на моделях со стрессорной нагрузкой, и в сопоставимых дозах способен проявлять более выраженную активность [9].

В связи с этим целью исследования было изучить влияние пептида АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro на процессы свободнорадикального окисления у крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса (ХИС).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

В опыте были использованы 55 крыс-самцов Вистар массой 280–300 г. В помещении, где содержали животных, поддерживали температуру воздуха 22 ± 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*. Крыс разделили на пять групп по 11 особей в каждой: 1 — интактные животные (введение физиологического раствора (ФР) без стрессирования), 2 — контрольная группа (ХИС + ФР), 3 — ХИС + АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro 5 мг/кг, 4 — ХИС + АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro 50 мг/кг, 5 — ХИС + АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro 500 мг/кг.

Хронический иммобилизационный стресс

ХИС моделировали путем помещения крыс в тесные прозрачные пластиковые боксы с отверстиями для вентиляции, размер которых подбирали индивидуально под каждое животное. Животных подвергали стрессу в течение 2 ч (с 11:00 до 13:00 ч) на протяжении 14 дней (рис. 1) [10].

Пептид

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 ФР и вводили внутривенно в дозах 5, 50 и 500 мг/кг ежедневно за 12–15 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 ФР. Используемые в эксперименте дозы пептида и протокол введения были выбраны в соответствии с имеющимися литературными данными об их эффективности [9, 11].

Получение сыворотки крови

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

Оценка интенсивности свободнорадикальных процессов и выраженности стресс-реакции

В качестве маркера окислительного повреждения клеточной ДНК был выбран метаболит нуклеиновых кислот 8-оксо-2'-дезоксигуанозин (8-OHdG), который исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора DNA/RNA Oxidative Damage (High Sensitivity) ELISA Kit (589320, Cayman Chemical; США). Кроме того, определяли концентрацию экстрацеллюлярной супероксиддисмутазы (СОД3) методом ИФА с использованием набора ELISA Kit For Superoxide Dismutase 3, Extracellular (SEA117Ra, Cloud-Clone Corp.; США) и продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП), флуориметрическим методом с помощью набора TBARS (TCA Method) Assay Kit (700870, Cayman Chemical; США).

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

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

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием языка программирования R v.4.1.0 [12] 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, а для подтверждения гипотезы о равенстве дисперсий — критерий Левене. В случае подтверждения гипотезы для сравнения двух групп использовали *t*-критерий Стьюдента с поправкой Уэлча, а для четырех групп — однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с апостериорным тестом Ньюмана–Кейлса. При отклонении применяли

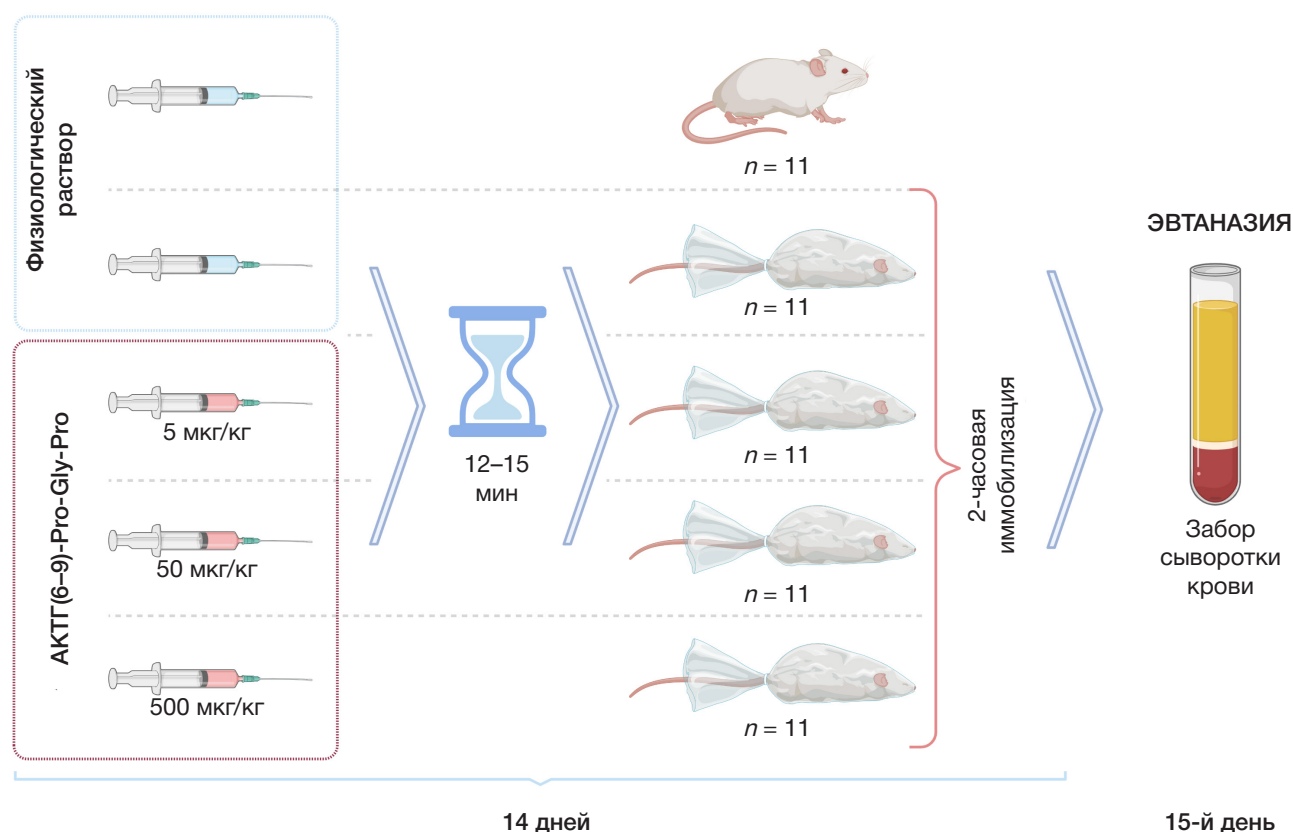


Рис. 1. Дизайн исследования

U-критерий Манна–Уитни для двух групп, а критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна — для четырех групп. Для снижения эффекта множественных сравнений использовали поправку Бенжамини–Хохберга. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследования установлено, что ХИС приводит к развитию окислительного стресса (рис. 2). Так, на фоне ХИС отмечалось значимое повышение уровня 8-OHdG на 18,4% ($p = 0,01$) на фоне значимого снижения содержания СОД3 на 14,3% ($p = 0,01$). При этом концентрация ТБК-РП не изменялась ($p = 0,43$).

При этом показано, что АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro корректирует вызванный ХИС окислительный стресс. Отмечены достоверные различия уровней 8-OHdG в сыворотке ($p = 0,0004$) между контрольными стрессированными животными и теми, кому вводили пептид. Однако значимые различия уровня СОД3 ($p = 0,2$) не обнаружены.

Апостериорный анализ установил, что при введении АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro в дозах 5 и 50 мкг/кг содержание 8-OHdG в сыворотке крови значимо снижалось на 19,8% ($p = 0,03$) и 30% ($p = 0,001$) соответственно. При этом пептид, вводимый в максимальной дозе 500 мкг/кг, не влиял на уровень 8-OHdG ($p = 0,72$).

На основании полученных данных также установлено, что при моделировании ХИС имело место значимое повышение уровня кортикостерона на 27% ($p = 0,009$). Применение АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro приводило к значимым изменениям уровня гормона ($p = 0,003$). Проведенный апостериорный анализ показал, что АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro в дозах 5, 50 и 500 мкг/кг приводил к значимому снижению содержания кортикостерона на 34,9% ($p = 0,004$), 16,4% ($p = 0,04$) и 28,6% ($p = 0,01$) соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе настоящего исследования было изучено влияние пептида АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro на процессы свободнорадикального окисления у крыс в условиях ХИС. Выбор маркеров свободнорадикального окисления, использованных в исследовании, связан с их диагностическим и патофизиологическим значением. Так, 8-OHdG является надежным биомаркером генерализованного и клеточного окислительного стресса, выступающим в качестве важного индикатора окислительного повреждения мозга при остром ишемическом инсульте, атеросклероза, сердечно-сосудистых заболеваний, нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, а также психических расстройств, таких как шизофрения и т. д. [13]. Другим выбранным маркером окислительного стресса является малоновый диальдегид (МДА) — продукт перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот и индикатор опосредованного активными формами кислорода повреждения клеточных мембран, уровни которого измеряют посредством оценки ТБК-РП [14]. СОД является антиоксидантом первой линии, инициирующим активацию процессов защиты от активных форм кислорода [15]. Описаны три изоформы СОД, однако преобладающим антиоксидантным ферментом в сыворотке является внеклеточная СОД3, а ее роль не ограничивается только удалением радикалов, но включает влияние на иммунные реакции и передачу клеточного сигнала [16]. В связи с этим для оценки изменений концентрации СОД3 в условиях ХИС и на фоне введения пептида в качестве надежного и специфического метода исследования, позволяющего точно идентифицировать именно данную изоформу фермента, использовали ИФА.

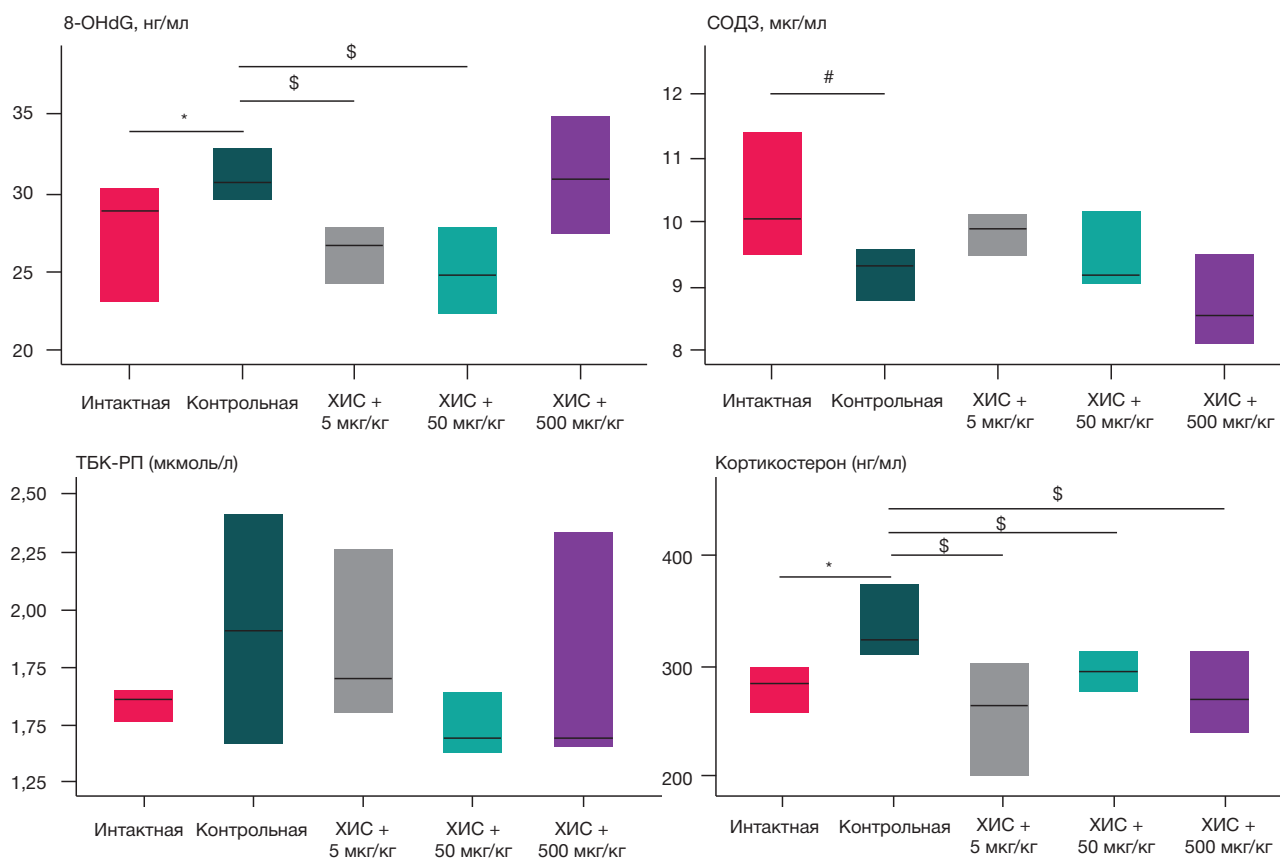


Рис. 2. Влияние пептида АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro на интенсивность свободнорадикальных процессов и выраженность стресс-реакции в условиях ХИС. * — $p < 0,05$, уровень статистической значимости различий в сравнении с контрольной нестрессированной группой (по t -критерию Стьюдента с поправкой Уэлча); # — $p < 0,05$, уровень статистической значимости различий в сравнении с контрольной группой (по U -критерию Манна-Уитни); \$ — $p < 0,05$, уровень статистической значимости различий в сравнении с контрольной стрессированной группой (по one-way ANOVA с апостериорным тестом Ньюмана-Кейлса); полуширная черта — медиана; ящик — межквартильный размах.

В ходе исследования было показано, что ХИС привел к значимому увеличению содержания продуктов свободнорадикального окисления ДНК/РНК в сыворотке экспериментальных животных. Подобные результаты были получены в аналогичной модели хронического стресса на мышах C57BL/6J [17]. Кроме того, ХИС привел к снижению содержания СОДЗ. Следует отметить, что активация свободнорадикального окисления и снижение концентрации СОДЗ происходили на фоне повышенного содержания в крови кортикостерона. Известно, что повышенный уровень кортикостерона сопровождается снижением активности ферментов антиоксидантной системы [18]. Таким образом, использованная в исследовании модель хронического стресса вызвала активацию процессов свободнорадикального окисления.

Было установлено, что ХИС не вызвал достоверных изменений уровня ТБК-РП. При этом в литературе имеются противоречивые данные о содержании этого маркера в сыворотке крови при продолжительном стрессорном воздействии. Так, в ряде исследований хронический стресс вызывал значимое повышение концентрации сывороточных ТБК-РП [19, 20]. Однако отмеченные изменения происходили на фоне хронического непредсказуемого стресса, характеризующегося раздражителями различной силы, в то время как нами была использована модель с монотонным стрессорным воздействием. В то же время имеются работы, в которых уровень сывороточных ТБК-РП в сходных с нашими экспериментальных условиях существенно не изменялся, несмотря на значимое повышение концентрации МДА в органах и тканях [18, 21]. Также важно отметить, что,

несмотря на быстроту и простоту, флуориметрические и спектрофотометрические методы определения ТБК-РП не всегда надежны в гетерогенных системах в силу способности альдегидов, отличных от МДА, генерировать производные, поглощающие свет в том же диапазоне длин волн [14]. В то же время отсутствие значимых сдвигов ТБК-РП в сыворотке крови в условиях хронического стресса также может быть связано с повышением к окончанию эксперимента активности антиоксидантных механизмов, не изученных в нашей работе. Поэтому для более полного выяснения механизмов установленных нами изменений в процессах свободнорадикального окисления необходимо в дальнейшем выполнить определение ряда дополнительных маркеров в сыворотке крови.

АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro в дозах 5 и 50 мкг/кг снизил интенсивность процессов свободнорадикального окисления, что отразилось в значимом снижении уровня 8-OHdG. В связи с этим следует отметить, что имеющий близкие с АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro структурные и функциональные свойства АКТГ(4-7)-Pro-Gly-Pro (семакс) в сопоставимых дозах оказывает цитопротективное действие на нейроны головного мозга в условиях ишемии, в частности, за счет повышения в них экспрессии BDNF [6, 22, 23]. Учитывая, что инсульт сопровождается активацией окислительного стресса [24, 25], установленная нами коррекция процессов свободнорадикального окисления при применении АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro также может иметь определенное значение в цитопротекции.

Кроме того, механизмы цитопротективных эффектов пептида могут быть связаны с модуляцией активности

генов NF-κB и активацией редокс-чувствительного NRF2-сигнального пути, которые были установлены при исследовании защитного действия АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro на клетки SH-SY5Y в условиях цитотоксичности, вызванной пероксидом водорода [26].

Кроме того, известно, что гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось, которая регулирует выработку и высвобождение кортизола, может увеличивать окислительный стресс за счет модуляции генерации активных форм кислорода и митохондриального кальциевого гомеостаза. При этом уровень кортизола имеет положительную корреляцию с концентрацией 8-OHdG в плазме крови [27]. Учитывая имеющуюся у АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro нейротропную активность [9], можно предположить, что его противострессорные эффекты также могут быть связаны с модуляцией стресс-реакции уже на уровне центральной нервной системы, что подтверждается установленным в настоящем исследовании одновременным снижением уровней кортизола и 8-OHdG.

Различие в эффектах АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro в зависимости от введенной дозы, в частности, отсутствие активности в максимальной использованной дозе (500 мкг/кг), характерно для регуляторных пептидов [5, 9]. Так, для меланокортинов показано, что передача сигнала с MCR осуществляется за счет взаимодействия

с аденилатциклазой и активации цАМФ-сигнального пути [28]. Однако пути передачи сигнала могут зависеть от концентрации лиганда и передаваться с включением других систем вторичных мессенджеров, что может отражаться на направленности и выраженности эффектов. Например, сигнал с MC3R может передаваться по фосфоинозитольному пути [29], а с сигналом с MC5R — с участием Jak/STAT [30].

Выводы

Проведенное исследование показало, что хронический (14-дневный) иммобилизационный стресс приводит к активации процессов свободнорадикального окисления у животных. Введение АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro в дозах 5 и 50 мкг/кг снижало выраженность стресс-реакции и оказывало ингибирующее влияние на стресс-индуцированные процессы свободнорадикального окисления. Результаты настоящей работы и данные других исследований эффектов N-концевых аналогов АКТГ свидетельствуют о необходимости продолжения изучения механизмов их влияния на состояние стресс-индуцированного свободнорадикального окисления с использованием комплексной оценки более широкого спектра маркеров про- и антиоксидантных систем.

Литература

- Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative stress. *Annu Rev Biochem.* 2017; 86: 715–48. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037. PubMed PMID: 28441057.
- Sies H. Oxidative stress: concept and some practical aspects. *Antioxidants (Basel).* 2020; 9 (9): 852. DOI: 10.3390/antiox9090852. PubMed PMID: 32927924.
- Хавинсон В. Х. Лекарственные пептидные препараты: прошлое, настоящее, будущее. *Клиническая медицина.* 2020; 98 (3): 165–77. DOI: <https://doi.org/10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177>.
- Perlikowska R. Whether short peptides are good candidates for future neuroprotective therapeutics? *Peptides.* 2021; 140: 170528. DOI: 10.1016/j.peptides.2021.170528. PMID: 33716091.
- Koroleva SV, Myasoedov NF. Semax as a universal drug for therapy and research. *Biol Bull.* 2018; (45): 589–600. DOI: 10.1134/S1062359018060055.
- Бобынцев И. И., Крюков А. А., Шепелева О. М., Иванов А. В. Влияние пептида АКТГ4-7-ПГП на перекисное окисление липидов в печени крыс и активность сывороточных трансаминаз в условиях иммобилизационного стресса. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2015; 78 (8): 18–21. DOI: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2015-78-8-18-21>.
- Дмитриева В. Г., Дергунова Л. В., Поварова О. В., Скворцова В. И., Лимборская С. А., Мясоедов Н. Ф. Действие семакса и его С-концевого трипептида PGP на экспрессию генов факторов роста и их рецепторов в условиях экспериментальной ишемии мозга крыс. *Доклады Академии Наук.* 2008; 422 (2): 258–61.
- Левицкая Н. Г., Каменский А. А. Меланокортиновая система. *Успехи физиологических наук.* 2009; 40 (1): 44–65.
- Dodonova SA, Bobyntsev II, Belykh AE, Vorvul AO. ACTH6-9-PGP improves memory consolidation processes in rats. *Research Results in Pharmacology.* 2021; 7 (1): 27–32. DOI: 10.3897/rpharmacology.7.62479.
- Zheng J, Dobner A, Babygirija R, Ludwig K, Takahashi T. Effects of repeated restraint stress on gastric motility in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009; 296 (5): R1358–65. DOI: 10.1152/ajpregu.90928.2008.
- Mukhina AY, Mishina ES, Bobyntsev II, Medvedeva OA, Svishcheva MV, Kalutskii PV, et al. Morphological changes in the large intestine of rats subjected to chronic restraint stress and treated with Selank. *Bull Exp Biol Med.* 2020; 169 (2): 281–5. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04868-9>. PubMed PMID: 32651826.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020. Available from: <https://www.R-project.org/>.
- Liu Z, Cai Y, He J. High serum levels of 8-OHdG are an independent predictor of post-stroke depression in Chinese stroke survivors. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2018; 14: 587–96. DOI: 10.2147/NDT.S155144. PubMed PMID: 29497302.
- Katerji M, Filippova M, Duerksen-Hughes P. Approaches and methods to measure oxidative stress in clinical samples: research applications in the cancer field. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 2019: 1279250. DOI: 10.1155/2019/1279250. PubMed PMID: 30992736.
- Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine.* 2018; 54 (4): 287–93. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.
- Ściskalska M, Ołdakowska M, Marek G, Milnerowicz H. Changes in the Activity and concentration of superoxide dismutase isoenzymes (Cu/Zn SOD, MnSOD) in the blood of healthy subjects and patients with acute pancreatitis. *Antioxidants (Basel).* 2020; 9 (10): 948. DOI: 10.3390/antiox9100948. PubMed PMID: 33019780.
- Yisireyili M, Ailimujiang A, Aili A, Li Y, Yisireyili S, Abudureyimu K. Chronic restraint stress induces gastric mucosal inflammation with enhanced oxidative stress in a murine model. *Psychol Res Behav Manag.* 2020; 13: 383–93. DOI: 10.2147/PRBM.S250945. PubMed PMID: 32440237.
- Ranjbar H, Radahmadi M, Reisi P, Alaei H. Effects of electrical lesion of basolateral amygdala nucleus on rat anxiety-like behaviour under acute, sub-chronic, and chronic stresses. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017; 44 (4): 470–9. DOI: 10.1111/1440-1681.12727. PubMed PMID: 28063155.
- Gokul M, Arun Kumar N, Durgadas Kini R, et al. Evaluation of biomarkers of stress in chronic stress-exposed comorbid

- depression model Wistar rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2019; 30 (5). DOI: 10.1515/jbcpp-2018-0215. PubMed PMID: 31469653.
20. Ghalwash M, Elmasry A, Omar NMA. Possible cardioprotective role of NaHS on ECG and oxidative stress markers in an unpredictable chronic mild stress model in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2021; 99 (3): 321–7. DOI: 10.1139/cjpp-2019-0646. PubMed PMID: 33175584.
 21. Городецкая И. В., Кореневская Н. А. Влияние тиреоидных гормонов на изменения перекисного окисления липидов, вызванные острым и хроническим стрессом. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук*. 2010; 1: 78–84.
 22. Stavchansky VV, Tvorogova TV, Botsina AY, Skvortsova VI, Limborska SA, Mysoedov NF, Dergunova LV. Effect of semax and its C-terminal peptide PGP on expression of neurotrophins and their receptors in rat brain during incomplete global ischemia. *Mol Biol*. 2011; 45 (6): 941–9. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0026893311050128>.
 23. Кулага Е. А., Гаврилова С. А., Буравков С. В., Кошелев В. Б. Динамика экспрессии мозгового нейротрофического фактора (BDNF) в коре головного мозга крыс и влияние препарата «Семакс» на его продукцию при моделировании ишемического инсульта. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2013; 12 (3): 39–46. DOI: <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2013-12-3-39-46>.
 24. Чугунов А. В., Камчатнов П. В., Михайлова Н. А. Коррекция свободнорадикального окисления — патогенетический подход к лечению острого ишемического инсульта. *Журнал неврологии и психиатрии*. 2009; 10 (2): 65–8.
 25. Левичкин В. Д., Ременьякина Е. И., Павлюченко И. И., Каде А. Х., Трофименко А. И., Занин С. А. Влияние ТЭС-терапии на показатели системы про/антиоксиданты у крыс с экспериментальным ишемическим инсультом. *Современные проблемы науки и образования*. 2014; (2): 332.
 26. Akimov MG, Fomina-Ageeva EV, Dudina PV, Andreeva LA, Myasoyedov NF, Bezuglov VV. ACTH(6-9)PGP peptide protects SH-SY5Y cells from H₂O₂, tert-butyl hydroperoxide, and cyanide cytotoxicity via stimulation of proliferation and induction of prosurvival-related genes. *Molecules*. 2021; 26 (7): 1878. DOI: 10.3390/molecules26071878. PubMed PMID: 33810344.
 27. Black CN, Bot M, Révész D, Scheffer PG, Penninx B. The association between three major physiological stress systems and oxidative DNA and lipid damage. *Psychoneuroendocrinology*. 2017; 80: 56–66. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2017.03.003.
 28. Clark AJ, Forfar R, Hussain M, Jerman J, McIver E, Taylor D, Chan L. ACTH antagonists. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016; (7): 101. DOI: 10.3389/fendo.2016.00101. PubMed PMID: 27547198.
 29. Konda Y, Gantz I, DeValle J, Shimoto Y, Miwa H, Yamada T. Interaction of dual intracellular signaling pathways activated by the melanocortin-3 receptor. *J Biol Chem*. 1994; 269 (18): 13162–6. PubMed PMID: 8175743.
 30. Buggy JJ. Binding of alpha-melanocyte-stimulating hormone to its G-protein-coupled receptor on B-lymphocytes activates the Jak/STAT pathway. *Biochem J*. 1998; 331 (Pt 1): 211–6. DOI: 10.1042/bj3310211. PubMed PMID: 9512481.

References

1. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative stress. *Annu Rev Biochem*. 2017; 86: 715–48. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037. PubMed PMID: 28441057.
2. Sies H. Oxidative stress: concept and some practical aspects. *Antioxidants (Basel)*. 2020; 9 (9): 852. DOI: 10.3390/antiox9090852. PubMed PMID: 32927924.
3. Khavinson VKh. Peptide medicines: past, present, future. *Klinicheskaya meditsina*. 2020; 98(3): 165–77. DOI: <https://doi.org/10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177>. Russian.
4. Perlikowska R. Whether short peptides are good candidates for future neuroprotective therapeutics? *Peptides*. 2021; 140: 170528. DOI: 10.1016/j.peptides.2021.170528. PMID: 33716091.
5. Koroleva SV, Mysoedov NF. Semax as a universal drug for therapy and research. *Biol Bull*. 2018; (45): 589–600. DOI:10.1134/S1062359018060055.
6. Bobytsev II, Kryukov AA, Shepeleva OM, Ivanov AV. The effect of ACTH-4-7-PGP peptide on lipid peroxidation in liver and activity of serum transaminases in rats under acute and chronic immobilization stress conditions. *Ekspierimentalnaya i Klinicheskaya Farmakologiya*. 2015; 78 (8): 18–21. DOI: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2015-78-8-18-21>. Russian.
7. Dmitriyeva VG, Dergunova LV, Povarova OV, Skvortsova VI, Limborskaya SA, Myasoyedov NF. Deystviye semaksa i ego S-kontsevozogo tripeptida PGP na ekspressiyu genov faktorov rosta i ikh retseptorov v usloviyakh eksperimental'noy ishemii mozga krysa. *Doklady Akademii Nauk*. 2008; 422 (2): 258–61. Russian.
8. Levitskaya NG, Kamensky AA. Melanocortin system. *Progress in physiological science*. 2009; 40 (1): 44–65. Russian.
9. Dodonova SA, Bobytsev II, Belykh AE, Vorvul AO. ACTH6-9-PGP improves memory consolidation processes in rats. *Research Results in Pharmacology*. 2021; 7 (1): 27–32. DOI: 10.3897/rpharmacology.7.62479.
10. Zheng J, Dobner A, Babygirija R, Ludwig K, Takahashi T. Effects of repeated restraint stress on gastric motility in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009; 296 (5): R1358–65. DOI: 10.1152/ajpregu.90928.2008.
11. Mukhina AY, Mishina ES, Bobytsev II, Medvedeva OA, Svishcheva MV, Kalutskii PV, et al. Morphological changes in the large intestine of rats subjected to chronic restraint stress and treated with Selank. *Bull Exp Biol Med*. 2020; 169 (2): 281–5. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04868-9>. PubMed PMID: 32651826.
12. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020. Available from: <https://www.R-project.org/>.
13. Liu Z, Cai Y, He J. High serum levels of 8-OHdG are an independent predictor of post-stroke depression in Chinese stroke survivors. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2018; 14: 587–96. DOI: 10.2147/NDT.S155144. PubMed PMID: 29497302.
14. Katerji M, Filippova M, Duerksen-Hughes P. Approaches and methods to measure oxidative stress in clinical samples: research applications in the cancer field. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 2019: 1279250. DOI: 10.1155/2019/1279250. PubMed PMID: 30992736.
15. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 2018; 54 (4): 287–93. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.
16. Ściskalska M, Ołdakowska M, Marek G, Milnerowicz H. Changes in the Activity and concentration of superoxide dismutase isoenzymes (Cu/Zn SOD, MnSOD) in the blood of healthy subjects and patients with acute pancreatitis. *Antioxidants (Basel)*. 2020; 9 (10): 948. DOI: 10.3390/antiox9100948. PubMed PMID: 33019780.
17. Yisireyli M, Alimujiang A, Aili A, Li Y, Yisireyli S, Abudureyimu K. Chronic restraint stress induces gastric mucosal inflammation with enhanced oxidative stress in a murine model. *Psychol Res Behav Manag*. 2020; 13: 383–93. DOI: 10.2147/PRBM.S250945. PubMed PMID: 32440237.
18. Ranjbar H, Radahmadi M, Reisi P, Alaei H. Effects of electrical lesion of basolateral amygdala nucleus on rat anxiety-like behaviour under acute, sub-chronic, and chronic stresses. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017; 44 (4): 470–9. DOI: 10.1111/1440-1681.12727. PubMed PMID: 28063155.
19. Gokul M, Arun Kumar N, Durgadas Kini R, et al. Evaluation of biomarkers of stress in chronic stress-exposed comorbid depression model Wistar rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2019; 30 (5). DOI: 10.1515/jbcpp-2018-0215. PubMed PMID: 31469653.
20. Ghalwash M, Elmasry A, Omar NMA. Possible cardioprotective role

- of NaHS on ECG and oxidative stress markers in an unpredictable chronic mild stress model in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2021; 99 (3): 321–7. DOI: 10.1139/cjpp-2019-0646. PubMed PMID: 33175584.
21. Gorodetskaya IV, Korenevskaya NA Thyroid hormones influence on lipid peroxidation changes due to the acute and chronic stress. *Izvestiya Natsional'noy akademii nauk Belarusi. Seriya meditsinskikh nauk*. 2010; 1: 78–84. Russian.
 22. Stavchansky VV, Tvorogova TV, Botsina AY, Skvortsova VI, Limborska SA, Mysoedov NF, Dergunova LV. Effect of semax and its C-terminal peptide PGP on expression of neurotrophins and their receptors in rat brain during incomplete global ischemia. *Mol Biol*. 2011; 45 (6): 941–9. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0026893311050128>.
 23. Kulaga EA, Gavrilova SA, Buravkov SV, Koshelev VB. Dynamics of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the rats cerebral cortex and the effect of the drug “Semax” for BDNF production after ischemic stroke. *Regional blood circulation and microcirculation*. 2013; 12 (3): 39–46. DOI: <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2013-12-3-39-46>. Russian.
 24. Chugunov AV, Kamchatnov PV, Mikhailova NA. Correction of free-radical oxidation as a pathogenetic approach to the treatment of acute ischemic stroke. *Zhurnal nevrologii i psikhiatrii*. 2009; 10 (2): 65–8. Russian.
 25. Levichkin VD, Remenyakina EI, Pavlyuchenko II, Kade AKH, Trofimenko AI, Zanin SA. Influence of TES-therapy on indicators of system of pro/antioksidanty at rats with the experimental ischemic stroke. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2014; (2): 332. Russian.
 26. Akimov MG, Fomina-Ageeva EV, Dudina PV, Andreeva LA, Myasoyedov NF, Bezuglov VV. ACTH(6-9)PGP peptide protects SH-SY5Y cells from H₂O₂, tert-butyl hydroperoxide, and cyanide cytotoxicity via stimulation of proliferation and induction of prosurvival-related genes. *Molecules*. 2021; 26 (7): 1878. DOI: 10.3390/molecules26071878. PubMed PMID: 33810344.
 27. Black CN, Bot M, Révész D, Scheffer PG, Penninx B. The association between three major physiological stress systems and oxidative DNA and lipid damage. *Psychoneuroendocrinology*. 2017; 80: 56–66. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2017.03.003.
 28. Clark AJ, Forfar R, Hussain M, Jerman J, McIver E, Taylor D, Chan L. ACTH antagonists. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016; (7): 101. DOI: 10.3389/fendo.2016.00101. PubMed PMID: 27547198.
 29. Konda Y, Gantz I, DelValle J, Shimoto Y, Miwa H, Yamada T. Interaction of dual intracellular signaling pathways activated by the melanocortin-3 receptor. *J Biol Chem*. 1994; 269 (18): 13162–6. PubMed PMID: 8175743.
 30. Buggy JJ. Binding of alpha-melanocyte-stimulating hormone to its G-protein-coupled receptor on B-lymphocytes activates the Jak/STAT pathway. *Biochem J*. 1998; 331 (Pt 1) (Pt 1): 211–6. DOI: 10.1042/bj3310211. PubMed PMID: 9512481.