

УДК 616.345-008.87-092.9:616.89

DOI 10.17021/2019.14.1.54.60

© А.Ю. Мухина, О.А. Медведева, М.В. Свищева,  
А.В. Шевченко, Н.Н. Ефремова, И.И. Бобынцев, П.В. Калуцкий, 2019

## **ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ МИКРОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОЙ КИШКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА**

*Мухина Александра Юрьевна*, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 305041, г. Курск, ул. К. Маркса, д. 3, тел.: +7-919-135-29-08, e-mail: 111ms@mail.ru.

*Медведева Ольга Анатольевна*, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 305041, г. Курск, ул. К. Маркса, д. 3, тел.: +7-910-312-22-90, e-mail: olgafrida@rambler.ru.

*Свищева Мария Владимировна*, очный аспирант кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 305041, г. Курск, ул. К. Маркса, д. 3, тел.: +7-920-268-04-24, e-mail: mascha.svisheva@yandex.ru.

*Шевченко Алина Владимировна*, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 305041, г. Курск, ул. К. Маркса, д. 3, тел.: +7-920-269-13-72, e-mail: alina7227@mail.ru.

*Ефремова Наталия Николаевна*, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 305041, г. Курск, ул. К. Маркса, д. 3, тел.: +7-961-167-79-20, e-mail: ecolil@rambler.ru.

*Бобынцев Игорь Иванович*, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патофизиологии, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 305041, г. Курск, ул. К. Маркса, д. 3, тел.: +7-910-316-49-09, e-mail: bobig@mail.ru.

*Калуцкий Павел Вячеславович*, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 305041, г. Курск, ул. К. Маркса, д. 3, тел.: +7-910-730-86-30, e-mail: pvk62@mail.ru.

Стресс как актуальный медико-биологический фактор обуславливает необходимость изучения различных его последствий для макроорганизма. Исследовано влияние хронического иммобилизационного стресса на микробиоту толстой кишки экспериментальных животных. Для оценки качественного и количественного состава микробиоценоза данного биотопа использовали биоптаты слизистой оболочки толстой кишки крыс линии Вистар. Установлено, что воздействие стресса приводило к значительному снижению количества облигатных представителей микробиоты, при этом возрастало содержание факультативной микрофлоры. Оценка частоты встречаемости и относительного среднего идентифицированных родов микроорганизмов показала, что хроническая иммобилизация значительно изменяла значения исследованных показателей в отношении условно-патогенных представителей микробиоценоза, а также влияла на их соотношение с облигатными бактериями. Полученные данные наглядно демонстрируют роль стресса в формировании дисбиоза.

**Ключевые слова:** хроническая иммобилизация, стресс, микробиота, микрофлора, дисбиоз, ось «микробиота – кишечник – мозг».

## **STATE OF EXPERIMENTAL ANIMALS' COLON MICROBIOCENOSIS UNDER RESTRAINT STRESS**

*Mukhina Aleksandra Yu.*, Assistant, Kursk State Medical University, 3 K. Marksa St., Kursk, 305041, Russia, tel.: +7-919-135-29-08; e-mail: 111ms@mail.ru.

*Medvedeva Ol'ga A.*, Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, Professor of Department, Kursk State Medical University, 3 K. Marksa St., Kursk, 305041, Russia, tel.: +7-910-312-22-90, e-mail: olgafrida@rambler.ru.

**Svishcheva Mariya V.**, Post-graduate student, Kursk State Medical University, 3 K. Marksa St., Kursk, 305041, Russia, tel.: +7-920-268-04-24, e-mail: mascha.svisheva@yandex.ru.

**Shevchenko Alina V.**, Cand. Sci. (Med.), Assistant, Kursk State Medical University, 3 K. Marksa St., Kursk, 305041, Russia, tel.: +7-920-269-13-72, e-mail: alina7227@mail.ru.

**Efremova Nataliya N.**, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor of Department, Kursk State Medical University, 3 K. Marksa St., Kursk, 305041, Russia, tel.: +7-961-167-79-20, e-mail: ecolil@rambler.ru.

**Bobyntsev Igor' I.**, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Department, Kursk State Medical University, 3 K. Marksa St., Kursk, 305041, Russia, tel.: +7-910-316-49-09, e-mail: bobig@mail.ru.

**Kalutskiy Pavel V.**, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Department, Kursk State Medical University, 3 K. Marksa St., Kursk, 305041, Russia, tel.: +7-910-730-86-30, e-mail: pvk62@mail.ru.

Stress as an actual medical and biological factor necessitates the study of its various consequences for the macroorganism. The article deals with chronic restraint stress effects on the experimental animals' colon microbiota. To assess the qualitative and quantitative composition of the microbiocenosis of this biotope, biopsy specimens of the mucous membrane of the large intestine of Wistar rats were used. It was established that stress led to a significant decrease in the number of obligate representatives of the microbiota, while the content of the facultative microflora increased. Evaluation of the frequency of occurrence and the relative average of the identified genera of microorganisms showed that chronic immobilization significantly changed the values of the studied parameters in relation to opportunistic pathogenic representatives of the microbiocenosis, and also affected their correlation with obligate bacteria. The obtained data clearly demonstrate the role of stress in the dysbiosis creation.

**Key words:** *restraint stress, immobilization, microbiota, microflora, dysbiosis, microbiota-gut-brain axis.*

**Введение.** Необходимость изучения разносторонних аспектов стресс-реакции макроорганизма обусловлена непрерывными социальными, технологическими, экологическими, экономическими изменениями как в профессиональной, так и в бытовой деятельности человека [13, 19].

В ответ на чрезмерные раздражители любой природы, являющиеся стрессорами, информация с рецепторного аппарата поступает в центральную нервную систему (ЦНС), где происходит формирование сложного координированного ответа, который характеризуется повышением общей резистентности организма, активацией защитных механизмов с последующим их ослаблением и возможным развитием патологических процессов, в том числе в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) [4, 15].

Установлены двусторонние нейроиммунные и нейрохимические коммуникации между микробиотой кишечника и ЦНС, в связи с чем в настоящее время функционирование нервной системы, эмоциональный статус и стресс-реакция рассматриваются во взаимосвязи с микробиоценозом [5, 8, 12, 18]. Предположительно в основе связи между мозгом и микробиотой при стрессе лежит нарушение барьерной функции эпителия кишечника [7, 9, 11, 17]. Согласно некоторым данным, гормоны стресса изменяют непосредственно секреторную функцию и моторику ЖКТ [3, 10]. Сумма этих факторов может приводить к абберациям качественного и количественного состава кишечной микробиоты.

В связи с вышеизложенным **целью** данного исследования явилась оценка состояния микробиоценоза толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса.

**Материалы и методы исследования.** Эксперимент выполнен на крысах самцах линии Вистар массой 250–280 г, полученных из Питомника лабораторных животных Филиала Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (г. Пущино). Животные содержались в помещении при температуре воздуха 22–24° С, световом режиме 12 часов – свет, 12 часов – темнота и получали стандартный гранулированный корм и воду в свободном доступе в соответствии с рекомендациями ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments, 2010) и требованиями Министерства здравоохранения РФ № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» от 2016 г. На момент выполнения эксперимента все животные были здоровы. Их разделили на 2 группы по 13 особей в каждой: 1 группа – интактные крысы (контроль), 2 группа – особи, которым моделировали хронический иммобилизационный стресс (ХИС).

ХИС моделировали помещением крыс в индивидуальные тесные пластиковые боксы с отверстиями для вентиляции ежедневно на 2 часа в течение 14 дней. По истечении указанного срока животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом обескровливанием путем забора крови из правого желудочка сердца.

Количественное и качественное исследование мукозной микрофлоры толстого кишечника крыс проводили по известной методике Л.И. Кафарской и В.М. Коршунова [1]. Биоптаты слизистой оболочки толстого кишечника освобождали от химуса и взвешивали в асептических условиях. Материал

помещали в стерильный буферный раствор в соотношении 1 : 10 и термостатировали в течение 2 часов для разжижения муцина. После чего из подготовленных образцов кишки готовили разведения до концентраций  $10^{-2}$  –  $10^{-4}$  и засеивали газоном по 0,1 мл каждого разведения на поверхность питательных сред (бифидоагар, лактоагар MRS, Эндо, SSA-агар, висмут-сульфит-агар, ЦПХ-агар, желточно-солевой агар, Сабуро) и инкубировали при температуре 37° С в аэробных и анаэробных условиях.

Идентификацию микроорганизмов проводили с помощью масс-спектрометра MalDI Biotyper Microflex («Bruker», США). Количество микроорганизмов в 1 г материала рассчитывали исходя из числа колониеобразующих единиц (КОЕ) при посеве из максимального разведения, где отмечался рост не менее 10 колоний, учитывая объем посевного материала. Для расчета использовали формулу:

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

где К – колониеобразующая единица, E – общее количество бактерий, k – количество внесенного материала, v – количество чашек Петри, n – разведение. Удельное содержание микроорганизмов выражали в lg КОЕ/г массы исследуемого материала.

Расширенная оценка состояния микробиоценоза толстой кишки включала в себя расчет частоты встречаемости рода (доля животных, у которых обнаружен данный род микроорганизмов) и относительного среднего для каждого идентифицированного рода микроорганизмов (доля микроорганизма в исследуемой популяции) [2].

Статистическую значимость различий средних величин оценивали по t-критерию Стьюдента после проверки нормальности распределения изучаемых показателей с применением программы Microsoft Excel («Microsoft», США).

**Результаты исследования и их обсуждение.** При исследовании содержания облигатных представителей мукозной микробиоты толстой кишки крыс было установлено, что под воздействием ХИС количество как лактобацилл, так и бифидобактерий уменьшилось в 1,4 раза, а число кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью сократилось в 1,3 раза (табл. 1). При этом содержание эшерихий со сниженной ферментативной активностью увеличилось в 3,4 раза по сравнению с контролем.

Таблица 1

**Количественный состав мукозной микрофлоры кишечника крыс в условиях ХИС (lg КОЕ/г, M ± m)**

| Выделенные микроорганизмы                              | Группы животных            |                                |
|--|----------------------------|--------------------------------|
|  | Контроль (интактные крысы) | Опыт (крысы, подвергшиеся ХИС) |
| <i>Lactobacillus spp.</i>                              | 14,48 ± 0,31               | 10,17 ± 0,34**                 |
| <i>Bifidobacterium spp.</i>                            | 14,31 ± 0,395              | 9,97 ± 0,60**                  |
| <i>E. coli</i> с нормальной ферментативной активностью | 5,93 ± 0,31                | 4,49 ± 0,12**                  |
| <i>E. coli</i> со сниженной ферментативной активностью | 1,04 ± 0,55                | 3,55 ± 0,70**                  |
| <i>Enterobacter spp.</i>                               | 0                          | 2,13 ± 0,68**                  |
| <i>Citrobacter spp.</i>                                | 0                          | 1,16 ± 0,51*                   |
| <i>Proteus spp.</i>                                    | 0                          | 3,05 ± 0,61**                  |
| <i>Klebsiella spp.</i>                                 | 0,66 ± 0,45                | 4,13 ± 0,53**                  |
| <i>Morganella spp.</i>                                 | 0,94 ± 0,5                 | 2,08 ± 0,56                    |
| <i>Acinetobacter spp.</i>                              | 0                          | 1,56 ± 0,54**                  |
| <i>Enterococcus spp.</i>                               | 0,86 ± 0,45                | 0,64 ± 0,43                    |
| <i>Staphylococcus</i> (коагулазоотрицательные)         | 2,01 ± 0,63                | 5,38 ± 0,36**                  |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                           | 0                          | 1,43 ± 0,52*                   |
| <i>Candida spp.</i>                                    | 1,11 ± 0,41                | 2,56 ± 0,55*                   |

Примечание: \* –  $p \leq 0,05$  по сравнению с контрольной группой, \*\* –  $p \leq 0,01$  по сравнению с контрольной группой

Установлены достоверные изменения определяемого показателя для факультативных представителей микробиоценоза. Так, в опытной группе количество клебсиелл увеличилось в 6,3 раза, коагулазоотрицательных стафилококков – в 2,7 раза, грибов рода *Candida* – в 2,3 раза по сравнению

с интактными животными.

В контроле не было зарегистрировано присутствие условно-патогенных микроорганизмов родов *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Acinetobacter*, тогда как у животных, подвергшихся ХИС, были выявлены энтеробактеры (lg КОЕ  $2,13 \pm 0,68$ ), протеи (lg КОЕ  $3,05 \pm 0,61$ ), в несколько меньшем количестве встречались цитробактеры и ацинетобактеры (lg КОЕ  $1,16 \pm 0,51$  и lg КОЕ  $1,56 \pm 0,54$  соответственно). Под воздействием стресса в составе микробиоценоза появились отсутствовавшие в контроле *Staphylococcus aureus*, lg КОЕ которых составил  $1,43 \pm 0,52$ .

Изменения значений определяемого показателя в отношении энтерококков и морганелл были недостоверны по отношению к контролю.

Оценка частоты встречаемости облигатных микроорганизмов у иммобилизованных и интактных животных показала отсутствие различий и полное соответствие показателям контрольной группы (интактные крысы) для лактобацилл, бифидобактерий и кишечной палочки с нормальной ферментативной активностью (табл. 2). При этом *E. coli* со сниженной ферментативной активностью в условиях ХИС встречалась на 46 % чаще.

Таблица 2

**Частота встречаемости представителей мукозной микробиоты толстой кишки крыс в условиях ХИС (% ,  $p \pm m_p$ )**

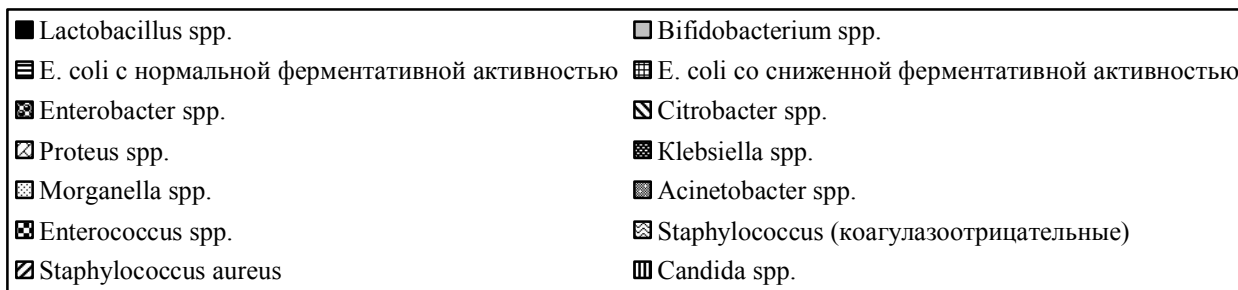
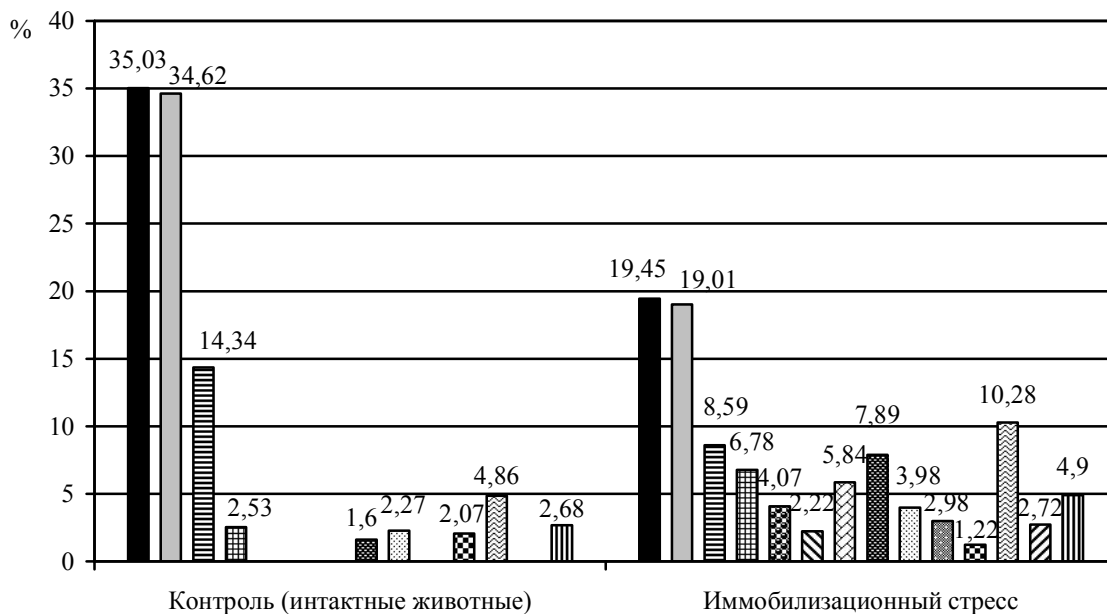
| Выделенные микроорганизмы                              | Группы животных            |                                |
|--|----------------------------|--------------------------------|
|  | Контроль (интактные крысы) | Опыт (крысы, подвергшиеся ХИС) |
| <i>Lactobacillus spp.</i>                              | 100 ± 0                    | 100 ± 0                        |
| <i>Bifidobacterium spp.</i>                            | 100 ± 0                    | 100 ± 0                        |
| <i>E. coli</i> с нормальной ферментативной активностью | 100 ± 0                    | 100 ± 0                        |
| <i>E. coli</i> со сниженной ферментативной активностью | 23,00 ± 11,67              | 69,00 ± 12,83*                 |
| <i>Enterobacter spp.</i>                               | 0                          | 46,00 ± 13,82**                |
| <i>Citrobacter spp.</i>                                | 0                          | 31,00 ± 12,83**                |
| <i>Proteus spp.</i>                                    | 0                          | 69,00 ± 12,83**                |
| <i>Klebsiella spp.</i>                                 | 15,00 ± 9,90               | 85,00 ± 9,90**                 |
| <i>Morganella spp.</i>                                 | 23,00 ± 11,67              | 54,00 ± 13,82                  |
| <i>Acinetobacter spp.</i>                              | 0                          | 54,00 ± 13,82**                |
| <i>Enterococcus spp.</i>                               | 23,00 ± 11,67              | 15,00 ± 9,90                   |
| <i>Staphylococcus</i> (коагулазоотрицательные)         | 46,00 ± 13,82              | 100 ± 0**                      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                           | 0                          | 38,00 ± 13,46*                 |
| <i>Candida spp.</i>                                    | 38,00 ± 13,46              | 69,00 ± 12,83*                 |

Примечание: \* –  $p \leq 0,05$  по сравнению с контрольной группой, \*\* –  $p \leq 0,01$  по сравнению с контрольной группой

Анализ частоты встречаемости представителей факультативной микробиоты толстой кишки крыс выявил существенные различия по сравнению с контрольной группой. В частности, воздействие хронической иммобилизации привело к повышению значений определяемого показателя в отношении клебсиелл на 70 % и грибов рода *Candida* на 31 %. Кроме того, частота встречаемости коагулазоотрицательных стафилококков возросла до значений, соответствующих таковой для облигатных микроорганизмов ( $100 \pm 0$  %).

Стрессорное воздействие способствовало не только увеличению численности представителей факультативной микрофлоры, но и привело к появлению микроорганизмов, не зарегистрированных в контрольной группе. Так, обнаружены достоверные различия между значениями определяемого показателя для *Staphylococcus aureus*, а также условно-патогенных грамотрицательных палочек родов *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Acinetobacter*.

Для оценки влияния ХИС на состояние толстокишечного микробиоценоза, помимо частоты встречаемости, проводилась оценка относительного среднего для каждого рода микроорганизмов, что позволило представить характер распределения микроорганизмов в исследуемых популяциях (рис.).



**Рис. Относительное среднее (доля) для каждого рода представителей мукозной микрофлоры толстой кишки крыс в условиях иммобилизационного стресса, %**

Оценка относительной доли микроорганизмов показала, что в группе интактных животных преобладали типичные облигатные представители микробиоты, среди которых *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *E. coli* с нормальной ферментативной активностью. Они составили ведущую долю исследуемой популяции.

В опытной группе лактобациллы и бифидобактерии остались доминирующими микроорганизмами, однако их доля значительно снизилась. При этом эшерихии с нормальной ферментативной активностью уступили ведущее положение коагулазоотрицательным стафилококкам. Снижение количества облигатных представителей микробиоты под влиянием ХИС создавало оптимальные условия для колонизации слизистой условно-патогенными микроорганизмами. В связи с этим наблюдалось увеличение относительного среднего отдельных родов микроорганизмов (*Klebsiella spp.*, *Morganella spp.*, *Staphylococcus* (коагулазоотрицательные), *Candida spp.*), а также появление в исследуемой популяции условно-патогенных микроорганизмов, идентифицированных как *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Acinetobacter* и *Staphylococcus aureus*.

Зарегистрированные в результате проведенного эксперимента изменения динамического равновесия микробиоты толстой кишки соответствуют современной концепции коммуникации между ЦНС и микробиоценозом, которая нашла отражение в понятии ось «микробиота – кишечник – мозг» [12, 16, 17].

Выявленные изменения можно объяснить тем, что в условиях стресса активация оси «микробиота – кишечник – мозг» происходит посредством кортикотропин-рилизинг фактора, который через связанные с G-белком рецепторы изменяет проницаемость кишечника, а также способствует выработке кортизола [20]. Последний, в свою очередь, снижает экспрессию зонулина на фоне гиперпродукции фактора некроза опухоли  $\alpha$ , что ведет к транслокации бактерий и активации иммунного ответа [6, 14, 19].

**Заключение.** Под влиянием хронического иммобилизационного стресса у испытуемых крыс произошло снижение количества облигатных представителей кишечной микробиоты. При этом отмечалось увеличенное по сравнению с группой контроля содержание кишечной палочки со сниженной ферментативной активностью, а также таких факультативных микроорганизмов, как клебсиеллы, морганеллы, коагулазоотрицательные стафилококки, грибы рода *Candida*. Кроме того, некоторые условно-патогенные бактерии, представленные энтеробактерами, цитробактерами, ацинетобактерами, протеом, золотистым стафилококком, колонизировали биотоп слизистой толстой кишки только после воздействия стрессора.

Вместе с тем хронический иммобилизационный стресс не привел к смене доминантных представителей микробиоценоза и не изменил частоту их встречаемости, однако наблюдалось выраженное изменение исследованных показателей в отношении факультативных микроорганизмов, а также их соотношения с облигатными представителями микробиоты.

Таким образом, реакция нервной системы на стресс модулирует качественный и количественный состав мукозной микробиоты, способствуя формированию дисбиоза.

### Список литературы

1. Богданова, Е. А. Исследование пристеночной микрофлоры желудочно-кишечного тракта крыс при пероральном введении пробиотических препаратов / Е. А. Богданова, Ю. В. Несвижский, А. А. Воробьев, С. С. Афанасьев, М. Л. Корнеев // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2006. – № 2. – С. 6–10.
2. Мэгарран, Э. Экологическое разнообразие и его измерение / Э. Мэгарран. – М. : Мир, 1992. – 184 с.
3. Bravo, J. A. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve / J. A. Bravo, P. Forsythe, M. V. Chew, E. Escaravage, H. M. Savignac, T. G. Dinan, J. Bienenstock, J. F. Cryan // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2011. – Vol. 108, № 38. – P. 16050–16055.
4. Clarke, G. Gut microbiota : the neglected endocrine organ / G. Clarke, R. M. Stilling, P. J. Kennedy, C. Stanton, J. F. Cryan, T. G. Dinan // Mol. Endocrinol. – 2014. – Vol. 28. – P. 1221–1238.
5. Collins, S. M. Gut microbiota : intestinal bacteria influence brain activity in healthy humans / S. M. Collins, P. Bercik // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. – 2013. – Vol. 10. – P. 326–327.
6. Eckburg, P. B. Diversity of the human intestinal microbial flora / P. B. Eckburg, E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson, D. A. Relman // Science. – 2005. – Vol. 308. – P. 1635–1638.
7. Galley, J. D. Exposure to a social stressor disrupts the community structure of the colonic mucosa-associated microbiota / J. D. Galley, M. C. Nelson, Z. Yu, S. E. Dowd, J. Walter, P. S. Kumar, M. Lyte, M. T. Bailey // BMC Microbiol. – 2014. – № 14. – P. 189.
8. Greenlaw P., Ruggiero, M., Greenlaw D. Your Third Brain : The Revolutionary New Discovery to Achieve Optimum Health (The New Health Conversation Series). Greenlaw Group. – 2015. – 274 p.
9. Kim, M. H. Chronic exercise improves repeated restraint stress-induced anxiety and depression through 5HT1A receptor and cAMP signaling in hippocampus / M. H. Kim, Y. H. Leem // J. Exerc. Nutrition Biochem. – 2014. – Vol. 18, № 1. – P. 97–104.
10. Macfarlane, G. T. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health / G. T. Macfarlane, S. Macfarlane // J AOAC Int. – 2012. – Vol. 95, № 1. – P. 50–60.
11. Margolis, K. G. Cellular Organization of Neuroimmune Interactions in the Gastrointestinal Tract / K. G. Margolis, M. D. Gershon, M. Bogunovic // Trends Immunol. – 2016. – Vol. 37, № 7. – P. 487–501.
12. Mayer, E. A. Gut/brain axis and the microbiota / E. A. Mayer, K. Tillisch, A. Gupta // J. Clin. Invest. – 2015. – № 125. – P. 926–938.
13. Moloney, R. D. The microbiome : stress, health and disease / R. D. Moloney, L. Desbonnet, G. Clark, T. G. Dinan, J. F. Cryan // Mammalian Genome. – 2014. – Vol. 25. – P. 49–74.
14. Moussaoui, N. Chronic early-life stress in rat pups alters basal corticosterone, intestinal permeability, and fecal microbiota at weaning : influence of sex / N. Moussaoui, J. P. Jacobs, M. Larauche, M. Biraud, M. Million, E. Mayer, Y. Tache // J. Neurogastroenterol. Motil. – 2017. – Vol. 23, № 1. – P. 135–143.
15. O'Mahony, S. M. Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats : implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses / S. M. O'Mahony, J. R. Marchesi, P. Scully, C. A. Codling, A. M. Ceolho, E. M. Quigley, J. F. Cryan., T. G. Dinan // Biol. Psychiatry. – 2009. – Vol. 65, № 3. – P. 263–267.
16. Rohrscheib, C. E. Microorganisms that manipulate complex animal behaviours by affecting the host's nervous system / C. E. Rohrscheib, J. C. Brownlie // Springer Sci. Rev. – 2013. – Vol. 1. – P. 133–140.
17. Sampson, T. R. Control of brain development, function, and behavior by the microbiome / T. R. Sampson, S. K. Mazmanian // Cell Host Microbe. – 2015. – Vol. 17. – P. 565–576.
18. Stilling, R. M. Microbes do have a significant impact on epigenetic regulation in the host's gut epithelium and immune system, microbial genes, brain and behaviour-epigenetic regulation of the gut-brain axis / R. M. Stilling, T. G. Dinan, J. F. Cryan // Genes Brain Behav. – 2014. – Vol. 13. – P. 69–86.

19. Sudo, N. Effects of Gut Microbiota on Stress Response and Behavioral Phenotype of the Host / N. Sudo // *Brain Nerve*. – 2016. – Vol. 68, № 6. – P. 595–605.
20. Taché, Y. Brain and gut CRF signaling : biological actions and role in the gastrointestinal tract // *Curr. Mol. Pharmacol.* – 2018. – Vol. 11, № 1. – P. 51–71.

### References

1. Bogdanova E. A., Nesvizhskiy Yu. V., Vorob'ev A. A., Afanas'ev S. S., Korneev M. L. Issledovanie pristenochnoy mikroflory zheludochno-kishechnogo trakta krysa pri peroral'nom vvedenii probioticheskikh preparatov [A study of parietal gastrointestinal microflora of rats after oral administration of probiotics]. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk [Annals of the Russian academy of medical sciences]*, 2006, no. 2, pp. 6–10.
2. Megarran E. Ekologicheskoe raznoobrazie i ego izmerenie [Ecological diversity and its measurement]. Moscow, Mir [World], 1992, 184 p.
3. Bravo J. A., Forsythe P., Chew M. V., Escaravage E., Savignac H. M., Dinan T. G., Bienenstock J., Cryan J. F. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2011, vol. 108, no. 38, pp. 16050–16055.
4. Clarke G., Stilling R. M., Kennedy P. J., Stanton C., Cryan J. F., Dinan T. G. Gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Mol. Endocrinol.*, 2014, vol. 28, pp. 1221–1238.
5. Collins S. M., Bercik P. Gut microbiota: intestinal bacteria influence brain activity in healthy humans // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2013, vol. 10, pp. 326–327.
6. Eckburg P. B., Bik E. M., Bernstein C. N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S. R., Nelson K. E., Relman D. A. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 2005, vol. 308, pp. 1635–1638.
7. Galley J. D., Nelson M. C., Yu Z., Dowd S. E., Walter J., Kumar P. S., Lyte M., Bailey M. T. Exposure to a social stressor disrupts the community structure of the colonic mucosa-associated microbiota // *BMC Microbiol.*, 2014, no. 14, p. 189.
8. Greenlaw P., Ruggiero M., Greenlaw D. *Your Third Brain: The Revolutionary New Discovery to Achieve Optimum Health (The New Health Conversation Series)*. Greenlaw Group, 2015, p. 274.
9. Kim M. H., Leem Y. H. Chronic exercise improves repeated restraint stress-induced anxiety and depression through 5HT1A receptor and cAMP signaling in hippocampus // *J. Exerc. Nutrition Biochem.*, 2014, vol. 18, no. 1, pp. 97–104.
10. Macfarlane G. T., Macfarlane S., Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health // *J. AOAC Int.*, 2012, vol. 95, no. 1, pp. 50–60.
11. Margolis K. G., Gershon M. D., Bogunovic M. Cellular Organization of Neuroimmune Interactions in the Gastrointestinal Tract. *Trends Immunol.*, 2016, vol. 37, no. 7, pp. 487–501.
12. Mayer E. A., Tillisch K., Gupta A. Gut/brain axis and the microbiota. *J. Clin. Invest.*, 2015, no. 125, pp. 926–938.
13. Moloney R. D., Desbonnet L., Clark G., Dinan T. G., Cryan J. F. The microbiome: stress, health and disease. *Mammalian Genome*, 2014, vol. 25, pp. 49–74.
14. Moussaoui N., Jacobs J. P., Larauche M., Biraud M., Million M., Mayer E., Tache Y. Chronic early-life stress in rat pups alters basal corticosterone, intestinal permeability, and fecal microbiota at weaning: influence of sex. *J. Neurogastroenterol. Motil.*, 2017, vol. 23, no. 1, pp. 135–143.
15. O'Mahony S. M., Marchesi J. R., Scully P., Codling C., Ceolho A. M., Quigley E. M., Cryan J. F., Dinan T. G. Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. *Biol. Psychiatry*, 2009, vol. 65, no. 3, pp. 263–267.
16. Rohrscheib C. E., Brownlie J. C. Microorganisms that manipulate complex animal behaviours by affecting the host's nervous system. *Springer Sci. Rev.*, 2013, vol. 1, pp. 133–140.
17. Sampson T. R., Mazmanian S. K. Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. *Cell Host Microbe*, 2015, vol. 17, pp. 565–576.
18. Stilling R. M., Dinan T. G., Cryan J. F. Microbes do have a significant impact on epigenetic regulation in the host's gut epithelium and immune system, microbial genes, brain and behaviour-epigenetic regulation of the gut-brain axis. *Genes Brain Behav.*, 2014, vol. 13, pp. 69–86.
19. Sudo N. Effects of Gut Microbiota on Stress Response and Behavioral Phenotype of the Host. *Brain Nerve*, 2016, vol. 68, no. 6, pp. 595–605.
20. Taché Y., Larauche M., Yuan P. Q., Million M. Brain and gut CRF signaling: biological actions and role in the gastrointestinal tract. *Curr. Mol. Pharmacol.*, 2018, vol. 11, no. 1, pp. 51–71.