

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО КГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ)

На правах рукописи

Свищева Мария Владимировна

**Соотношение состояния микробиоты толстой кишки и поведенческих
реакций у крыс на фоне применения гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-
Gly-Pro в условиях иммобилизационного стресса**

03.02.03 – микробиология

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук, профессор
Бобынцев И.И.
доктор биологических наук, доцент
Медведева О.А.

Курск – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Микробиота толстой кишки и ее значение для организма человека	12
1.2 Коммуникативные взаимоотношения между микробиотой и центральной нервной системой организма	18
1.3 Стресс и его роль в формировании дисбиоза. Понятие о психобиотиках	22
1.4 Физиологические и фармакологические эффекты АКТГ ₄₋₇ –PGR	27
Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
2.1 Экспериментальные животные	38
2.2 Препарат	39
2.3 Модель хронического иммобилизационного стресса	39
2.4 Исследования поведенческой активности крыс	40
2.4.1 Методика изучения поведенческих реакций в тесте «открытое поле»	40
2.4.2 Методика оценки уровня тревожности в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт»	41
2.5 Выведение животных из эксперимента и забор биологического материала	41
2.6 Исследование состояния мукозной микробиоты	42
2.7 Морфологическое исследование толстой кишки	43
2.8 Определение уровня кортикостерона в сыворотке крови крыс	44
2.9 Статистическая обработка данных	45
Глава 3 СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА И СТЕНКИ ТОЛСТОЙ КИШКИ У КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА И ПРИ ПРИМЕНЕНИИ	46

	АКТГ ₄₋₇ -PGR	
3.1	Состояние микробиоты толстой кишки крыс при хроническом иммобилизационном стрессе в условиях применения АКТГ ₄₋₇ - PGR	46
3.2	Изменения морфофункционального состояния толстой кишки в условиях хронического иммобилизационного стресса и при применении АКТГ ₄₋₇ -PGR	55
Глава 4	ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И СОДЕРЖАНИЕ КОРТИКОСТЕРОНА В КРОВИ У КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА И ПРИ ПРИМЕНЕНИИ АКТГ ₄₋₇ -PGR	64
4.1	Влияние хронического иммобилизационного стресса и применения АКТГ ₄₋₇ -PGR на поведенческие реакции крыс в тесте «открытое поле»	64
4.2	Изменения поведенческих показателей крыс в приподнятом крестообразном лабиринте при применении АКТГ ₄₋₇ -PGR в условиях хронического иммобилизационного стресса.....	69
4.3	Содержание кортикостерона в сыворотке крови крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса и применения АКТГ ₄₋₇ -PGR.....	72
Глава 5	КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ СОСТОЯНИЕМ МИКРОБИОТЫ, НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И СТЕНКИ ТОЛСТОЙ КИШКИ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА И ПРИМЕНЕНИЯ АКТГ ₄₋₇ -PGR.....	76
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	91
	ВЫВОДЫ	105
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	107

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	109
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	142

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

В настоящее время в результате целого ряда исследований сформировались представления о кишечно-мозговой оси как о двунаправленной системе связи между центральной нервной системой и желудочно-кишечным трактом [103, 106, 153, 163]. Интенсивно накапливающиеся научные данные указывают на важную роль толстокишечной микробиоты в регулировании нормального функционирования данной оси [99, 250]. Установлено, что микробная регуляция бинаправленного сообщения между пищеварительной и нервной системами может реализовываться посредством секреции молекул «микробной сигнализации» [155, 158, 190, 255].

Воздействие стрессоров вызывает активацию кишечно-мозговой оси нейрогуморальным путем, что способствует изменению барьерной функции кишки с увеличением параклеточной проницаемости и, как следствие, к абберациям состава толстокишечного микробиоценоза [157, 177, 191]. При этом даже непродолжительное воздействие стресса может оказывать влияние на профиль микробиоты, изменяя как количественный, так и качественный ее состав [93, 141, 149, 204, 221, 243]. В свою очередь, изменение состояния кишечной микробиоты влияет на восприимчивость к стрессу, уровень тревожности, когнитивные способности [150]. В то же время в литературе имеют место достаточно противоречивые данные о двунаправленном коммуникативном взаимодействии между составом микробиоты толстой кишки и состоянием функций нервной системы.

В связи с вышеизложенным представляется актуальным исследование и разработка патогенетических принципов коррекции нарушений состава микробиоты толстой кишки с применением препаратов, обладающих стресслимитирующим эффектом. Для увеличения устойчивости к действию различных стрессоров и коррекции стрессиндуцированных сдвигов в

настоящее время используются препараты, не обладающие выраженными побочными эффектами и имеющие высокую биодоступность, в том числе созданные на основе регуляторных пептидов. К их числу относится производное фрагмента адренокортикотропного гормона гептапептид метионин-глутамин-гистидин-фенилаланин-пролин-глицин-пролин (АКТГ₄₋₇-PGP) семакс с широким спектром фармакологической и физиологической активности. Для пептида АКТГ₄₋₇-PGP установлено церебропротективное, антигипоксическое и ноотропное действие, а также ряд местных эффектов за счет взаимодействия с мелакортиновыми рецепторами различных типов. При этом установлено гастропротективное действие семакса в условиях стресса, иммуномоделирующий, кардиопротекторный и антикоагулянтный эффекты [24, 30, 37, 45, 62, 67, 82]. Отсутствие гормональной активности, высокая биодоступность, безопасность применения и плеiotропность фармакологических эффектов определили выбор пептида АКТГ₄₋₇-PGP как средства патогенетической коррекции стрессиндуцированных изменений состава пристеночной микробиоты толстой кишки.

Диссертационное исследование (№ государственной регистрации АААА-А18-118011040062-0) выполнено по основному плану научно-исследовательской работы Курского государственного медицинского университета.

Цель исследования

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

Задачи исследования

1. Исследовать влияние введения пептида АКТГ₄₋₇-PGP на состав пристеночной микробиоты крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса.

2. Определить морфометрические характеристики толстой кишки у крыс после введения пептида АКТГ₄₋₇-PGR в условиях хронического иммобилизационного стресса.

3. Изучить влияние введения пептида АКТГ₄₋₇-PGR в условиях хронического иммобилизационного стресса на функциональное состояние нервной системы у крыс с использованием поведенческих тестов «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт».

4. Определить уровень кортикостерона в сыворотке крови экспериментальных животных при хроническом иммобилизационном стрессе и в условиях применения пептида АКТГ₄₋₇-PGR.

5. Изучить характер и силу корреляционных взаимосвязей определяемых показателей и оценить их патогенетическую роль в условиях хронического иммобилизационного стресса и применения пептида АКТГ₄₋₇-PGR.

Научная новизна работы

Впервые в эксперименте исследовано влияние введения АКТГ₄₋₇-PGR на качественный и количественный состав пристеночной микробиоты толстой кишки в условиях хронического иммобилизационного стресса. Впервые изучены морфофункциональные показатели стенки толстой кишки после введения АКТГ₄₋₇-PGR в условиях стресса.

Впервые изучено влияние многократного введения АКТГ₄₋₇-PGR в условиях хронического иммобилизационного стресса на поведение крыс с использованием тестов «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт».

Впервые исследовано влияния введения АКТГ₄₋₇-PGR на уровень кортикостерона сыворотки крови крыс при хроническом иммобилизационном стрессе.

Впервые установлены эффективные дозы АКТГ₄₋₇-PGR, обладающие значительным корригирующим воздействием в отношении

стрессиндуцированных сдвигов изучаемых показателей в условиях хронического иммобилизационного стресса.

Впервые проведена патофизиологическая оценка корреляционных взаимосвязей между изучаемыми показателями при хроническом иммобилизационном стрессе в условиях применения Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в работе экспериментальные данные расширяют существующие представления о патогенетических механизмах формирования стрессиндуцированного дисбиоза. Результаты работы способствуют обоснованию возможности применения пептида АКТГ₄₋₇-PGR для фармакологической коррекции стрессиндуцированных изменений состава микробиоценоза толстой кишки.

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

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

Внедрение результатов исследования в практику

Материалы диссертации используются в лекционных курсах кафедр микробиологии, вирусологии, иммунологии, патофизиологии, фармакологии Курского государственного медицинского университета; научно-исследовательской работе сектора регуляторных пептидов отдела химии физиологически активных веществ ФГБУ Института молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Положения, выносимые на защиту

1. Применение пептида АКТГ₄₋₇-PGP способствует коррекции стрессиндуцированных нарушений состава мукозной микробиоты толстой кишки, морфометрических показателей ее стенки.

2. Нормализация при применении пептида АКТГ₄₋₇-PGP состава мукозной микробиоты толстой кишки, морфометрических показателей ее стенки на фоне коррекции состояния нервной системы и уровня кортикостерона являются подтверждением функциональных взаимосвязей в кишечно-мозговой оси.

3. Стрессиндуцированные нарушения состояния толстокишечной микробиоты и поведенческих реакций в условиях введения пептида АКТГ₄₋₇-PGP сопровождаются выраженными изменениями силы и направленности корреляционных взаимосвязей между определяемыми показателями.

Степень достоверности и апробация работы

Степень достоверности сформулированных в результате выполненной работы научных положений и выводов определяется полнотой литературно-библиографической справки, использованием общепринятых современных методов экспериментального моделирования, получения исследуемого материала и его изучения, статистической обработки полученных результатов, которые адекватны задачам диссертационного исследования.

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

международным участием «Молодежная наука и современность», посвященной 84-летию Курского государственного медицинского университета и 100-летию со дня рождения профессора Г.М. Ткаченко (Курск, 2019); V Всероссийской научно-практической конференции «Павловские чтения» (Курск, 2019); 85-й Международной дистанционной научной конференции студентов и молодых ученых «Молодежная наука и современность» (Курск, 2020).

Апробация диссертации состоялась на совместном заседании кафедр микробиологии, вирусологии, иммунологии; патофизиологии; нормальной физиологии им. А.В. Завьялова; гистологии, эмбриологии, цитологии; патологической анатомии; фармакологии; общей гигиены; анатомии человека федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 17 от «30» июня 2020 г.).

Личный вклад автора

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

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формулам специальностей 03.02.03 – микробиология и 14.03.03 – патологическая физиология. Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследования специальностей, конкретно – пунктам 2, 6, 7 и пунктам 2, 7, 8, 10 паспортов, соответствующих специальностей.

Публикации

По материалам диссертации в центральной и региональной печати опубликовано 14 работ, включая 6 – в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (2 из них – в журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus), 1 – патент на изобретение. В публикациях содержится полный объем информации по теме диссертации.

Структура и объем работы

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

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Микробиота толстой кишки и ее значение для организма человека

Желудочно-кишечный тракт человека населяют множество различных микроорганизмов, которые образуют сложное динамическое микрoэкологическое сообщество, участвующее в поддержании гомеостаза макроорганизма и оказывающее влияние на его восприимчивость к заболеваниям благодаря своей метаболической активности и взаимодействию с хозяином [139].

Установлено, что сложившееся в процессе эволюции и филогенеза количественное и качественное соотношение между микробными популяциями, населяющими желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) характеризуется определенной стабильностью и постоянством. Физиологическое равновесие данного соотношения состава микробиоты здорового человека получило название эубиоз либо нормобиоценоз [79].

Видовой состав и количественные характеристики микробиоты различны для определенных отделов ЖКТ, что связано с их анатомическими и физиологическими особенностями: скоростью продвижения химуса, значением pH, секрецией пищеварительных ферментов. Наиболее густонаселенным отделом является толстая кишка, где отмечается наибольшее биологическое разнообразие: 17 семейств, 45 родов и более 500 видов микроорганизмов [87, 104, 240].

Кишечный микробиом составляет примерно 3 миллиона генов, что в 150 раз больше, чем совокупный геном организма человека [124].

Доминирующая роль в популяции толстокишечной микробиоты принадлежит бактериям, тогда как грибы, вирусы, простейшие представлены значительно меньшим качественным и количественным составом [96, 138, 160, 249]. При использовании культурально-независимых методов (ПЦР,

FISH) было установлено, что микробиота кишечника человека представлена десятью основными типами домена «Bacteria» – Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Spirochaetes, Cyanobacteria, Synergistetes, Fusobacteria, Lentisphaerae, Proteobacteria, и Verrucomicrobia, и одним филумом домена «Archaea» – Euryarchaeota. Причем филумы Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes и Proteobacteria являются доминирующими у здоровых людей и составляют 80-99% толстокишечной микробиоты [147, 229].

Толстокишечную микрофлору принято подразделять на резидентную (постоянную), составляющую около 90% микроорганизмов, колонизирующих кишку, факультативную – 9,5%, и транзиторную (случайную), которая составляет не более 0,5%. К постоянной микрофлоре относят представители родов *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Escherichia* и *Enterococcus*, к факультативной – родов: *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Peptococcus*, а к случайной – родов: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Candida* [79, 111].

В зависимости от локализации кишечная микрофлора представлена внутрипросветной (10-15%), которая подвержена значительным изменениям и зависит от различных факторов эндо- и экзогенной природы и в целом не отражает морфофункциональное состояние кишки, и мукозной (пристеночной – 85-90%). Первая располагается и функционирует непосредственно в полости кишки, вторая – выстилает слизистую бактериальной пленкой, образуя микроколонии морфологически идентичных клеток на поверхности колоноцитов. Имобилизованные в составе биопленок микроорганизмы за счет продуцируемых экзополисахаридов и муцина, секретируемого бокаловидными клетками, являются более устойчивыми к действию негативных факторов в сравнении с просветными [39, 117, 207, 263]. В количественном выражении состав мукозной микробиоты в 6 раз больше, чем просветной [43].

По типу потребляемого микроорганизмом субстрата кишечную микробиоту классифицируют на сахаролитическую (бифидобактерии,

лактобактерии, энтерококки) и протеолитическую (бактероиды, клостридии, протей, эшерихии). Расщепляя полисахариды, сахаролитическая микрофлора индуцирует выработку короткоцепочечных жирных кислот (валериановой, масляной, молочной, уксусной, пропионовой), являющихся маркерами благополучного состояния толстой кишки, которое поддерживается за счет определенных значений кислотности в просвете кишки, регуляции моторной функции пищеварительного тракта, блокировки рецепторов эпителиоцитов и нормализации кровотока. Участвуя в бактериальном гидролизе, протеолитическая микробиота расщепляет белки и индуцирует образование индола, фенола и скатола, которые, в свою очередь, активизируют перистальтику кишки и стимулируют продвижение химуса по ней [58].

В настоящее время доказана важная роль нормальной микробиоты желудочно-кишечного тракта в поддержании большинства показателей гомеостаза человеческого организма [165, 215]. Нормобиота – это неспецифический защитный барьер от патогенных микроорганизмов и других факторов агрессии на метаболическом, регуляторном, клеточном и молекулярно-генетическом уровнях [29, 66]

При анализе роли толстокишечной микробиоты для организма человека в целом следует акцентировать внимание на следующих ее функциях: пищеварительной, защитной, биосинтетической, иммуномоделирующей, антимуtagenной, антиканцерогенной, генетической и колонизационной резистентности.

Пищеварительная функция заключается в участии микроорганизмов в синтезе ферментов, расщепляющих олиго- и полисахариды, белки, липиды, холестерин, трансформирующих билирубин, деконъюгирующих желчные кислоты. Бактериальная деконъюгация желчных кислот приводит к снижению эффективности эмульгирования липидов и образования мицелл [246], в свою очередь желчные кислоты, являясь сигнальными молекулами, могут регулировать различные гены, в том числе и ассоциированные с

липидным обменом [109, 110, 172]. В результате этого обеспечивается гипохолестеринемический эффект кишечных микроорганизмов.

Особое значение имеет биосинтетическая функция толстокишечной микробиоты, которая обеспечивает образование и всасывание эссенциальных нутриентов: витаминов группы К и группы В (биотина, кобаламина, фолатов, никотиновой кислоты, пантотеновой кислоты, пиридоксина, рибофлавина, тиамина) и аминокислот (аргинина и глутамина) [168]. Выраженной способностью, обеспечивающей синтез витаминов группы В и витамина К обладает кишечная палочка. Представители родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* улучшают всасывание витамина D, железа и кальция [2]. Исследуя кишечный микробиом наиболее распространенных кишечных бактерий на наличие генов, кодирующих биосинтез биотина, кобаламина, фолатов, ниацина, пантотената, пиридоксина, рибофлавина и тиамина, было установлено, что представители рода *Bacteroides* обладают максимальной, генетически детерминированной способностью к синтезу витаминов группы В за исключением витамина В₁₂. В случае генетической детерминации синтеза витамина В₁₂ лидирующее положение, как его продуценты занимают бактерии, относящиеся к роду *Fusobacterium* [245].

Кишечная микробиота оказывает значительное влияние на эффективность противоопухолевого иммунного ответа. Представители толстокишечного микробиоценоза воздействуют на распространенность и темп роста опухоли, и, следовательно, на ожидаемую продолжительность жизни онкологических больных путем влияния на молекулярные механизмы окислительного стресса [188, 189] и генотоксичность лейкоцитов периферической крови [182], что способствует уменьшению активности системных воспалительных процессов, имеющих важное значение в развитии злокачественных опухолей. Известно, что увеличение числа в составе микробиоты толстой кишки бактерий рода *Bifidobacterium* способствует формированию Т-клеточного противоопухолевого ответа [127, 137, 140]. Кроме того, предполагается, что противоопухолевый эффект лактобацилл

обусловлен снижением эффективности пероксидазы, которая обладает антиоксидантной активностью. Также показано, что синтезируемые микроорганизмами фолиевая кислота и цианокобаламин определяют стабильность ДНК энтеро- и колоноцитов. Дефицит этих витаминов способствует абберациям в молекулах ДНК, и, как следствие, развитию злокачественных новообразований [75].

Иммунная функция микробиоты ассоциирована с собственной лимфоидной тканью слизистой оболочки кишки, известной как GALT (gut-associated lymphoid tissue) и являющейся составляющей иммунной системы организма. В стенке кишечника сосредоточено около 80% от всех иммунокомпетентных клеток, порядка четверти слизистой оболочки кишечника представлено лимфоидной тканью. Значительная инфильтрация плазмócитами, лимфоцитами и макрофагами слизистой оболочки, особенно толстой кишки, обеспечивает эффективный барьер для проникновения патогенных микроорганизмов [104, 162, 259]. Комменсальные бактерии, имеющие в своей структуре лиганды (полисахарид А, липополисахарид и липотейхоевая кислота), влияют на нормальное развитие и функционирование мукозального иммунитета, активируя синтез секреторных Ig А и фагоцитоз. [162, 167].

В настоящее время накоплено достаточное количество данных об участии толстокишечной микробиоты в метаболизме большинства микро- и макронутриентов, в том числе и его регуляции. Микроорганизмы влияют на метагеном человека за счет регуляции экспрессии его генов, что способствует формированию представлений о программирующем воздействии микробиоты толстой кишки на метаболизм человека [98, 228], поэтому влияние бактерий на метагеном макроорганизма можно рассматривать как генетическую функцию толстокишечной микробиоты.

Функция колонизационной резистентности аутофлоры толстой кишки заключается в предотвращении заселения биотопа патогенными и условно-патогенными бактериями. Механизм неблагоприятного микроокружения

реализуется посредством конкуренции микроорганизмов за питательные вещества, рецепторы адгезии и синтеза продуктов метаболизма (антимикробные пептиды, бактериоцины, лизоцимы, перекись водорода, летучие жирные кислоты и органические кислоты), ингибирующих рост патогенных видов [75, 85].

На основании вышеизложенного можно полагать, что микробиота толстой кишки играет значительную роль в сохранении постоянства состава внутренней среды организма. Данной обстоятельство позволяет выделить аутофлору кишечника в самостоятельный «экстракорпоральный орган» [215], который, благодаря своей способности к аутостабилизации, участвует в сохранении гомеостаза. Под действием негативных факторов различной продолжительности, частоты и силы, механизмы аутостабилизации нарушаются, что приводит к изменениям в составе микробиоты и формированию дисбиоза (дисбактериоза) [4, 79].

Исходя из Отраслевого стандарта (ОСТ 91500.11.0004-2003), дисбактериоз кишечника рассматривается как клинико-лабораторный синдром, который возникает при ряде заболеваний и клинических ситуаций, и характеризуется как нарушение качественного и/или количественного состояния нормобиоты биотопа, с дальнейшими метаболическими и иммунными нарушениями, которые у некоторой доли больных сопровождаются клиническими проявлениями [52].

Изменение качественного и количественного состава индигенного микробиоценоза толстой кишки индуцируют изменения биологических и физико-химических параметров данного биотопа, что приводит к повреждению энтеро- и колоноцитов, расстройству процессов внутрикишечного переваривания и всасывания питательных веществ, увеличению проницаемости кишечной стенки для макромолекул и микроорганизмов, изменению моторной и эвакуационной функции желудочно-кишечного тракта и созданию благоприятных условий для роста численности патогенных и условно-патогенных видов микроорганизмов [17,

187, 208]. Данные патофизиологические и патоморфологические изменения способствуют возникновению метаболических и иммунных расстройств, сопровождающихся угнетением иммунологической реактивности организма человека [78].

Таким образом, учитывая механизмы развития дисбиоза кишечника, характер развивающихся при этом патологических изменений морфологического и функционального характера, а также распространенность данного синдрома, важным вопросом является разработка патогенетически обоснованного комплексного подхода к его коррекции.

1.2. Коммуникативные взаимоотношения между микробиотой и центральной нервной системой организма

Согласно современным представлениям, коммуникации желудочно-кишечного тракта и нервной системы представляют собой сложную бинаправленную полиорганную систему, которая участвует не только в поддержании кишечного гомеостаза, но и оказывает влияние на целый ряд показателей высшей нервной деятельности.

Данные взаимоотношения в настоящее время рассматриваются с позиций представлений о кишечно-мозговой оси [103, 105, 131, 153, 161, 163]. Механизмы, лежащие в основе реализации взаимосвязи между кишечником и мозгом представлены нервным, гуморальным и иммунным компонентами [112]. Нервный компонент включает ряд составляющих: центральная, вегетативная и энтеральная нервные системы (ЭНС) [199, 200]. Вегетативная нервная система (ВНС), включающая симпатический и парасимпатический отделы направляет как афферентные сигналы, поступающие от кишечника в центральную нервную систему (ЦНС), так и эфферентные [198].

Блуждающий нерв является основным путем модуляции коммуникаций между микробиотой и мозгом [106, 159]. Данный факт был доказан на

модели экспериментального хронического колита, связанного с тревожным поведением ваготомированных мышей, у которых отсутствовал анксиолитический эффект, полученный при лечении *Bifidobacterium longum* [8]. Установлено, что бактериальные эндотоксины или воспалительные цитокины стимулируют передачу сигналов вагуса из желудочно-кишечного тракта в мозг [114, 115, 151, 251]. Вагальный ответ на такую стимуляцию заключается в подавлении высвобождения провоспалительных цитокинов из макрофагов кишечника, обусловленный стимуляцией α_7 -подтипа никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, находящихся на поверхности этих клеток [5].

Взаимодействие микробиоты с блуждающим нервом реализуется и благодаря кишечным эндокринным клеткам, которые распознают сигналы, поступающие от микроорганизмов через толл-подобные рецепторы (TLR), распознающие молекулярные структуры бактерий [156]. При активации сигнального пути TLR2 происходит усиление целостности кишечного эпителия посредством транслокации белка плотного соединения *zonula occludens-1*. В условиях уменьшения количества облигатных представителей микробиоценоза снижается экспрессия TLR в ЖКТ, что ставит под угрозу иммунный ответ на патогены [116].

Кишечная микробиота оказывает выраженное влияние на кишечно-мозговую ось, взаимодействуя не только локально с клетками стенки толстой кишки и ЭНС, но и с ЦНС через нейроэндокринные и метаболические пути [99, 250]. Установлено, что механизм воздействия микробиоты ЖКТ на активность ЭНС связан с продукцией таких газов, как оксид углерода, оксид азота, сульфид водорода, которые действуют на местные нейротрансмиттеры (ГАМК, серотонин, мелатонин, гистамин, ацетилхолин и катехоламины) [27, 144, 169, 178, 179, 234, 253]. Короткоцепочечные жирные кислоты (масляная кислота, пропионовая кислота и уксусная кислота), являющиеся продуктами метаболизма облигатных представителей толстокишечного микробиоценоза способны стимулировать симпатическую нервную систему, высвобождение

серотонина и оказывать влияние на процессы обучения, память и поведение [164, 199].

Кроме этого, имея высокую степень гомологии с нейропептидами, пептиды бактериального происхождения моделируют поведенческую активность макроорганизма [155, 158, 190], а спермидин, спермин, путресцин и кадаверин, являющиеся метаболитами кишечной микробиоты, участвуют в модуляции поведения и осуществлении ответа нервной системы на стресс, влияют на мнестические функции [185].

Влияние представителей кишечной микробиоты на нормальное функционирование нервной системы может быть частично опосредовано и их участием в синтезе и всасывании витаминов группы В [168].

Модулирующее влияние микробиоты толстой кишки на становление и функционирование нервной системы было доказано в целом ряде экспериментальных исследований, проведенных на гнотобионтах [91, 170, 203, 205, 212, 231, 252, 253]. В частности, установлено влияние микробной колонизации на экспрессию и оборот нейротрансмиттеров в обеих нервных системах, а также на сенсорно-моторные функции кишечника, приводящие к задержке опорожнения желудка и кишечного транзита. Этот факт является доказательством того, что бактериальная колонизация кишечника занимает важное место в развитии и созревании как ЭНС, так и ЦНС [212, 231, 253]. При этом выявлена дисфункция памяти у животных, которая, по предположениям авторов, связана с изменением экспрессии нейротрофического фактора BDNF (brain-derived neurotrophic factor) – одного из наиболее важных факторов, влияющих на память и регулирующих различные аспекты деятельности мозга и когнитивные функции [166, 203, 212, 220, 253].

Кроме этого, лактобактерии и бифидобактерии способны продуцировать аминокислоты, выполняющие нейромедиаторную функцию. Известно, что в мозге мышей гнотобионтов уровень триптофана и тирозина значительно

ниже, чем у грызунов, имеющих микробиоту, а у крыс, получавших *Bifidobacteria infantis*, уровень триптофана в плазме был повышен [255].

Доказательства влияния кишечной микробиоты на функционирование ЦНС получены и в результате проведения серии исследований, в которых экспериментальным животным моделировали антибиотикоассоциированный дисбиоз, вызывавший значительные изменения поведенческих реакций и уровня белка BDNF в миндалинах и гиппокампе. После прекращения введения антибиотиков поведенческий профиль у животных восстанавливался [194, 252].

Также известно, что воспалительные заболевания кишечника инфекционной этиологии сопровождаются депрессивными и тревожными нарушениями, когнитивными расстройствами у 60% пациентов [102, 120, 134], а в опытах на грызунах инфицирование животных *Helicobacter pylori* и *Citrobacter rodentium* приводило к изменению поведенческих реакций [94, 175].

Результаты исследований последних десятилетий показывают существенную роль микробиоты в возникновении воспалительных заболеваний пищеварительного тракта. При этом изменения микрoэкологических взаимоотношений связаны с различными хроническими воспалительными заболеваниями кишки (ХВЗК), в том числе и с синдромом раздраженного кишечника (СРК), что обуславливает патогенетическую эффективность терапии данных заболеваний пробиотиками [101, 108, 126].

Кроме этого, имеются данные о наличии взаимосвязей между нарушением бактериальной колонизации или микрoэкологических взаимоотношений в кишечнике с заболеваниями иммунной системы [258], системы кровообращения [81, 143], эндокринной системы [171, 215], ожирением [81, 88], аутизмом [171], синдромом дефицита внимания с гиперактивностью (СДВГ) [134] и синдромом хронической усталости (СХУ) [89].

Однако, несмотря на наличие значительного количества исследований, посвященных изучению коммуникаций между пищеварительным трактом и ЦНС, в настоящее время отсутствуют сформировавшиеся общепринятые представления о влиянии микробиоты на состояние психического здоровья и наоборот.

1.3. Стресс и его роль в формировании дисбиоза. Понятие о психобиотиках

На современном этапе развития общества проблема влияния стресса различной этиологии на состояние кишечной микробиоты и функций нервной системы имеет важное значение вследствие широкого распространения и необходимости разработки патогенетически обоснованных методов коррекции стрессиндуцированных нарушений.

Согласно концепции, предложенной Г. Селье, «стресс – это совокупность общих неспецифических физиологических, психологических и биохимических реакций организма в ответ на действие стрессоров – раздражителей чрезвычайной силы любой природы». Стрессовая реакция направлена на сохранение постоянства внутренней среды организма и его адаптацию к новым условиям внешней среды [183, 202]. Данные процессы адаптации обеспечиваются целостной системой организма, включающей в себя ЦНС и ВНС, гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось, иммунную систему, в том числе совокупность клеток, продуцирующих цитокины. Основными медиаторами вышеуказанных систем являются кортикостероиды, парасимпатические и симпатические нейротрансмиттеры, цитокины, которые действуют в пределах динамической сети, ингибируя или активируя друг друга [44, 201, 202].

Первым этапом координированного ответа нервной системы на воздействие различных стрессоров является активирование ВНС, реализующей стресс-эффекты через нейротрансмиттеры на органах-мишенях [44]. При нарастающем развитии стрессорной реакции подключаются

эндокринные механизмы: активируются катехоламинергические и аргинин-вазопрессиновые нейроны, секретируется кортикотропин-рилизинг гормон (КРФ) [241], что индуцирует активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси с последующей секрецией периферических биомедиаторов: ацетилхолина, адреналина, серотонина, норадреналина и допамина, реализующих стрессорный ответ [174, 227, 257], сила и продолжительность которого зависит от интенсивности и этиологии стрессорного агента [186].

Однократное непродолжительное стрессирование (острый стресс) сопровождается развитием стадии тревоги без дальнейшего истощения. Стадия резистентности возникает как ответ на продолжительные стрессоры умеренной силы. При хроническом или чрезвычайно сильном стрессе может развиваться стадия истощения [20].

Известно, что ЖКТ является высокочувствительной системой к действию стрессоров, и, несмотря на значительное количество проведенных исследований, посвященных изучению негативного влияния стресса на пищеварительный тракт в целом и на состав микробиоценоза толстой кишки в частности, механизмы этих явлений до настоящего времени остаются недостаточно изученными, что обуславливает высокий интерес ученых к этому вопросу. В частности, результаты экспериментальных исследований демонстрируют модуляцию видового и количественного состава микробиоты под воздействием стрессоров различной этиологии и интенсивности [93, 141, 149, 204, 221, 243]. Выявлено, что в условиях стресса нервная система влияет на состав кишечной микробиоты посредством активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, которая в свою очередь регулирует секрецию кортизола и катехоламинов, воздействуя на активность иммунных клеток как локально в кишечнике, так и на системном уровне [90, 119, 204, 221, 250].

Также известно, что влияние ЦНС на состав микробиоты увеличивает кишечную проницаемость слизистой оболочки [157, 178, 191]. Установлено,

что острый стресс увеличивает параклеточную проницаемость толстой кишки как в результате снижения экспрессии белка плотного соединения *zonula occludens-2* в колоноцитах [219], так и путем развития гипертермии в организме в результате воздействия метаболитов микробного происхождения. В условиях повышенной проницаемости происходит бактериальная транслокация, активирующая иммунный ответ, который проявляется повышением продукции провоспалительных медиаторов: IL-6 и IFN γ [119, 259]. Кроме того, симпатический отдел ВНС модулирует количество, дегрануляцию и активность тучных клеток с последующим дисбалансом в высвобождении триптазы и гистамина, которые также увеличивают проницаемость эпителия для бактерий [232].

Одним из возможных механизмов изменения состояния микробиоты в условиях стресса является усиление секреции α -дефензина – эндогенного антимикробного пептида из клеток Панета, который также является маркером риска шизофрении [95].

Обращает внимание тот факт, что катехоламины и кортизол способны стимулировать пролиферацию определенных штаммов условно-патогенных микроорганизмов, имеющих на своей поверхности рецепторы к данным нейротрансмиттерам, а также их способность усиливать колонизацию слизистой оболочки. По такому механизму вышеуказанные медиаторы стресса способствуют росту непатогенных изолятов кишечной палочки и патогенного штамма *Escherichia coli* 0157: H7 за счет наличия на их поверхности рецепторов к адреналину/норэпинефрину [256].

Одним из наиболее перспективных подходов при исследовании роли кишечной микробиоты в патогенезе стрессорной реакции является изучение эффектов психобиотиков. Являясь живыми бактериями, при адекватном применении в определенных количествах они могут оказывать выраженный эффект на состояние здоровья пациентов, имеющих психические отклонения [135, 227]. В нашей работе в соответствии ее цели и задачам представляется целесообразным проанализировать результаты доклинических и клинических

исследований с точки зрения рода и вида микроорганизмов, входящих в состав лекарственного препарата.

Известно, что анксиолитический эффект от введения пробиотических штаммов (*L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *B. infantis*) в условиях стресса был обнаружен в ряде экспериментальных исследований на грызунах [92, 146, 180, 198, 204, 221]. Пробиотический комплекс, включающий *L. helveticus* и *B. longum*, также приводил к снижению уровня тревожности крыс в поведенческих тестах в условиях хронического стресса [97].

Группа исследователей во главе с Н.М. Savignac [105] в 2014 году продемонстрировала, различное коррегирующее воздействие со стороны психобиотиков на основе бактерий, относящихся к роду *Bifidobacterium*. Так, введение *B. longum* приводило к ослаблению экспериментально индуцированной стресс-реакции, депрессоподобного поведения, снижало уровень тревоги у мышей линии BALB/c, а применение *B. breve* лишь уменьшало тревогоподобное поведение.

По данным Zareie и соавторов применение штаммов живых лиофилизированных бактерий *L. helveticus* и *L. rhamnosus* предотвращает увеличение параклеточной проницаемости слизистой и транслокацию комменсальных бактерий, вызванную хроническим стрессом у крыс [224]. Схожие эффекты наблюдались при пероральном приеме препарата на основе лактобацилл другого вида (*L. farciminis*) в условиях иммобилизационного стресса [222, 223].

Аналогичные результаты были получены при использовании живых микроорганизмов – представителей нормофлоры толстого кишечника при лечении СХУ и депрессии у людей. Так, бактерии *L. casei* штамма Shirota способны снижать выраженность симптомов тревоги у пациентов со СХУ [89], а комбинированное введение *L. acidophilus*, *L. casei* и *B. bifidum* в течение 8 недель оказывает положительный эффект у пациентов с депрессией [125].

Предположение о возможности реализации пробиотическими штаммами своих эффектов посредством модуляции иммунитета хозяина в настоящее время получает все больше доказательств, особенно вследствие увеличения количества исследований, подтверждающих уменьшение воспаления при синдроме раздраженного кишечника (СРК) [173, 193, 233, 239, 254]. Свидетельством важной роли иммунных механизмов в патогенезе тревожных расстройств является тот факт, что уровень провоспалительных цитокинов у пациентов с депрессией напрямую коррелируется с тяжестью патологического процесса [206].

Снижение симптомов депрессии может быть связано и со стимуляцией выработки BDNF некоторыми видами бифидо- и лактобактерий, согласуется с представлениями о нейротрофической теории депрессии, в основе которой лежит дефицит BDNF [130, 154].

Также показана возможность нормализации состояния пациентов с психическими расстройствами за счет использования *Bifidobacterium animalis*, которые ингибируют активность фермента моноаминоксидазы, участвующего в расщеплении нейротрансмиттеров в синаптической щели [238].

Предполагается, что положительное корректирующее действие живых бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* влияние психобиотиков на людей, находящихся в тревожном состоянии, связано с их антиоксидантной активностью в условиях окислительного стресса [192, 195]. Кроме того, в основе анксиолитического действия пробиотиков может находиться способность микроорганизмов синтезировать триптофан, являющийся предшественником нейромедиатора серотонина, который, взаимодействуя с ЭНС, способен оказывать влияние на ЦНС [36, 50].

На основании вышеизложенного можно заключить, что в условиях стресса развиваются существенные aberrации видового и количественного состава микробиоты, способные оказывать значительное влияние на функциональное состояние оси кишечник-мозг. Поэтому поиск путей

коррекции стрессиндуцированных сдвигов во взаимоотношении между кишечной микробиотой и мозгом имеет важное научное и практическое значение.

1.4. Физиологические и фармакологические эффекты АКТГ₄₋₇–PGR

В настоящее время коррекция дисбиотических изменений в соответствии с Оценочным стандартом имеет преимущественно симптоматический характер, не воздействуя при этом на этиологический фактор данной патологии. Поэтому перспективным представляется корректирование стрессассоциированного дисбиоза препаратами со стресслимитирующим действием, в том числе синтезированные на основе регуляторных пептидов.

Меланокортины (МК) представляют собой класс регуляторных пептидов, который достаточно интенсивно изучается в настоящее время. Ключевыми представителями данного класса пептидов являются α -, β -, γ -меланоцитстимулирующие гормоны (МСТГ) и аденокортикотропный гормон (АКТГ). Меланокортины реализуют свои эффекты путем взаимодействия с 5 подтипами меланокортиновых рецепторов (MCR), которые отличаются аминокислотной последовательностью, но с высоким уровнем гомологии, и экспрессируются в различных тканях и органах. Профиль активности пептидных регуляторов данного семейства включает в себя как гормональные, так и другие физиологические эффекты [37, 40, 133, 247]. АКТГ и его фрагменты способствуют обучению, концентрируют внимание и усиливают консолидацию памятного следа [37, 40, 247]. Модуляция поведенческих реакций регуляторных пептидов связана с их прямым воздействием на ЦНС. С помощью иммунохимических методов установлена способность фрагментов аденокортикотропного и α -меланоцитстимулирующего гормонов к проникновению через гематоэнцефалический барьер [37].

Регуляторные пептиды в организме человека и животных подвергаются протеолизу, вследствие чего период их полураспада достаточно короткий и составляет от нескольких минут до пары часов [19]. С целью пролонгирования физиологических эффектов пептидные регуляторы «защищают» от действия пептидаз путем присоединения к ним стабильных аминокислотных последовательностей [34]. К их числу относится семакс - фрагмент АКТГ₄₋₇, который стабилизирован последовательностью аминокислот Pro-Gly-Pro (гептапептид Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) [1, 35, 59]. Он не имеет гормональных эффектов, но при этом сохраняет влияние на поведенческую активность природных меланокортинов. Семакс устойчив к действию экзо- и эндопептидаз, что приводит к пролонгированию фармакологических эффектов препарата [1, 48].

Препарат зарегистрирован на территории Российской Федерации и разрешен к медицинскому применению и выпуску (регистрационное удостоверение №94/294/10).

При изучении эффектов регуляторных пептидов используют различные способы их введения. Однако при системном внутривенном введении АКТГ₄₋₇-PGP, попадая в кровоток, подвергается скорому ферментативному распаду. При этом концентрация препарата в тканях мозга ничтожно мала. Пероральное введение пептида также не показало эффективности в связи с его быстрой деградацией различными протеазами желудочно-кишечного тракта [148, 214].

Наиболее оптимальными способами применения АКТГ₄₋₇-PGP являются интраперитонеальное (в эксперименте) и интраназальное введение. В эксперименте на животных было доказано, что фармакологическая эффективность интраназального применения аналогична внутрибрюшинному, а в некоторых случаях превышает таковую [35, 48, 49].

В результате изучения фармакокинетики АКТГ₄₋₇-PGP установлено, что период полураспада пептида составляет лишь несколько минут, а

терапевтический эффект при этом сохраняется на протяжении 24-48 часов после однократного введения [35, 60, 70].

Исследование процесса протеолиза АКТГ₄₋₇-PGP показало, что первоначальным продуктом биodeградации семакса под действием лейцинаминопептидазы являлся His-Phe-Pro-Gly-Pro (Семакс-5). Степень деградации препарата существенно отличается в зависимости от класса протеаз. Так, применение микросомальной лейцинаминопептидазы способствовало значительному снижению концентрации АКТГ₄₋₇-PGP в смеси: через 1 час 10 минут определялось только 1,2% препарата, при наличии микробной лейцинаминопептидазы – 18,1%, дипептидной пептидазы – 93,5%, карбоксипептидазы В и Y – 96,8 и 51% соответственно, пепсина – 100% [37].

Механизм деградации АКТГ₄₋₇-PGP имеет отличия в различных органах и тканях. В опыте было доказано наличие в них специфических мест связывания АКТГ₄₋₇-PGP [32, 237]. С помощью хроматографических методов анализа установлена существенная биodeградация гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro, в результате его взаимодействия с плазматическими мембранами переднего мозга экспериментальных животных, которая заметно снижалась при температуре 0–4°C [37]. Значительное специфическое связывание АКТГ₄₋₇-PGP выявлялось в гиппокампе и мозжечке, однако в коре и базальных ганглиях отмечалось только неспецифическое связывание [69]. В эксперименте на крысах было установлено специфическое связывание концевой фрагмента Pro-Gly-Pro на плазмалемах базальных ганглиев переднего мозга, при этом выявлялась конкуренция с эффекторными молекулами канабионидных и накотинных рецепторов [7, 37].

С целью изучения механизма действия АКТГ₄₋₇-PGP был выполнен поиск генов внутриклеточных сигнальных путей, которым могут изменять свою экспрессию под воздействием пептида. В данном исследовании изучали влияние введения гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro на экспрессию генов, которые кодируют сигнальные пути передачи информации[37]. В

итоге установили наибольшее действие препарата на NF-kB- и Wnt-пути. Влияние препарата на различные элементы сигнальных путей передачи показывает вероятное участие пептида в процессах деления, дифференцировки, выживания и гибели клеток [31].

АКТГ₄₋₇–PGP оказывает не однонаправленное влияние на активность моноаминергических систем во многих структурах мозга, что подтверждается рядом экспериментальных исследований. Так, после внутрибрюшинного введения гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro в дозе 0,15 мг/кг в стриатуме и гипоталамусе экспериментальных животных обнаруживалось увеличение концентрации 5-оксииндолуксусной кислоты, которая является метаболитом серотонина. Данный эффект сохранялся на протяжении 3-х часов, что может свидетельствовать о воздействии АКТГ₄₋₇–PGP на серотонинергическую систему мозга. Также спустя сутки от момента интраперитонеального однократного применения препарата в дозах 0,15 мг/кг и 0,6 мг/кг модулировалась серотонин- и дофаминергическая синаптическая передача в стриатуме, возрастало количество данных нейромедиаторов и 5-оксииндолуксусной кислоты. Хроническое введение пептида на протяжении 7 дней в дозе 0,6 мг/кг способствовало снижению содержания дофамина и 3,4-диоксифенилуксусной кислоты в стриатуме и уменьшению серотонина в гипоталамусе [12, 14, 37]. При исследовании комбинированного введения АКТГ₄₋₇–PGP и d-амфетамина установлено достоверное увеличение локомоторной активности экспериментальных животных, что возможно обусловлено возрастанием дофаминергической нейротрансмиссии в стриатуме. Синергизм стимулирующих эффектов гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro и d-амфетамина также может быть обусловлен усилением экспрессии нейротрофического фактора мозга (BDNF) [37, 65, 176].

АКТГ₄₋₇–PGP проявляет анальгетическое, анксиолитическое, антидепрессантное и ноотропное действие, оказывает влияние на развитие

нервной системы и на метаболические процессы в ней, вызывает уменьшение как отсроченной, так и первичной гибели нейронов [23, 45, 49, 62].

В сравнении с природными МК АКТГ₄₋₇-PGP обладает пролонгированным ноотропным эффектом, длительность которого может достигать 20-24 часов. Данный эффект пептида может реализовываться за счет возрастания количества нейротрофинов в отдельных структурах ЦНС, так и вследствие роста биологической активности систем биогенных аминов [37, 47].

При исследовании действия гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro на экспрессию нейротрофинов установлено, что введение нейропептида способствует увеличению концентрации нейротрофического фактора мозга в тканях мозга экспериментальных животных, который, как и другие нейротрофины, оказывает влияние на дифференцировку и созревание нейронов, на формирование памятного следа и процессы обучения, стимулирует синтез биологически активных веществ [37]. Исходя из этого, увеличение концентрации нейротрофического фактора мозга (BDNF) в ЦНС является одним из механизмов ноотропного действия АКТГ₄₋₇-PGP. Следует отметить, что данный механизм ноотропного эффекта пептида не является единственным, так как в опыте на животных установлено улучшение обучения в первые сутки спустя 15 минут после инъекции препарата, хотя увеличение содержания BDNF наблюдалось спустя 3 часа после введения пептида. Исходя из этого можно сделать вывод, что возрастание экспрессии нейротрофических факторов определяет долговременное действие АКТГ₄₋₇-PGP на процессы обучения. Также следует отметить, что ноотропное действие пептида имеет дозозависимый характер и различается в зависимости от варианта введения. Так, интраназальное введение АКТГ₄₋₇-PGP эффективнее способствовало улучшению обучения, чем интраперитонеальные инъекции [48, 129, 208, 230].

Изменение в функциональной активности системы биогенных аминов при применении гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro может

активировать внимания, с выбором наиболее биологически значимых стимулов, что также приводит к улучшению процессов обучения. Установлено, что на фоне блокады галоперидолом дофаминергических рецепторов интраназальное применение пептида в дозах 50 мкг/кг, 200 мкг/кг и 600 мкг/кг не корригировало нарушений двигательной и ориентировочно-исследовательской активности экспериментальных животных. Однако предварительное введение пептида в наименьшей из используемых доз приводило к нормализации выработки условного рефлекса активного избегания [37, 83].

Основой анксиолитических и антидепрессантных эффектов пептида может являться увеличение экспрессии BDNF в гиппокампе, так как нейротрофические факторы участвуют в регуляции стрессорных и тревожных состояний. Данные эффекты гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro также могут реализовываться вследствие активации или торможения медиаторных систем [37]. При хроническом введении пептида на протяжении 10 дней в дозе 50 мкг/кг изменения в двигательной и ориентировочно-исследовательской активности не наблюдалось, однако при этом проявлялось его анксиолитическое и антидепрессивное действие [16]. В частности, при однократном применении пептида в дозах 50 и 500 мкг/кг эффекты были незначительными. Однако на фоне применения холецистокинина-тетрапептида, имеющего анксиолитический эффект, в дозе 400 мкг/кг семакс нормализовал поведенческие реакции, оказывая анксиолитический и антидепрессивный эффекты в условиях повышенной тревожности. В данном случае антидепрессивное действие препарата было связано с активацией норадренергической системы [15].

Мелакортиновая система занимает важное место в регуляции состояния ноцицептивной системы. Показано, что различные МК могут разнонаправленно влиять на болевой порог, при этом направленность эффектов зависит от структуры пептида, способа его введения и дозировки. АКТГ₄₋₇-PGR в дозах 0.015–0.5 мг/кг в опытах на крысах и мышах приводил

к снижению уровня болевой чувствительности на различных экспериментальных моделях [11, 48, 70]. В условиях интраназального способа введения пептида эффективность обучения животных возрастает по сравнению с внутривенными инъекциями, но при этом введении не наблюдается его анальгетического эффекта. Данный факт может свидетельствовать о различных механизмах и структурах мозга, вовлекаемых под действием пептида в регуляцию активности ноцицептивной системы и процессов обучения.

Антиноцицептивное действие АКТГ₄₋₇-PGR может быть обусловлено воздействием на опиоидную систему, так как на фоне предварительной блокады опиоидных рецепторов анальгетический эффект пептида значительно снижался [33, 35]. Кроме этого, АКТГ₄₋₇-PGR способствует активации дофаминергической и серотонинергической систем, а также увеличению количества норадреналина в гипоталамусе [9, 236]. Данные нейромедиаторы вовлекаются в регулирование болевой чувствительности через нисходящие цереброспинальные пути. Воздействие пептида на боль можно связать как с его прямым, так и опосредованным (через экспрессию нейротрофинов) взаимодействием с глутаматергической системой, которая участвует в преобразовании ноцицептивных сигналов [142]. Наибольший анальгетический эффект АКТГ₄₋₇-PGR наблюдается в дозах 500 и 1500 мкг/кг.

Значительный интерес представляет изучение эффектов пептида при патологических состояниях, в частности, при ишемии. В условиях экспериментального двухстороннего ишемического повреждения префронтального отдела мозга интраназальное применение гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro в дозе 250 мкг/кг ежедневно на протяжении первых 6 суток эффективно восстанавливает показатели пространственной памяти, нарушенные при нарушении микроциркуляции [37, 76]. Установленный опытным путем антиамнестический эффект от введения

АКТГ₄₋₇-PGP может быть обусловлен стимулирующей способностью нейропептида к синтезу различных нейротрофинов [37].

Важное значение для выяснения механизмов нейропротективной активности АКТГ₄₋₇-PGP при ишемическом поражении мозга имеют результаты исследования, в котором было изучено влияние АКТГ₄₋₇-PGP и его С-концевого фрагмента (Pro-Gly-Pro), на экспрессию генов, кодирующих синтез нейротрофинов, факторов роста и рецепторы к ним, при моделировании экспериментального ишемического поражения мозга лабораторных животных, наиболее сходного с острым инсультом [37]. Было установлено, что при нарушении мозгового кровообращения происходит существенное уменьшение экспрессии данных генов в гиппокампе. В условиях введения АКТГ₄₋₇-PGP и Pro-Gly-Pro в очаге ишемии обнаруживалось достоверное изменение экспрессии 20 % изучаемых генов, значительные изменения экспрессии отмечались для генов p75, Lif, TrkA и Gar11. Максимальный эффект от применения пептидов наблюдался в гиппокампе крыс спустя 12 часов после окклюзии, однако транскрипция TrkC, TrkA и BDNF увеличивалась спустя 3 часа, а Ngf спустя 72 часа. Данные результаты позволили заключить, что при применении АКТГ₄₋₇-PGP происходит компенсация изменений в экспрессии данных генов, вызванных ишемией [18, 25, 61].

Кроме того, при экспериментальном ишемическом повреждении головного мозга однократное, а также хроническое применение АКТГ₄₋₇-PGP (в течение 7 дней) до формирования воздействия в дозе 100 мкг/кг приводит к увеличению продолжительности жизни мышей за счет регулирования пептидом продукции свободных радикалов нейтрофилами и макрофагами [8, 82]. Введение гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro в дозе 0,3 мг/кг при моделировании ишемического инсульта приводит к улучшению выживаемости и показателей гемодинамики, к предотвращению избыточного образования окиси азота у крыс и снижению неврологического дефицита [63, 213]. Также было установлено, что использование пептида в дозе 0,25 мг/кг

на протяжении 6 суток ежедневно после экспериментального моделирования острого нарушения мозгового кровообращения способствовало восстановлению обучаемости лабораторных животных [152].

Еще одним механизмом антигипоксического действия гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro в условиях ишемического повреждения головного мозга может являться его воздействие на степень деформируемости эритроцитов и, соответственно, на микроциркуляцию в тканях мозга [37]. Известно, что реологические свойства крови при нарушении мозгового кровообращения существенно изменяются, в том числе снижается деформируемость эритроцитов. При этом АКТГ₄₋₇-PGR способствует увеличению степени деформируемости эритроцитов как у интактных животных, так и у крыс с ишемией [65].

С целью оценки нейропротекторного и нейротрофического действия семакса в раннем онтогенезе было исследовано влияние неонатального внутрибрюшинного введения препарата в течение первых 21 дней жизни детенышам крыс на отдаленные поведенческие реакции. Установлено, что инъекции пептида в дозе 0,5 мг/кг способствовали снижению уровня тревожности, росту ориентировочно-исследовательской активности и улучшению обучения крыс. Введение АКТГ₄₋₇-PGR крысам после воздействия неонатальной изоляции приводило к нормализации массы тела и уровня кортикостерона в крови, способствовало снижению метаболических нарушений, вызванных неонатальным стрессом [26, 53].

Введение АКТГ₄₋₇-PGR интраназально в условиях длительного иммобилизационного стресса оказывает защитное восстановительное действие в ответ на активацию свертывающей системы крови при стрессировании [24].

При экспериментальной окклюзии левой коронарной артерии установлены кардиопротекторные эффекты АКТГ₄₋₇-PGR. В частности, через 2 часа с момента окклюзии, проводящей к ишемии одной трети объема миокарда левого желудочка лабораторных животных, наблюдалось

увеличение диастолического артериального давления и, как следствие, уменьшение пульсового артериального давления [37]. Вводимый спустя 15 минут интраперитонеально гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro в дозе 0,15 мг/кг не влиял на уровни артериального давления, но проявлял протекторное действие в отношении ядер и митохондрий кардиомиоцитов. В результате отдалялись начальные изменения ультраструктуры клеток, характерные для острейшего периода инфаркта миокарда [37].

Также установлено, что интраперитонеальное введение АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 150 мкг/кг при экспериментальной ишемии приводило к снижению плотности симпатических нервных окончаний в хвостовой артерии крыс и возрастанию плотности α_1 – адренорецепторов на миоцитах сосуда в постинфарктный период. Уменьшение гиперреактивности симпатического отдела автономной нервной системы через 28 дней после ишемии при использовании препарата может быть обусловлено противовоспалительным действием пептида, который снижает образование факторов роста [30].

В случае использования в низких дозах АКТГ₄₋₇-PGP улучшает когнитивно-мнестические функции, не приводя к их истощению [240]. Стимуляция обучения отмечалась при применении пептида интраназально в дозах 1,5-50 мкг/кг, внутривнутрибрюшинно – 15-50 мкг/кг. Увеличение дозировки препарата приводило к уменьшению данного эффекта, а доза 500 мкг/кг – к его исчезновению [48].

Известно, что АКТГ₄₋₇-PGP обладает значительной противоязвенной активностью к воздействию ulcerогенных факторов, в частности, к стрессу и этанолу. При внутривнутрибрюшинном введении гептапептид Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro в дозе 0,05 мг/кг не только препятствует язвообразованию, но и способствует заживлению ацетатных язв [13]. Интраперитонеальное введение пептида в широком диапазоне доз (0,06, 0,37 и 3,7 мкмоль/кг) также оказывает гастропротективное действие. Противоязвенный эффект АКТГ₄₋₇-PGP может реализовываться на центральном и периферическом уровне. Механизмами гастропротективного действия пептида могут быть

воздействие на активность и плотность симпатической инервации, на секреторную функцию желудка и на кровоток [30, 67].

В условиях «социального» стресса АКТГ₄₋₇-PGP проявлял себя как эффективный иммуномодулятор, оказывая корригирующее влияние на реакции гуморального и клеточного иммунитета. В частности, предварительное введение препарата в дозе 20 мг/кг способствует уменьшению деструктивных и макрофагально-пролиферативных процессов в селезенке крыс после стрессирования (на 1, 3 и 14 сутки) [82]. Пептид обладает и онкопротективным действием, которое может быть обусловлено как прямым цитотоксическим действием на атипичные клетки, так и модуляцией иммунной системы на защиту от тканевой атипии [37]. Также были установлены интерферонстимулирующие эффекты АКТГ₄₋₇-PGP на течение опухолей молочной железы у мышей, а также на их продолжительность жизни. При этом пептид в дозе 3 мг/кг приводил к достоверному увеличению средней продолжительности жизни у мышей и к регрессии самой опухоли [10].

Таким образом, АКТГ₄₋₇-PGP обладает широким спектром биологических эффектов, характер которых позволяет рассматривать данный пептид как перспективное соединение для коррекции стрессиндуцированных изменений в состоянии микробиоты толстой кишки.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения соотношения состояния микробиоты толстой кишки и поведенческих показателей крыс в условиях иммобилизационного стресса и при применении семакса был выполнен следующий комплекс исследований:

1) изучение уровня тревожности экспериментальных животных в приподнятом крестообразном лабиринте; оценка ориентировочно-исследовательской и двигательной активности, локомоторного поведения, эмоциональности и эпизодов груминга крыс в тесте «открытое поле».

2) исследование состояния пристеночной микробиоты толстой кишки экспериментальных животных;

3) оценка морфологических показателей толстой кишки крыс;

4) установление уровня кортикостерона сыворотки крови крыс методом ИФА.

2.1 Экспериментальные животные

Эксперимент выполнен на 60 самцах крыс популяции Вистар массой 200-230 г, полученных из SPF – вивария Института цитологии и генетики СО РАН, прошедших карантинный контроль вивария Курского государственного медицинского университета на протяжении 14 дней. Содержание животных осуществлялось в стандартных условиях вивария, с неограниченным доступом к пище и воде, при регулируемой температуре воздуха в помещении $22 \pm 2^\circ\text{C}$, с искусственной сменой освещенности 12 часов - свет, 12 часов – темнота. Животные экспериментальных групп каждой серии были получены одновременно из питомника [76].

Все экспериментальные исследования проводились в соответствии с принципами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях, директивы Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22

сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей, и под контролем регионального этического комитета при Курском государственном медицинском университете (протокол № 3 от «30» октября 2017 г.).

2.2 Препарат

В работе использовали аналог фрагмента гормона АКТГ₄₋₇ (Met-Glu-His-Phe), стабилизированный последовательностью аминокислот Pro-Gly-Pro (семакс) к действию экзо- и эндопептидаз, который синтезировали в Институте молекулярной генетики РАН.

Пептид растворяли в изотоническом растворе хлорида натрия и за 12-15 минут до моделирования иммобилизационного стресса вводили интраперитонеально экспериментальным животным в дозах 5, 50, 150 и 450 мкг/кг в объеме из расчета 1 мл на 1 кг массы тела крысы. Нестрессированным и стрессированным контрольным животным вводили эквивалентные объемы физиологического раствора в аналогичные временные промежутки [54, 68].

Применяемые в эксперименте дозы нейропептида были выбраны в соответствии с имеющимися литературными данными об эффективных дозах пептида АКТГ₄₋₇-PGP [15, 16, 21, 37].

2.3 Модель хронического иммобилизационного стресса

Моделирование хронического иммобилизационный стресс проводили согласно методикам Н. Chen et al. [118], J. Zheng et al. [145] и S.W. Wang [262] с незначительными модификациями. Животных помещали в индивидуальные прозрачные пластиковые пеналы с перфорированными отверстиями для вентиляции, которые соответствовали размерам крысы. Экспериментальных животных, находящихся в пеналах, фиксировали в положении лежа на спине. Визуально осуществляли контроль дыхания.

Время нахождения крыс в индивидуальных пеналах при моделировании иммобилизационного стресса составляло по 2 часа на протяжении 14 дней [184].

2.4 Исследования поведенческой активности крыс

Методика изучения поведенческих реакций в тесте «открытое поле»

Изучение поведенческих реакций животных проводили в первой половине дня при искусственном освещении и в условиях шумоизоляции. Поведенческие реакции крыс регистрировали при помощи программы для видеослежения SMART 3.0 и программного расширения для детектирования тела животного.

Установка открытого поля (ОП) представляла собой квадратную арену, выполненную из пластика серого цвета размером 90*90см с высотой стенок 40 см, с искусственным освещением в 30 люкс. Перед тестированием каждого животного поверхность установки протирали спиртовым раствором и высушивали. Крысу плавно помещали в угол установки и регистрировали поведение в течение 5 минут. После помещения животного в установку экспериментатор покидал помещение для тестирования и наблюдал за поведением дистанционно. При анализе пол арены разделяли на 16 квадратов (4 центральных и 12 периферических). В тесте ОП оценивали двигательную (горизонтальную) и исследовательскую (вертикальную) активность, эмоциональность, эпизоды короткого груминга. За горизонтальную двигательную активность принималось перемещение животного по полу установки в различной траектории, единицей горизонтального движения считали пересечение границы квадрата (сектора), причем пересечением границы считали тот момент, когда животное находилось четырьмя лапами в одном квадрате. Вертикальную активность оценивали путем подсчета двух видов стоек: центральных и периферических. Эмоциональность животного характеризовали количеством фекальных болюсов и актов уринации. Кроме этого, регистрировали время, проведенное в центральных и периферических квадратах, пройденную дистанцию в центральных и периферических

квадратах, а также общую пройденную дистанцию. За эпизоды короткого груминга принимали одно или два быстрых круговых движения передних лап вокруг носа или глаз.

*Методика оценки уровня тревожности в тесте
«приподнятый крестообразный лабиринт»*

В приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) производили оценку уровня тревожности экспериментальных животных. Лабиринт, состоящий из 4 крестообразнорасходящихся рукавов (2 закрытых и 2 открытых) и центральной площадки был выполнен из черного непрозрачного поливинилхлорида и располагался на высоте 50 см от пола. Длина рукавов составляла 50 см, ширина – 14 см, высота стенок закрытых рукавов – 30 см. Освещение в закрытых рукавах было 45 люкс, в открытых – 300 люкс, на центральной площадке – 240 люкс. До начала исследования крыс помещали в темный бокс с отверстиями для вентиляции на 5 минут. После животное плавно опускали на центральную площадку мордой в сторону открытого рукава, продолжительность тестирования составляла 5 мин. В период тестирования экспериментатор находился в другом помещении, дистанционно отслеживая поведение животного. С помощью программного обеспечения оценивали время нахождения крыс в открытых, закрытых рукавах и на центральной площадке, а также число свешиваний из открытых рукавов установки. Методика оценки тревожности в тесте ПКЛ основывается на боязни высоты грызунами и на рефлексе предпочтения темного пространства.

Все оборудование, используемое в эксперименте для оценки поведенческих реакций у крыс произведено фирмой PanLab (Испания).

2.5 Выведение животных из эксперимента и забор биологического материала

Животных выводили из эксперимента путем обескровливания под наркозом [58]. Кровь забирали с помощью закрытых систем для взятия крови S-Monovette® с активатором свертывания для получения сыворотки производства SARSTEDT (Германия) из правого желудочка сердца. Непосредственно после забора пробирки с кровью центрифугировали в течение 15 минут при ускорении 1000-1200 g (оборотов в минуту). Полученную сыворотку крови в объеме 500 мкл помещали в пробирки Эппендорфа с соответствующей маркировкой емкостью 1,5 мл. Пробы хранили при температуре -20° С для определения кортикостерона.

Сразу после забоя животного забирали участок толстой кишки с целью микробиологического и морфологического исследований [76].

2.6 Исследование состояния мукозной микробиоты

Исследование пристеночной микробиоты толстой кишки крыс осуществлялось согласно методике Кафарской Л.И. и Коршунова В.М. [3]. Участки толстой кишки, полученные при аутопсии, освобождались от химуса и взвешивались с соблюдением правил асептики. Затем аутоптат помещался в стерильный раствор фосфатного буфера (рН 7,0) из соотношения 1:10 и выдерживался в нем на протяжении 2 часов с целью разжижения муцина. После этого из полученного материала готовились мазки, окрашиваемые по Граму, и производилось разведение данного материала до концентраций 10^{-2} - 10^{-4} . По 0,1 мл каждого разведения полученной взвеси засекали «газоном» на поверхность плотных питательных сред: Эндо, SSA-агар, агар селективный для стрептококков, висмут-сульфит агар, ЦПХ-агар, лактоагар MRS, бифидоагар, желточно-солевой агар, Сабуро, после инкубировали в аэробных и анаэробных условиях при температуре 37°С. Качественное исследование

микробиоты (идентификацию бактерий) проводили с помощью масс-спектрометра Maldi Biotyper Microflex (Bruker, США).

Количество микроорганизмов в 1 грамме аутопсийного материала рассчитывали исходя из подсчета числа выросших колоний – колониобразующих единиц (КОЕ) при посеве из наибольшего разведения, где наблюдался рост 10 и более колоний, учитывая наряду с этим количество (объем) посевного материала. Для расчета использовали формулу: $K = E / k * v * n$, где K – колониобразующая единица, E – общее количество микроорганизмов, k – объем внесенного материала, v – число чашек Петри, n – разведение. Удельное содержание микроорганизмов вычисляли как количество микроорганизмов, выделенных из биологических проб, и выражали как $\lg$ КОЕ/г массы исследуемого материала [3, 68].

Частоту встречаемости идентифицируемого рода рассчитывали согласно формуле: $ЧВ = n_i \times 100 / N$, где n_i – количество животных с выявленным i -м родом микроорганизма, N – общее количество животных.

Расчет относительного среднего для каждого идентифицированного рода микроорганизмов производили по формуле: $ОСр = АСр_i \times 100 / N$, где $АСр_i$ – абсолютное среднее для i -го микроорганизма, N – число микроорганизмов в исследуемой популяции [54, 55].

2.7 Морфологическое исследование толстой кишки

Полученный при аутопсии биологический материал промывали 5% раствором нейтрального формалина и затем фиксировали в 10% растворе забуференного нейтрального формалина, после фиксации подвергали стандартной гистологической обработке (иссечение меньших кусочков тканей толстой кишки, их промывка и обезвоживание) с получением парафиновых срезов, толщиной 5-7 мкм. Срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, Шик-реакция с докраской альциановый синий [76].

Микроскопирование и микрофотосъемку гистологических препаратов осуществляли с помощью оптической системы, состоящей из микроскопа Leica CME и окуляр-камеры DCM – 510, на увеличениях x40, x100, x200 и x400 крат с документированием полученных снимков в программе FUTURE WINJOE, которая входила в комплект поставки окуляр-камеры.

На микрофотографиях изучали гистоархитектонику толстой кишки, глубину крипт, число бокаловидных клеток, наличие и выраженность некротических и воспалительных изменений.

Морфометрическое исследование осуществляли путем подсчета клеточного состава воспалительного инфильтрата. По кариологическим признакам проводили дифференцировку следующих клеток: нейтрофилы, лимфоциты, макрофаги, плазмоциты. Соотношение указанных представителей клеточной популяции, выраженное в процентах, рассчитывали после подсчета 100 клеток в нескольких непересекающихся полях зрения (10 и более).

Изучение степени дегрануляции (функциональной активности) тучных клеток определяли из расчета разных типов тучных клеток по классификации Линдера Д.П. и соавт. (1980), где:

- 1 – число недегранулирующих клеток (Т1);
- 2 – слабодегранулирующие тучные клетки, (Т2);
- 3 – клетки с умеренной степенью дегрануляции, (Т3);
- 4 – клетки с сильной степенью дегрануляции, (Т4).

2.8 Определение уровня кортикостерона в сыворотке крови крыс

Размораживание сыворотки проводили на водяной бане при температуре 37°C, повторное замораживание исследуемого материала не допускалось.

Определение уровня кортикостерона в сыворотке крови проводили методом ИФА с использованием тест-системы «Corticosterone ELISA Kit ADI-900-097» (Enzo, США) на иммуноферментном анализаторе «Lazurite»

(Dynex Technologies Inc.", США) в соответствии с протоколом производителя.

2.9 Статистическая обработка данных

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы «Statistica Trial» и пакета прикладных программ Microsoft Office Excel 2010. С целью проверки гипотезы о характере распределения исследуемых данных применяли тест Колмогорова–Смирнова. При подтверждении гипотезы о нормальном распределении: использовали параметрический непарный t–критерий Стьюдента, при отклонении гипотезы – непараметрический непарный U–критерий Манна–Уитни. Значимость полученных результатов оценивали с помощью дисперсионного анализа (one–way ANOVA и с применением критерия Крускала–Уоллиса) Характер корреляционных взаимосвязей между признаками устанавливали при помощи коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s). Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$ [76].

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 3

СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА И ПРИ ПРИМЕНЕНИИ АКТГ₄₋₇-PGR

3.1 Состояние микробиоты толстой кишки крыс при хроническом иммобилизационном стрессе в условиях применения АКТГ₄₋₇-PGR

Стрессоры различной природы приводят к повышению параклеточной проницаемости толстой кишки, предоставляя возможность бактериям пересекать барьер слизистой оболочки, активируя иммунный ответ, что оказывает негативное влияние на состояние толстокишечного микробиоценоза [57, 90, 136]. Исходя из этого актуальным представляется изучение корректирующих эффектов АКТГ₄₋₇-PGR на измененный состав микробиоты.

У стрессированных животных состояние пристеночной микробиоты характеризовалось уменьшением содержания облигатных микроорганизмов: количество лактобактерий снизилось в 1,3 раза ($p \leq 0,05$), бифидобактерий ($p \leq 0,01$) и кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью – в 1,4 раза ($p \leq 0,05$) в сравнении с контрольной группой, не подвергавшейся воздействию стрессора [68].

В условиях иммобилизационного стресса отмечался рост числа факультативных бактерий. Так, количество *E. coli* со сниженной ферментативной активностью возросло в 2,8 раза ($p \leq 0,05$), клебсиелл – в 8,4 раза ($p \leq 0,01$), морганелл – в 2,7 раза ($p \leq 0,05$), а протеев – в 3,8 раза по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$). В группе контрольных нестрессированных крыс не идентифицировались микроорганизмы родов *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter* и *Staphylococcus aureus*, у стрессированных животных данные бактерии обнаруживались в количестве lg КОЕ $1,24 \pm 0,52$,

1,37±0,48, 1,56±0,57 и 2,42±0,56 соответственно [68]. Содержание грибов рода *Candida* ($p \leq 0,05$) и коагулазоотрицательных стафилококков ($p \leq 0,01$) после стрессирования возросло в 2 раза. Число энтерококков уменьшилось в 2,4 раза ($p \leq 0,05$).

Применение пептида АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 5 мкг/кг приводило к снижению количества энтеробактеров в 5,4 раза ($p \leq 0,05$). Достоверных отличий среди других факультативных представителей микробиоценоза толстой кишки крыс не установлено. Минимальная используемая доза препарата также не приводила к изменению содержания облигатных бактерий [68].

Введение нейрпептида в дозе 50 мкг/кг приводило к росту числа бактерий родов *Bifidobacterium* в 1,3 раза ($p \leq 0,05$) и *Lactobacillus* – в 1,2 раза ($p \leq 0,05$). Содержание *E. coli* с нормальной ферментативной активностью после применения АКТГ₄₋₇-PGP возросло в 1,3 раза ($p \leq 0,05$), в то время как количество кишечных палочек со сниженной ферментативной активностью снизилось в 2,7 раза ($p \leq 0,05$). Отмечалось достоверное уменьшение числа условно-патогенных микроорганизмов: количество морганелл уменьшилось в 2,8 раза ($p \leq 0,05$), цитробактеров – в 7,2 раза ($p \leq 0,05$). Также происходило снижение количества грибов рода *Candida* и стафилококков. Микроорганизмы, идентифицируемые как *Staphylococcus aureus* обнаруживались в опытной группе в количестве lg КОЕ 0,58±0,40. Содержание коагулазоотрицательных стафилококков уменьшилось с 4,36±0,17 до 2,75±0,68, а число грибов рода *Candida* снизилось с 3,56±0,46 до 1,67±0,58 lg КОЕ. Кроме того, увеличилось количество энтерококков в 2 раза ($p \leq 0,05$). Статистически значимых различий определяемого показателя для других представителей микробиоценоза толстой кишки (*Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp.) не зафиксировано [68].

Таблица 1 – Количественный состав мукозной микробиоты кишечника крыс при ХИС и введении пептида АКГГ₄₋₇-PGP (lgKOE/г, M±m)

Выделенные микроорганизмы \ Группа	Контроль без стресса n=10	Животные, подвергшиеся хроническому иммобилизационному стрессу				
		Контроль n=10	Введение АКГГ ₄₋₇ -PGP в дозе (мкг/кг)			
			5 n=10	50 n=10	150 n=10	450 n=10
Lactobacillus spp.	13,41±1,12	10,54±0,48 ^x	12,10±0,82	12,67±0,79*	12,81±0,67*	12,20±0,94
Bifidobacterium spp.	13,16±0,66	9,70±0,76 ^{xx}	11,04±0,92	12,84±1,58*	12,61±1,08*	11,79±0,76
E.coli с нормальной ферментативной активностью	5,24±0,39	3,86±0,34 ^x	4,30±0,41	5,03±0,45*	5,26±0,57*	3,98±0,42
E.coli со сниженной ферментативной активностью	1,08±0,56	3,05±0,68 ^x	2,69±0,69	1,12±0,47*	1,73±0,6*	2,15±0,56
Enterobacter spp.	0	1,56±0,57 ^x	0,29±0,20*	0,30±0,20	0,21±0,21*	1,29±0,46
Citrobacter spp.	0	1,37±0,48 ^x	1,79±0,50	0,19±0,19*	0,21±0,21*	0,24±0,24*
Proteus spp.	0,57±0,38	2,17±0,62 ^x	2,79±0,65	0,67±0,36	1,65±0,57	2,87±0,56
Klebsiella spp.	0,39±0,27	3,27±0,61 ^{xx}	4,21±0,52	4,08±0,54	2,85±0,83	3,40±0,65

Morganella spp.	1,02±0,53	2,77±0,63 ^x	2,08±0,71	0,98±0,52*	1,09±0,46*	3,09±0,71
Acinetobacter spp.	0	1,24±0,52 ^x	1,36±0,58	0	0,12±0,12*	2,26±0,66
Enterococcus spp.	2,30±0,31	0,96±0,40 ^x	1,11±0,39	2,18±0,35*	2,66±0,18**	1,40±0,33
Staphylococcus (коагулазоотрицатель ные)	2,15±0,61	4,36±0,17 ^{xx}	2,92±0,68	2,75±0,68*	2,39±0,85*	3,38±0,59
Staphylococcus aureus	0	2,42±0,56 ^{xx}	1,89±0,65	0,58±0,40*	0,79±0,41*	2,74±0,65
Candida spp.	1,81±0,51	3,56±0,46 ^x	3,04±0,54	1,67±0,58*	1,93±0,61*	2,72±0,65

*Примечание: ^x- $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой нестрессированных крыс, ^{xx}- $p \leq 0,01$ по сравнению с контрольной группой нестрессированных крыс, * - $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой стрессированных крыс, ** - $p \leq 0,01$ по сравнению с контрольной группой стрессированных крыс.*

После использования АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 150 мкг/кг происходило увеличение содержания облигатных представителей толстокишечного микробиоценоза. Число лактобактерий возросло в 1,2 раза ($p \leq 0,05$), бифидобактерий – в 1,3 раза ($p \leq 0,05$), а кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью – в 1,4 раза ($p \leq 0,05$) в сравнении с контрольной группой стрессированных крыс. Количество кишечных палочек со сниженной ферментативной активностью уменьшилось с $3,05 \pm 0,68$ до $1,73 \pm 0,6$ lg КОЕ. Также отмечалось снижение содержания бактерий родов *Acinetobacter* в 10,3 раза ($p \leq 0,05$), *Enterobacter* – в 7,4 раза ($p \leq 0,05$), *Citrobacter* – в 6,5 раза ($p \leq 0,05$), *Morganella* – в 2,5 раза ($p \leq 0,05$). Количество коагулазоотрицательных стафилококков снижалось с $4,36 \pm 0,17$ до $2,39 \pm 0,85$, золотистых стафилококков – с $2,42 \pm 0,56$ до $0,79 \pm 0,41$, грибов рода *Candida* – с $3,56 \pm 0,46$ до $0,79 \pm 0,41$ lg КОЕ. Достоверных различий определяемого показателя для клебсиелл и протеев не зарегистрировано. Число энтерококков в опытной группе возросло в 2,8 в сравнении со стрессированным контролем ($p \leq 0,01$) [68].

За счет применения АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 450 мкг/кг статистически значимого увеличения количества облигатных представителей микробиоценоза не происходило. Так, lg КОЕ бифидобактерий составил $11,79 \pm 0,76$, лактобактерий $12,20 \pm 0,94$, кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью $3,98 \pm 0,42$. Введение наибольшей дозировки нейропептида приводило к достоверному уменьшению числа бактерий рода *Citrobacter* в 7,5 раза ($p \leq 0,05$). Не зафиксировано достоверное изменение содержания других условно-патогенных представителей микробиоты [68].

В результате изучения частоты встречаемости вышеуказанных микроорганизмов установлено, что в условиях хронического иммобилизационного стресса не происходило изменения данного показателя для облигатных представителей микробиоценоза толстой кишки. Лактобактерии, бифидобактерии, и кишечные палочки с нормальной ферментативной активностью встречались в 100% случаев [54].

Статистически значимые различия в частоте встречаемости регистрировались для факультативных бактерий. В результате стрессирования частота встречаемости протеев, морганелл, коагулазоотрицательных стафилококков и кишечных палочек со сниженной ферментативной активностью увеличилась на 40% ($p \leq 0,05$), клебсиелл – на 60% ($p \leq 0,05$). Иммобилизация экспериментальных животных приводила к появлению ранее не регистрируемых микроорганизмов у нестрессированных крыс. Так, частота встречаемости *Staphylococcus aureus* составила 70% ($p \leq 0,05$), бактерий родов *Acinetobacter* – 40% ($p \leq 0,05$), *Citrobacter* – 50% ($p \leq 0,05$), *Enterobacter* – 50% ($p \leq 0,05$). Достоверных отличий в определяемом показателе для грибов рода *Candida* не обнаружено, при этом частота их встречаемости в контрольной стрессированной группе увеличилась на 30% ($p \leq 0,05$). Стресс индуцировал снижение исследуемого показателя энтерококков на 50% ($p \leq 0,05$) [54].

Использование АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 5 мкг/кг не влияло на частоту встречаемости как облигатных, так и факультативных представителей толстокишечного микробиоценоза. Исключение представляют коагулазоотрицательные стафилококки, частота их встречаемости уменьшилась на 30% ($p \leq 0,05$) [54].

При введении пептида в дозе 50 мкг/кг происходило снижение значений определяемого показателя на 50% ($p \leq 0,05$) для *Staphylococcus aureus*, на 40% ($p \leq 0,05$) для цитробактера и грибов рода *Candida* и на 30% ($p \leq 0,05$) для коагулазоотрицательных стафилококков. В опытной группе не идентифицировался *Acinetobacter* spp., обнаруживаемый у стрессированного контроля. Энтерококки встречались на 50% чаще ($p \leq 0,05$).

Применение АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 150 мкг/кг приводило к снижению частоты встречаемости коагулазоотрицательных стафилококков, микроорганизмов родов *Citrobacter* и *Enterobacter*. Числовое значение исследуемого показателя составило 50%, 10% и 10% соответственно ($p \leq 0,05$). Частота встречаемости *Enterococcus* spp. возросла на 60% ($p \leq 0,05$).

Таблица 2 – Частота встречаемости представителей пристеночной микробиоты кишечника крыс при ХИС и введении АКТГ₄₋₇-PGP (%; $p \pm m_p$)

Выделенные микроорганизмы	Контроль без стресса n=10	Животные, подвергшиеся хроническому иммобилизационному стрессу				
		Контроль n=10	Введение АКТГ ₄₋₇ -PGP в дозе			
			5мкг/кг n=10	50мкг/кг n=10	150мкг/кг n=10	450 мкг/кг n=10
Lactobacillus spp.	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00
Bifidobacterium spp.	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00
E.coli с нормальной ферментативной активностью	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00
E.coli со сниженной ферментативной активностью	30±14,49	70±14,49	70±14,49	40±15,49	50±15,81	70±14,49
Enterobacter spp.	0±0,00	50±15,81 _x	20±12,65	20±12,65	10±9,49*	40±15,49
Citrobacter spp.	0±0,00	50±15,81 _x	60±15,49	10±9,49*	10±9,49*	10±9,49*
Proteus spp.	20±12,65	60±15,49 _x	70±14,49	30±14,49	50±15,81	80±12,65
Klebsiella spp.	20±12,65	80±12,65 _x	90±9,49	90±9,49	60±15,49	80±12,65
Morganella spp.	30±14,49	70±14,49 _x	50±15,81	30±14,49	40±15,49	70±14,49
Acinetobacter spp.	0±0,00	40±15,49 _x	40±15,49	0±0,00*	10±9,49	60±15,49
Enterococcus spp.	90±9,49	40±15,49 _x	50±15,81	90±9,49*	100±0,00*	70±15,49
Staphylococcus (коагулазоотрицательные)	60±15,49	100±0,00 _x	70±14,49*	70±14,49*	50±15,81*	80±12,65
Staphylococcus aureus	0±0,00	70±14,49 _x	50±15,81	20±14,49*	30±14,49	70±14,49
Candida spp.	60±15,49	90±9,48	80±12,65	50±15,81*	60±15,49	70±14,49

Примечание: _x - $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой нестрессированных крыс, * - $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой стрессированных крыс.

В результате использования препарата в дозе 450 мкг/кг не происходило достоверных изменений значений определяемого показателя для представителей микробиоценоза толстой кишки. За исключением микроорганизмов рода *Citrobacter*, частота их встречаемости уменьшилась на 40% ($p \leq 0,05$).

При анализе относительного среднего, следует отметить, что преобладающую долю в популяции составляли лактобактерии и бифидобактерии во всех экспериментальных группах. Хронический иммобилизационный стресс приводил к значительному снижению исследуемого показателя для *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *E.coli* с нормальной ферментативной активностью. Доля *E. coli* со сниженной ферментативной активностью возросла в 2,3 раза.

Снижение относительного среднего облигатных бактерий в условиях иммобилизационного стресса приводило к увеличению доли некоторых условно-патогенных микроорганизмов: клебсиелл в 6,8 раза, морганелл в 2,2 раза, протеев в 3,1 раза, коагулазоотрицательных стафилококков и кандид в 1,6 раза. В контрольной группе отмечалось выявление микроорганизмов, не идентифицированных у нестрессированных крыс, относящихся к родам *Acinetobacter*, *Citrobacter* и *Enterobacter*, а также золотистого стафилококка.

Применение пептида в дозе 5 мкг/кг не приводило к существенным изменениям структуры микробиоценоза толстой кишки крыс по сравнению со стрессированным контролем [54, 68].

Наибольший эффект определялся при использовании АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 50 мкг/кг, при этом числовые значения относительного среднего максимально приближались к значениям данного показателя у контрольных нестрессированных крыс, не испытывающих стрессирование.

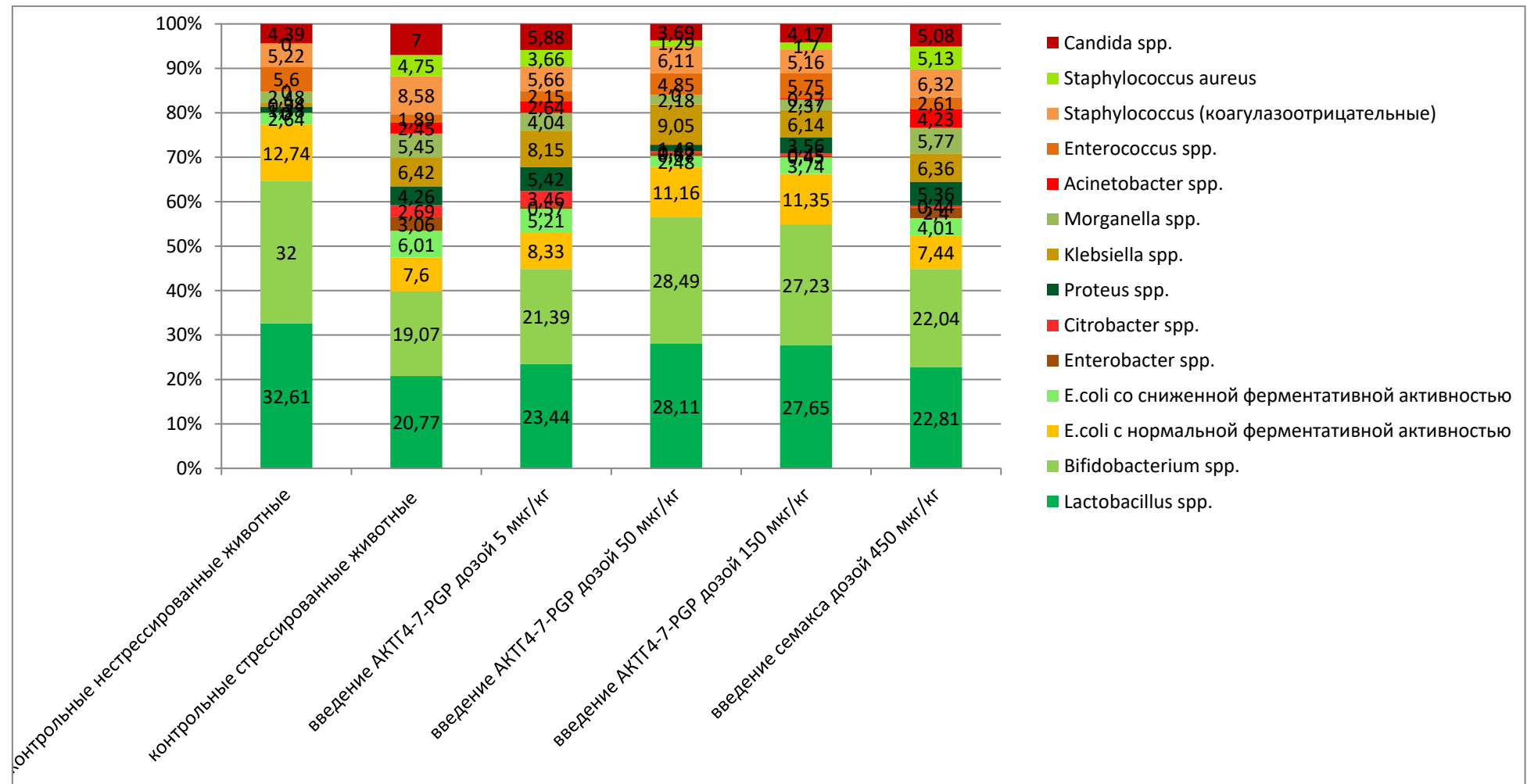


Рисунок 1 – Относительное среднее (доля) каждого идентифицированного вида микроорганизмов микробиоты толстой кишки при хроническом иммобилизационном стрессе и при применении АКТГ₄₋₇-PGP, %

За счет введения АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 150 мкг/кг доля условно-патогенных микроорганизмов значительно сократилась вследствие роста относительного среднего облигатных представителей толстокишечного микробиоценоза, однако, не достигая соответствующих значений исследуемого показателя нестрессированных животных.

При применении пептида в дозе 450 мкг/кг значимых отличий в структуре микробиоценоза толстой кишки крыс в сравнении с стрессированным контролем не установлено.

3.2 Изменения морфофункционального состояния толстой кишки в условиях хронического иммобилизационного стресса и при применении АКТГ₄₋₇-PGP

Процесс адаптации к стрессорному воздействию в организме осуществляется на всех уровнях биологической организации, в том числе на клеточном и тканевом [78, 121, 122]. При этом достаточно подробно изучены морфофункциональные изменения сердечно-сосудистой, нервной, дыхательной и эндокринной систем в условиях острого и хронического стресса [78, 123, 132, 210, 217]. Однако состояние толстой кишки в условиях стресса остается актуальным и недостаточно изученным вопросом.

По результатам исследования аутопсийного материала нестрессированных контрольных животных морфометрических изменений не было обнаружено (таблица 3, рисунок 2). Толстая кишка, состоящая из слизистой, мышечной и серозной оболочек, имеет нормальное строение. Эпителиальный слой, который покрывает слизистую оболочку толстой кишки, представлен однослойным призматическим эпителием, отмечается очаговая пролиферативная активность. Эпителиоциты столбчатой формы высокие, наблюдается значительное количество бокаловидных клеток в поле зрения, разделенных тонкой соединительнотканной стромой. Собственная пластинка слизистой оболочки построена из строгоориентированных коллагеновых волокон между криптами. Крипты имеют слегка буловидную

форму. Бокаловидные клетки строго ориентированы слабооксифильны определяются в обильном количестве.

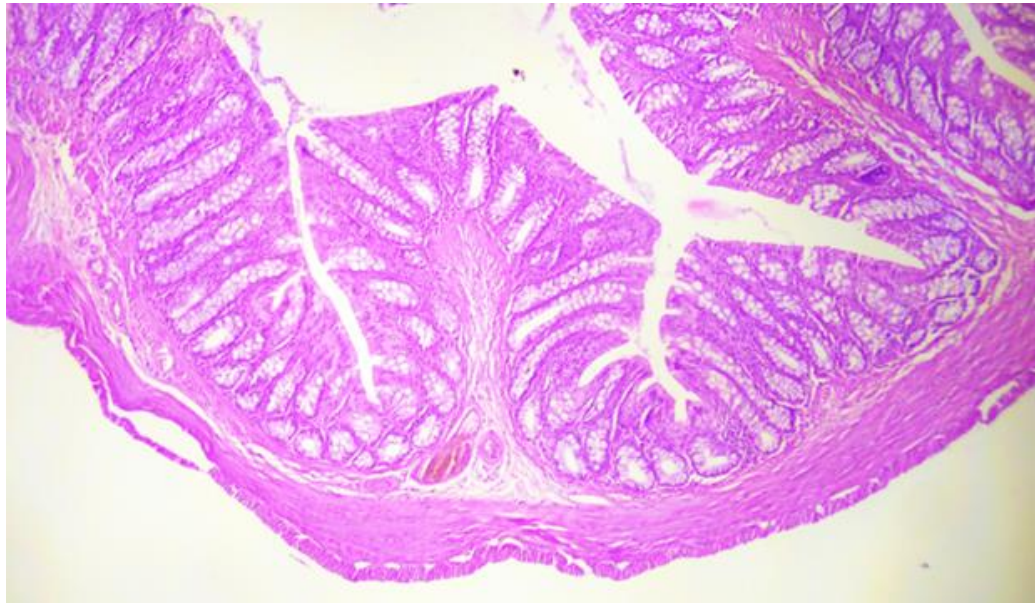


Рисунок 2 – Микрофотография стенки толстой кишки контрольных нестрессированных крыс. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.: х40.

В тучноклеточной популяции преобладают клетки 2 и 3 типов [73]. Мышечная пластинка слизистой развита интенсивно и состоит из двух слоев. При этом в наружном (продольном) слое мышечные клетки располагаются более рыхло по сравнению с внутренним (циркулярным) слоем. В подслизистом слое отмечается очаговая лимфоцитарная инфильтрация. Клеточный состав представлен нейтрофилами, лимфоцитами, макрофагами и плазмócитами. Мышечная оболочка без изменений сформирована гладкомышечной тканью. Наружный продольный слой собран в виде трех лент, между которыми определяется незначительное количество пучков гладких миоцитов, пучки внутреннего слоя мышечной оболочки располагаются циркулярно. Между слоями мышечной оболочки находится рыхлая волокнистая соединительная ткань с единичными лимфатическими и кровеносными сосудами и межмышечным нервным сплетением [73]. Кишка покрыта однослойным плоским эпителием – мезотелием без особенностей.

В результате воздействия иммобилизационного стресса в стенке толстой кишки наблюдаются отчетливо выраженные воспалительные явления, сочетающиеся с дистрофическими, дисциркуляторными и дезорганизационными расстройствами (рисунок 3). Отмечаются зоны поверхностного некроза с деструкцией и десквамацией призматического эпителия.

Глубина крипт резко уменьшена (на 18,6%, $p \leq 0,01$) в сравнении с нестрессированными животными, вероятно, за счет отека (таблица 3 и рисунок 4). Собственная пластинка слизистой инфильтрирована лимфоцитами с примесью сегментоядерных лейкоцитов, явление интерстициального отека. Количество бокаловидных клеток уменьшается на 12,9% ($p \leq 0,01$) на единицу площади в сравнении с нестрессированным контролем. Клеточный состав значительно изменен, при этом количество лимфоцитов увеличилось в 1,9 раза ($p \leq 0,01$), макрофагов – в 3,1 раза ($p \leq 0,01$), нейтрофилов – в 4,6 раза ($p \leq 0,01$) по сравнению с контролем. Отмечается очаговое фолликулярное скопление и активная пролиферация клеток воспалительного ряда, распространяющееся на всю толщу стенки кишки. При этом количество тучных клеток резко возрастает [74].

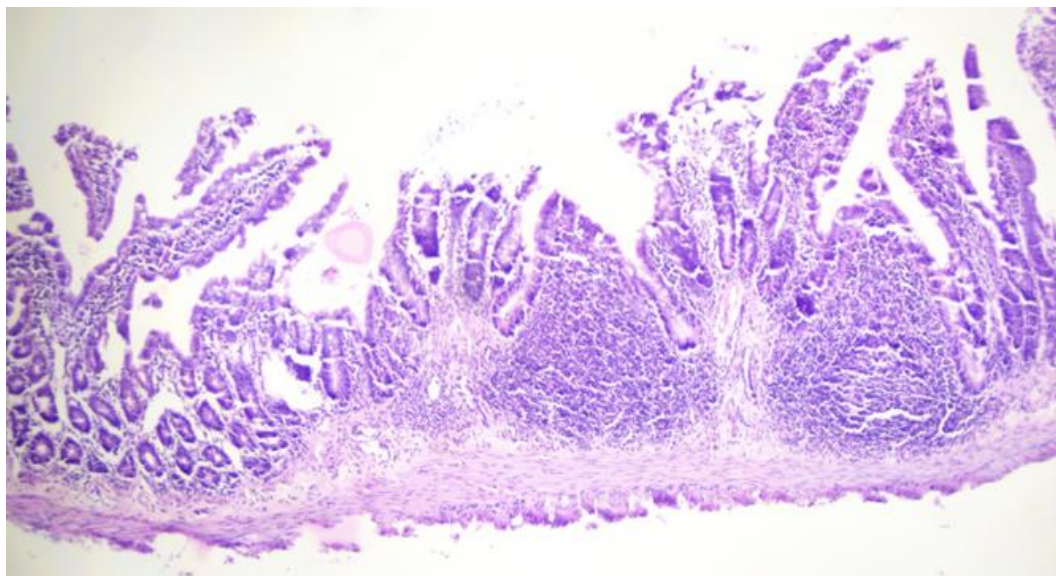


Рисунок 3 – Микрофотография стенки толстой кишки контрольных стрессированных крыс. Нарушение гистоархитектоники стенки. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.: х40.

При исследовании аутопсийного материала, полученного от животных, которым вводили АКТГ₄₋₇-PGR в дозе 5 мкг/кг в условиях хронического иммобилизационного стресса, восстановления гистоархитектоники толстой кишки не наблюдается. Отмечается десквамация поверхностного эпителия с сохранением отека собственно слизистого и подслизистого слоев. Крипты относительно сглажены, достоверных изменений их глубины не обнаружено. Наблюдается дистрофия желез. Бокаловидные клетки со скудной цитоплазмой. Количество их в поле зрения приближается к значениям стрессированного контроля. Морфометрическое исследование показало преобладание клеток воспалительного ряда - лимфоцитов и нейтрофилов (таблица 3 и рисунок 5) [74].

При введении АКТГ₄₋₇-PGR в дозе 50 мкг/кг в тканях толстой кишки происходит уменьшение признаков воспаления и восстановление ее архитектоники (таблица 3 и рисунок 6). Отмечается очаговая сглаженность поверхностного рельефа. Происходит углубление крипт на 5,1% ($p \leq 0,01$) в сравнении с контрольной группой стрессированных животных. Незначительный отек сохраняется только в нижележащих отделах. Отмечается повышенная пролиферация шеечного эпителия. Число бокаловидных клеток достоверно возрастает на 6,3% ($p \leq 0,05$) в сравнении с группой контрольных стрессированных крыс и достигает в числовом значении 62,2. В подслизистой отмечается склероз и умеренно выраженная лимфоклеточная инфильтрация [74].

Таблица 3 – Морфометрические показатели толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса и при применении АКТГ₄₋₇-PGP (M±m)

Показатель \ Группа	Контроль без стресса n=10	Животные, подвергшиеся хроническому иммобилизационному стрессу				
		Контроль n=10	Введение АКТГ ₄₋₇ -PGP в дозе			
			5 мкг/кг n=10	50 мкг/кг n=10	150 мкг/кг n=10	450 мкг/кг n=10
Глубина крипт (мкм)	174,9±0,78	142,4±1,93 ^{xx}	143,6±3,2	149,7±1,62 ^{**}	151,2±1,41 ^{**}	157,1±3,53 ^{**}
Бокаловидные клетки	67,2±1,77	58,5±1,12 ^{xx}	61±2,39	62,2±1,21 [*]	63,66±1,63 [*]	75±1,38 ^{**}
Тучные клетки 1 типа	5±0,32	19,6±0,48 ^{xx}	22,7±0,83 [*]	11,2±0,5 ^{**}	7,7±0,37 ^{**}	8,8±0,59 ^{**}
Тучные клетки 2 типа	5,9±0,21	14,5±0,51 ^{xx}	13,9±0,64	10,7±0,46 ^{**}	7,9±0,42 ^{**}	8±0,44 ^{**}
Тучные клетки 3 типа	5,5±0,33	17,1±0,62 ^{xx}	15,6±0,59	14,8±0,61 [*]	11,6±0,5 ^{**}	8,6±0,56 ^{**}
Тучные клетки 4 типа	4,9±0,26	13,4±0,47 ^{xx}	13,4±0,64	15,3±0,43 ^{**}	11,2±0,51 ^{**}	10,3±0,72 ^{**}
Нейтрофилы (%)	1,6±0,14	7,3±0,52 ^{xx}	6,1±0,59	3,6±0,29 ^{**}	3,3±0,2 ^{**}	3,3±0,27 ^{**}
Лимфоциты (%)	19,4±0,53	36,9±0,82 ^{xx}	33,1±0,99 [*]	24,6±0,78 ^{**}	24,7±0,91 ^{**}	24,1±0,81 ^{**}
Макрофаги (%)	4±0,34	12,5±0,72 ^{xx}	10,7±0,54	14,6±0,49 [*]	15,5±0,77 [*]	17,1±0,65 ^{**}
Плазмциты (%)	10,2±0,37	14,4±0,81 ^{xx}	12,3±0,56 [*]	12±0,56 [*]	12,8±0,93	18,3±1,16 ^{**}

Примечание: ^x- $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой нестрессированных крыс, ^{xx}- $p \leq 0,01$ по сравнению с контрольной группой нестрессированных крыс, ^{*} - $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой стрессированных крыс, ^{**} - $p \leq 0,01$ по сравнению с контрольной группой стрессированных крыс.

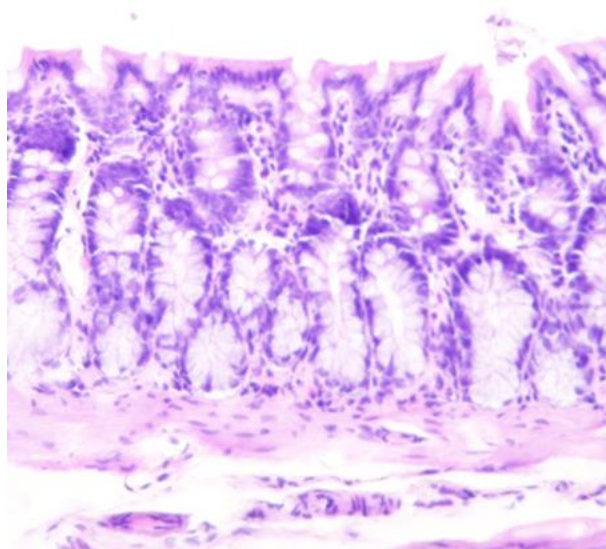


Рисунок 4 – Микрофотография стенки толстой кишки контрольных стрессированных крыс. Некроз и десквамация в просвете клеток поверхностного эпителия, отек и лейкоцитарная инфильтрация собственной пластинки слизистой. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.: x400.

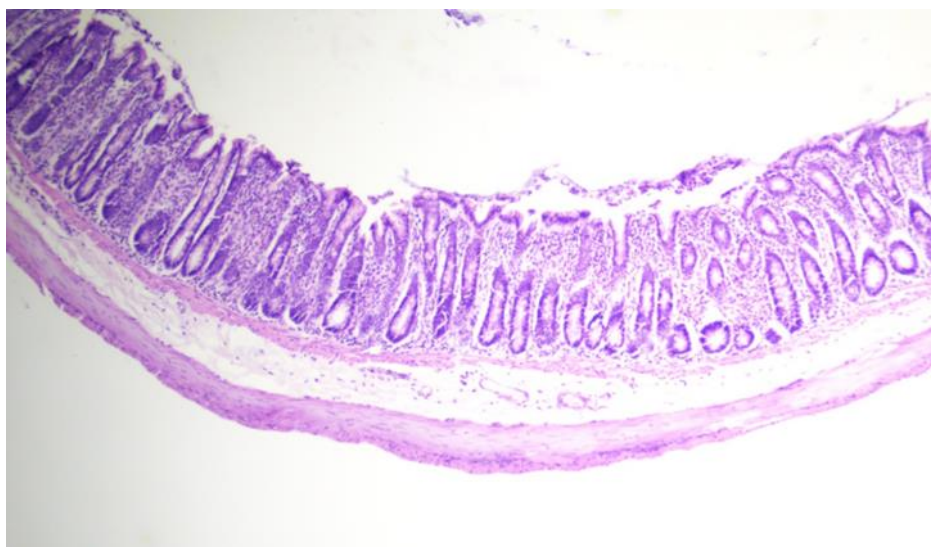


Рисунок 5 – Микрофотография стенки толстой кишки при введении АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 5 мкг/кг. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.: x400.

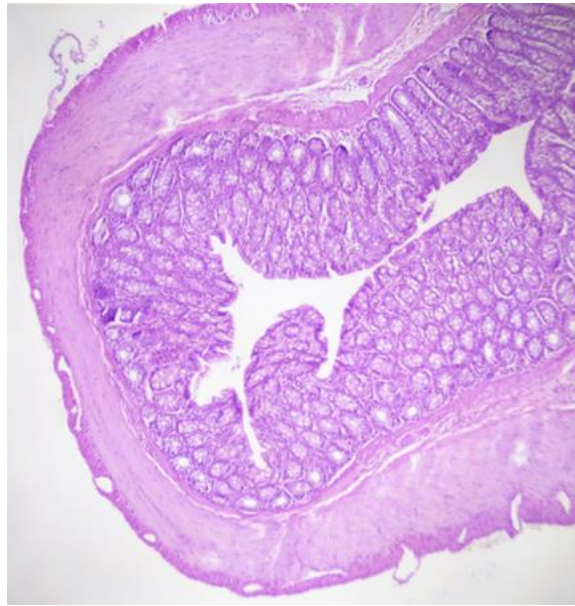


Рисунок – 6. Микрофотография стенки толстой кишки при введении АКТГ₄₋₇-PGR в дозе 50 мкг/кг. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.: х40.

В гистологических препаратах животных, получавших АКТГ₄₋₇-PGR в дозе 150 мкг/кг, отмечаются явления восстановления архитектоники стенки кишки. Происходит достоверное углубление крипт по сравнению с экспериментальной контрольной стрессированной группой на 6,3% ($p \leq 0,01$), а также их расширение по фовеолярному типу. Число бокаловидных клеток значительно возрастает на 8,9% ($p \leq 0,05$) в сравнении со стрессированными крысами (таблица 3). Признаков отека нет. Обнаруживается склероз и слабо выраженная лимфоцитарная инфильтрация в собственной пластинке слизистой и подслизистой. Продолжает сохраняться повышенная пролиферация клеток шейного эпителия (рисунки 7 и 8). Достоверно снижается количество всех типов (в зависимости от функциональной активности) тучных клеток по сравнению со стрессированным контролем.

В результате применения нейропептида в дозе 450 мкг/кг в слизистой оболочке толстой кишки дегенеративных или атрофических изменений не выявлено [74]. На фоне общего стихания воспалительных процессов отмечаются участки со сглаженной слизистой и наряду с этим зоны аденоматозной пролиферации (рисунки 9 и 10). Глубина крипт при этом увеличилась на 10,3% ($p \leq 0,01$), что является наибольшим показателем среди

всех подопытных групп, получавших пептид. Наблюдается увеличение числа не только отдельных бокаловидных клеток, но и общего числа желез. Увеличивается высота кубического эпителия. Отмечается базальная активность поверхностного эпителия. Количество бокаловидных клеток со слабоокисильной цитоплазмой на стандартную площадь среза возросло на 28,2% ($p \leq 0,01$) [73]. По данным морфометрического исследования достоверно преобладание клеток моноцитарного ряда. Вызывает значительный интерес увеличение числа плазмоцитов на 27,1% ($p \leq 0,01$) по сравнению группой стрессированного контроля (таблица 3). Следует отметить, что степень увеличения количества бокаловидных клеток и плазмоцитов в данной группе также является наибольшей среди всех использованных доз пептида. При этом возрастает толщина стенки кишки за счет диффузного разрастания коллагеновых волокон и их склерозирования.

Таким образом, на основании полученных данных можно полагать, что основными проявлениями стрессорной реакции в толстой кишке являлись показатели воспаления и атрофии, увеличение числа и активности тучных клеток. Применение АКТГ-4-7-PGP нивелировало стресс-индуцированные патоморфологические изменения толстой кишки за счет увеличения скорости адаптации, снижения числа воспалительных клеточных элементов и изменения активности тучных клеток [74]. При этом эффекты пептида имели дозозависимый характер.



Рисунок 7 – Микрофотография стенки толстой кишки при введении АКТГ₄₋₇-РGR в дозе 150 мкг/кг. Увеличение количество бокаловидных клеток. Неоднородность окраски их цитоплазмы. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.: x40

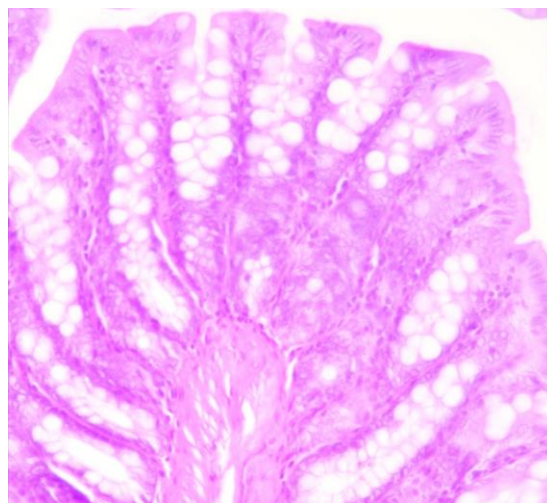


Рисунок 8 – Микрофотография стенки толстой кишки при введении АКТГ₄₋₇-РGR в дозе 150 мкг/кг. Увеличение количество бокаловидных клеток. Проплиферация клеток шеечного эпителия. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.: x400



Рисунок 9 – Микрофотография стенки толстой кишки при введении АКТГ₄₋₇-РGR в дозе 450 мкг/кг. Проплиферация слизистой по аденоматозному типу. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.: x40

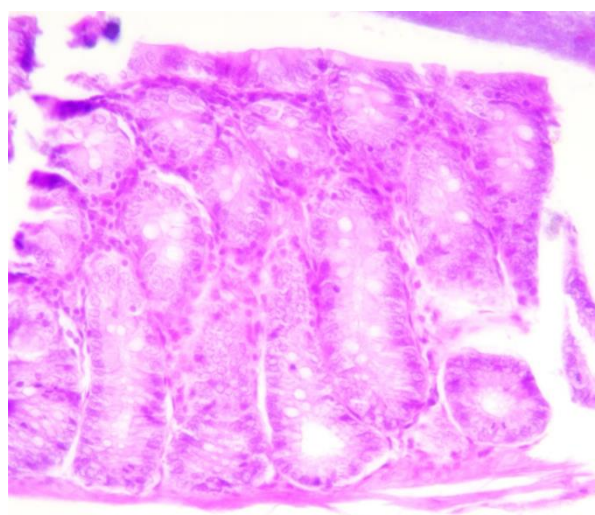


Рисунок 10 – Микрофотография стенки толстой кишки при введении АКТГ₄₋₇-РGR в дозе 450 мкг/кг. Проплиферация собственных желез и поверхностного эпителия. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.: x400

ГЛАВА 4

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И СОДЕРЖАНИЕ КОРТИКОСТЕРОНА В КРОВИ У КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА И ПРИ ПРИМЕНЕНИИ АКТГ₄₋₇-RGP

4.1 Влияние хронического иммобилизационного стресса и применения АКТГ₄₋₇-RGP на поведенческие реакции крыс в тесте «открытое поле»

В настоящее время в исследованиях по оценке функционального состояния нервной системы с использованием поведенческих методик одним из наиболее часто используемых и объективных является тест «открытое поле». Данная методика позволяет комплексно оценить психофизиологический статус животного путем исследования ориентировочно-исследовательской и локомоторной активности, эмоциональности, тревожности и ряда других показателей, что обусловило ее широкое применение в фармакологии, патофизиологии и физиологии для выявления эффектов биологически активных веществ и препаратов, а также для оценки эффективности коррекции ими различных патологических процессов в организме животных [51, 55, 72, 225].

Широкий спектр получаемых в открытом поле показателей в условиях видеорегистрации поведения животных с последующей программной обработкой полученных данных определяет их интегративный характер и способствует объективной оценке важных психофизиологических индикаторов функционального состояния нервной системы. Учитывая предполагаемый характер стрессиндуцированных изменений функционального состояния нервной системы у крыс, использование в нашей работе данного теста представлялось целесообразным и обоснованным.

Изучение поведения животных в открытом поле позволило установить, что между контрольной и опытными группами до начала эксперимента статистически достоверных различий исследованных показателей не наблюдалось (таблица 4). Данный факт свидетельствует об одинаковых исходных условиях в группах животных, что является важным условием для адекватного анализа полученных экспериментальных данных.

Таблица 4 – Исходные уровни поведенческой активности крыс в открытом поле (Me (Q1-Q3))

Группа Показатель	Контроль без стресса n=10	Животные, подвергшиеся хроническому иммобилизационному стрессу				
		Контроль n=10	Введение АКТГ ₄₋₇ -PGP в дозе			
			5 мкг/кг n=10	50 мкг/кг n=10	150 мкг/кг n=10	450 мкг/кг n=10
Центральные квадраты						
Число пересеченных квадратов	2,5 (0; 4)	1 (0; 6)	1,5 (0; 3)	2 (1; 3)	1,5 (0; 6)	2,5 (0; 4)
Время, проведенное в центральных квадратах	1,1 (0; 2,5)	0,39 (0; 1,43)	0,34 (0; 0,67)	2,18 (0,7; 3,07)	2,25 (0; 3,04)	1,21 (0; 3,26)
Пройденная дистанция	32,62 (0; 73,76)	13,02 (0; 97,03)	11,88 (0; 33,37)	47,5 (23,29; 62,11)	54,38 (0; 142,13)	48,61 (0; 98,48)
Число вставаний	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
Периферические квадраты						
Число пересеченных квадратов	25,5 (20; 34)	24,5 (15; 33)	17 (10; 23)	35 (25; 42)	32,5 (27; 42)	30,5 (17; 45)
Время, проведенное в периферических квадратах	298,9 (297,5; 300)	299,62 (298,57; 300)	299,67 (299,33; 300)	297,83 (296,93; 299,3)	297,76 (296,96; 300)	298,8 (296,74; 300)
Пройденная дистанция	678,01 (427,25; 876,37)	569,96 (467,43; 772,91)	480,54 (268; 864,42)	873,57 (580,07; 1113,68)	705,6 (660,58; 995,13)	741,48 (445,56; 1044,6)
Число вставаний	4 (3; 5)	6 (4; 8)	4 (3; 7)	5,5 (4; 7)	4 (2; 8)	5 (4; 10)
Общие показатели						
Пройденная	717,94	661,85	480,54	900,97	745,7	827,53

дистанция	(442,08; 890,63)	(467,43; 905,08)	(278,93; 677,09)	(603,36; 1163,34)	(681,26; 1090,65)	(493,91; 1093,46)
Число вставаний	4 (3; 5)	6 (4; 8)	4 (3; 7)	5,5 (4; 7)	4 (2; 8)	6 (4; 10)
Количество болюсов	0,5 (0; 4)	2 (1; 3)	2 (1; 3)	2 (1; 3)	4 (2; 6)	1,5 (0; 3)
Количество уринаций	0 (0; 1)	1 (0; 1)	1 (0; 1)	1 (0; 1)	1 (1; 1)	0,5 (0; 1)
Число актов короткого груминга	2 (1; 3)	1 (1; 2)	1 (0; 2)	1 (0; 1)	2 (0; 2)	1 (0; 1)

Как видно из таблицы 5, хронический иммобилизационный стресс оказывал существенное влияние на поведение животных. Так, сравнение контрольных групп нестрессированных и стрессированных крыс позволило установить в условиях стресса достоверное увеличение горизонтальной двигательной активности в виде увеличения числа пересеченных центральных квадратов и дистанции, пройденной в них, а также времени, проведенного животными в центральных и периферических квадратах. При этом показатели вертикальной исследовательской активности достоверных различий не достигали. Кроме того, стрессорное воздействие способствовало усилению эмоциональности, о чем свидетельствует достоверное увеличение количества уринаций, а также тенденция к увеличению числа фекальных болюсов. Статистически значимое возрастание количество актов короткого груминга у стрессированных крыс контрольной группы может указывать на повышение у них уровня тревожности.

Таблица 5 – Влияние ХИС и пептида АКТГ₄₋₇-PGP на поведенческие показатели стрессированных крыс в открытом поле (Me (Q1-Q3))

Группа Показатель	Контроль без стресса n=10	Животные, подвергшиеся хроническому иммобилизационному стрессу				
		Контроль n=10	Введение АКТГ ₄₋₇ -PGP в дозе			
			5 мкг/кг n=10	50 мкг/кг n=10	150 мкг/кг n=10	450 мкг/кг n=10
Центральные квадраты						
Число пересеченных	0 (0; 1)	2 ^x (1; 2)	0,5 (0; 2)	1 (0; 4)	0* (0; 2)	0,5 (0; 2)

квадратов						
Время, проведенное в центральных квадратах	0 (0; 0,37)	0,7 ^x (0,6; 1,55)	0,24 (0; 0,64)	0,28 (0; 2,91)	0 (0; 1,17)	0,15 (0; 0,94)
Пройденная дистанция	0 (0; 15,9)	27,08 ^x (2,26; 45,85)	4 (0; 35,66)	10,09 (0; 77,62)	0 (0; 49,6)	6,62 (0; 28,91)
Число вставаний	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
Периферические квадраты						
Число пересеченных квадратов	20 (15; 27)	28,5 (17; 44)	21 (12; 28)	22,5 (17; 38)	29,5 (24; 39)	28,5 (19; 53)
Время, проведенное в периферических квадратах	300 (299,63; 300)	299,31 ^x (298,45; 299, 94)	299,77 (299,36; 300)	299,73 (297,1; 300)	300 (298,83; 300)	299,85 (299,06; 300)
Пройденная дистанция	507,38 (417,68; 694,21)	735,81 (412,34; 1017,08)	493,67 (312,55; 709,77)	589,63 (454, 48; 947,76)	712,32 (600,66; 1039,98)	690,31 (571,55; 1134,17)
Число вставаний	3 (2; 4)	5 (2; 9)	2,5 (2; 6)	2 (1; 4)	4,5 (2; 6)	5 (3; 9)
Общие показатели						
Пройденная дистанция	507,38 (417,68; 739,49)	770,9 (412,34; 1061,81)	518,99 (312,55; 717,77)	615,12 (454,48; 1051,44)	756,67 (610,64; 1039,98)	706,98 (599,55; 1282,68)
Число вставаний	3 (2; 4)	5 (2; 9)	2,5 (2; 6)	2 (1; 4)	4,5 (2; 6)	5 (3; 9)
Количество болюсов	1 (0; 1)	1,5 (1; 2)	2 (1; 2)	1 (1; 2)	1 (1; 1)	1 (0; 3)
Количество уринаций	0 (0; 2)	1,5 ^x (1; 2)	1 (1; 2)	1* (0; 1)	1* (1; 1)	2 (1; 2)
Число актов короткого груминга	0 (0; 1)	2 ^x (1; 3)	1 (0; 2)	0,5* (0; 1)	0** (0; 1)	1 (0; 2)

Примечание: ^x - $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой нестрессированных крыс, * - $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой стрессированных крыс, ** - $p \leq 0,01$ по сравнению с контрольной группой стрессированных крыс.

Направленность и выраженность поведенческих эффектов АКТГ₄₋₇-PGP зависела от величины использованной дозы. Так, в дозе 5 мкг/кг введение пептида не вызывало статистически значимых сдвигов исследованных

показателей в сравнении с контрольной группой стрессированных животных (таблица 5).

Увеличение используемой дозы АКТГ₄₋₇-PGP до 50 мкг/кг приводило к значительному снижению эмоциональности в виде уменьшения числа уринаций (в 1,5 раза, $p \leq 0,05$) по сравнению со стрессированными контрольными животными. Также при этом отмечалось уменьшение актов короткого груминга (в 4 раза, $p \leq 0,05$), что может указывать на снижение уровня фрустрации у крыс. При этом пептид в данной дозе не оказывал статистически достоверного влияния на ориентировочно-исследовательскую активность и локомоторное поведение.

При введении АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 150 мкг/кг сохранялась выявленная в предыдущей опытной группе направленность изменений поведенческой активности с тенденцией к росту выраженности данных эффектов. В частности, отмечалось уменьшение горизонтальной двигательной активности в центральной части установки: статистически значимо снижалось число пересеченных центральных квадратов в сравнении с контрольными животными (таблица 5). Уровни тревожности и эмоциональности также имели тенденцию к уменьшению в виде полного прекращения короткого груминга ($p \leq 0,01$) и уменьшения количества уринаций на 33% ($p \leq 0,05$). При этом изменение показателей, характеризующих двигательную активность в периферических квадратах, исследовательскую активность и локомоторное поведение, не достигало достоверных уровней.

Дальнейшее увеличение вводимой дозы АКТГ₄₋₇-PGP до 450 мкг/кг сопровождалось нивелированием выявленных в предыдущих двух подопытных группах эффектов. Так по данным таблицы 5, число пересеченных центральных и периферических квадратов, время, проведенное в центральной и периферической части установки, количество центральных и периферических стоек, общая дистанция, количество фекальных болюсов и уринаций, число актов короткого груминга имели близкие к таковым показателям у животных стрессированной контрольной группы.

Таким образом, полученные данные позволяют полагать, что хроническое стрессорное воздействие в виде иммобилизации крыс в течение 14 дней по 2 часа ежедневно вызывало изменение их поведенческих реакций в открытом поле в виде повышения двигательной активности, эмоциональности животных и уровня тревожности.

Введение пептида АКТГ₄₋₇-PGR в дозах 50 и 150 мкг/кг оказывало выраженное влияние на поведенческую активность стрессированных крыс в виде статистически значимого снижения уровней тревожности и эмоциональности до абсолютных значений контрольных нестрессированных животных. Данный факт свидетельствует о полном нивелировании пептидом стрессиндуцированных сдвигов данных психофизиологических поведенческих показателей. При этом использование АКТГ₄₋₇-PGR в дозах 5 и 450 мкг/кг не оказывало существенного влияния на поведенческие реакции стрессированных крыс в тесте открытого поля.

4.2 Изменения поведенческих показателей крыс в приподнятом крестообразном лабиринте при применении АКТГ₄₋₇-PGR в условиях хронического иммобилизационного стресса

В настоящее время тест приподнятого крестообразного лабиринта является одним из наиболее объективных и часто используемых методов оценки состояния тревожности у животных, а также для выявления анксиолитических и анксиогенных эффектов биологически активных веществ в биомедицинских исследованиях и оценки эффективности коррекции различных патологических процессов [59, 261]. Достаточно однозначная трактовка полученных данных позволяет адекватно оценивать уровень тревоги у животных, в том числе при использованной в нашей работе схеме экспериментов.

Методика приподнятого крестообразного лабиринта была использована в работе для выявления возможных анксиолитических или анксиогенных эффектов воздействия ХИС и пептида АКТГ₄₋₇-PGR.

Как видно из таблицы 6, перед началом эксперимента исходные уровни тревожности, оцениваемые в приподнятом крестообразном лабиринте, в подопытных группах статистически значимых различий не имели, что свидетельствует об их адекватном формировании.

Таблица 6 – Исходные уровни тревожности крыс в приподнятом крестообразном лабиринте (Me (Q1-Q3))

Группа Показатель	Контроль без стресса n=10	Животные, подвергшиеся хроническому иммобилизационному стрессу				
		Контроль n=10	Введение АКТГ ₄₋₇ -PGP в дозе			
			5 мкг/кг n=10	50 мкг/кг n=10	150 мкг/кг n=10	450 мкг/кг n=10
Время, проведенное в открытых рукавах	53,7 (32,75; 60,24)	44,3 (25,12; 62)	31,22 (24,68; 50,56)	40,23 (33,6; 75,88)	44,61 (36; 71,56)	82,9 (42,4; 98,44)
Время, проведенное в закрытых рукавах	237,51 (171,1; 254,6)	238,94 (224,72; 260,96)	254,54 (238,12; 262,72)	243,33 (208,28; 254,12)	235,87 (212,32; 246,88)	195,29 (173,15; 231,72)
Время, проведенное на центральной площадке	11,24 (8,25; 37,12)	13,38 (8,24; 23,68)	12,57 (11,16; 17,52)	16,39 (12,88; 18,36)	16,18 (12,72; 19,24)	22,9 (17,43; 25,04)
Число свешиваний	11,5 (9; 16)	12 (7; 13)	11,5 (9; 13)	11 (10; 13)	6,5 (6; 10)	13,5 (10; 16)

В результате воздействия хронического иммобилизационного стресса происходило значительное изменение поведенческой активности экспериментальных животных в приподнятом крестообразном лабиринте (таблица 7). Так, статистически достоверно увеличивалось время, проведенное как в закрытых рукавах экспериментальной установки (на 10,7%, $p \leq 0,05$), и уменьшалось в открытых рукавах (на 52,2%, $p \leq 0,05$). Также о стрессиндуцированном росте уровня тревожности свидетельствует и достоверное снижение числа свешиваний из открытого рукава (в 1,75 раза, $p \leq 0,05$) по сравнению с нестрессированным контролем.

Введение АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 5 мкг/кг приводило к пролонгированию времени нахождения экспериментальных животных на центральной площадке (в 3,2 раза, $p \leq 0,05$) и уменьшению времени проведенного крысами

в закрытых рукавах установки (на 8,2%, $p \leq 0,01$). Однако, время нахождения животных в открытых рукавах установки ПКЛ статистически достоверно не отличалось от контрольных диапазонов значений.

Таблица 7 – Влияние ХИС и пептида АКТГ₄₋₇-PGR на уровень тревожности стрессированных крыс в приподнятом крестообразном лабиринте (Me (Q1-Q3))

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

Примечание: ^x - $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой нестрессированных крыс, * - $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой стрессированных крыс, ** - $p \leq 0,01$ по сравнению с контрольной группой стрессированных крыс.

Увеличение вводимой дозы гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro до 50 мкг/кг вызывало статистически значимое пролонгирование нахождения экспериментальных животных в открытых рукавах и на центральной площадке установки ПКЛ (соответственно в 1,9 и 1,8 раза, $p \leq 0,05$) по сравнению со стрессированным контролем. При этом время, проведенное в закрытых рукавах, снизилось на 7,6% ($p \leq 0,01$).

Введение пептида в дозе 150 мкг/кг не сопровождалось увеличением выраженности его поведенческих эффектов и регистрируемые показатели имели сходные значения с таковыми в подопытной группе, получавшей

АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 50 мкг/кг. Так, время нахождения крыс в открытых рукавах возросло в 2,1 раза ($p \leq 0,01$), тогда как данный показатель в закрытых рукавах снижался на 8,6% ($p \leq 0,01$). Время, проведенное животными на центральной площадке, в контрольной группе стрессированных крыс и после введения пептида существенно не различались. При этом обращает внимание тот факт, что абсолютные значения определяемых показателей в данной подопытной группе были близки к значениям контрольных нестрессированных животных.

В наибольшей используемой в эксперименте дозе 450 мкг/кг введение гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro вызывало уменьшение времени проведенного животными в закрытых рукавах ПКЛ (на 7%, $p \leq 0,05$) без достоверных изменений других определяемых показателей поведенческой активности.

Стоит отметить, что применение гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro ни в одной из используемых не влияло на число свешиваний из открытых рукавов установки ПКЛ.

Таким образом, в условиях хронического иммобилизационного стресса применение АКТГ₄₋₇-PGP оказывало влияние на показатели тревожности у крыс в приподнятом крестообразном лабиринте, которое имело анксиолитическую направленность и зависело от величины использованной дозы. Наиболее выраженное уменьшение показателей тревожности, вызванной иммобилизационным стрессом наблюдалось после введения гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro в дозах 50 и 150 мкг/кг, достигая в ряде случаев уровня контрольных нестрессированных животных.

4.3. Содержание кортикостерона в сыворотке крови крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса и применения АКТГ₄₋₇-PGP

Исследование уровня глюкокортикоидов в сыворотке крови является стандартным методом оценки развития стрессорной реакции в эксперименте.

Основным маркером стрессорной нагрузки организма у крыс является содержание в крови кортикостерона. Установлено, что существует сезонная и суточная динамика уровня данного гормона, но в тоже время содержание кортикостерона указывает и определяет определенную стадию стресса и адаптации [100, 197, 260]. В связи с вышеуказанными фактами, в данной работе опытным путем были изучены уровни кортикостерона в сыворотке крови экспериментальных животных.

Определение уровня кортикостерона проводили как с целью оценки использованной модели хронического иммобилизационного стресса, так и для изучения влияния введения АКТГ₄₋₇-PGP на развитие стресса у животных. Эксперимент выполнен на 6 группах крыс по 10 особей в каждой. Животные первой группы являлись контролем без стресса, крысы второй группы были помещены в условия иммобилизационного стресса, сформированного путем ограничения подвижности по 2 часа в течение 14 дней. Животным третьей, четвертой, пятой и шестой групп интраперитонеально вводили гептапептид Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro, растворенный в физиологическом растворе в дозах 5, 50, 150 и 450 мкг/кг за 12-15 минут до начала стрессирования на протяжении 14 дней в расчетном объеме 1 мл на 1 кг массы тела. Забор крови проводили с помощью закрытых систем для взятия крови S-Monovette® с активатором свертывания для получения сыворотки производства SARSTEDT (Германия) из правого желудочка сердца. Непосредственно после забора пробирки с кровью центрифугировали в течение 15 минут при ускорении 1000-1200 g (оборотов в минуту). Полученную сыворотку крови в объеме 500 мкл помещали в пробирки Эппендорфа с соответствующей маркировкой емкостью 1,5 мл. Пробы хранили при температуре -20°C для определения кортикостерона [55].

Уровень кортикостерона в сыворотке крови определяли методом ИФА при помощи набора Corticosterone ELISA Kit ADI-900-097 (Enzo, США).

Как видно из таблицы 8, по окончании эксперимента уровень кортикостерона в сыворотке крови стрессированных крыс возрос на 58,9%

($p \leq 0,01$) в сравнении с нестрессированными животными. Данный факт свидетельствует о перестройке продукции адаптивных гормонов в условиях использованной стрессорной модели. Согласно литературным данным об использованной методике стрессирования и длительности экспериментального воздействия, в данном случае можно предполагать о развитии у крыс стрессорной реакции в стадии резистентности [100, 184, 197].

Таблица 8 – Уровень кортикостерона сыворотки крови крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса и при применении пептида АКТГ₄₋₇-PGP ($M \pm m$)

Показатель	Контроль без стресса n=10	Животные, подвергшиеся хроническому иммобилизационному стрессу				
		Контроль n=10	Введение АКТГ ₄₋₇ -PGP в дозе			
			5 мкг/кг n=10	50 мкг/кг n=10	150 мкг/кг n=10	450 мкг/кг n=10
Кортикостерон	1360,9±57,79	2162,5±170,77 ^{xx}	1543,7±90,92 ^{**}	1423,3±31,9 ^{**}	1580,6±95,57 ^{**}	1466,9±21,42 ^{**}

Примечание: ^{xx} - $p \leq 0,01$ по сравнению с контрольной группой нестрессированных крыс, ^{**} - $p \leq 0,01$ по сравнению с контрольной группой стрессированных крыс.

Установлено, что введение АКТГ₄₋₇-PGP во всех использованных дозах сопровождалось статистически достоверным снижением содержания уровня гормона в сыворотке крови. Применение гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro в минимальной дозе (5 мкг/кг) способствовало снижению концентрации кортикостерона на 28,6% ($p \leq 0,01$). Увеличение вводимой дозы нейропептида до 50 мкг/кг сопровождалось дальнейшим снижением уровня гормона на 34,2% ($p \leq 0,01$), которое было наибольшим среди всех подопытных групп. При дальнейшем увеличении дозы АКТГ₄₋₇-PGP степень

снижения содержания кортикостерона также достигала достоверных различий с контрольной группой, но при несколько более низких уровнях абсолютных значений. Так, введение пептида в дозе 150 мкг/кг вызывало уменьшение концентрации кортикостерона в сыворотке на 27% ($p \leq 0,01$), а в дозе 450 мкг/кг – на 32,2% ($p \leq 0,01$).

Таким образом, использованная в нашей работе модель хронического иммобилизационного стресса характеризуется существенным усилением продукции кортикостерона и развитием стрессорной реакции в стадии резистентности. Введение АКТГ₄₋₇-PGP во всех использованных в эксперименте дозах снижало содержание кортикостерона в крови, что может являться следствием его в корригирующего влияния на развитие стрессорной реакции у крыс.

ГЛАВА 5

КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ СОСТОЯНИЕМ МИКРОБИОТЫ, НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И СТЕНКИ ТОЛСТОЙ КИШКИ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА И ПРИМЕНЕНИЯ АКТГ₄₋₇-PGP

Важной задачей настоящего исследования являлось выявление корреляционных взаимосвязей между показателями состояния микробиоты, нервной системы и морфометрическими параметрами толстой кишки крыс в условиях иммобилизационного стресса и применения АКТГ₄₋₇-PGP. Для достижения вышеупомянутой цели был проведен корреляционный анализ данных, полученных опытным путем при выполнении поведенческих, иммуноферментных, микробиологических и морфометрических исследований. Согласно современным представлениям, многомерный статистический анализ позволяет выявить меру и направление взаимосвязей между исследуемыми переменными [22]. Исходя из характера статистической выборки в нашем исследовании, адекватным методом оценки связи между изучаемыми показателями является корреляционный анализ с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Графически выраженные значимые связи между исследуемыми показателями в контрольной нестрессированной опытной группе животных продемонстрированы на рисунке 11 и в таблицах 1 и 2 приложения 1. Установлено, что уровень кортикостерона сильно прямо коррелировал с количеством актов короткого груминга ($r_s=0,94$) и числом уринаций (показатели эмоциональности) ($r_s=0,75$), а связь с временем, проведенным в закрытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта, имела прямой и умеренный характер ($r_s=0,64$). При этом была выявлена отрицательная сильная взаимосвязь между концентрацией кортикостерона и количеством лактобактерий ($r_s=-0,81$).

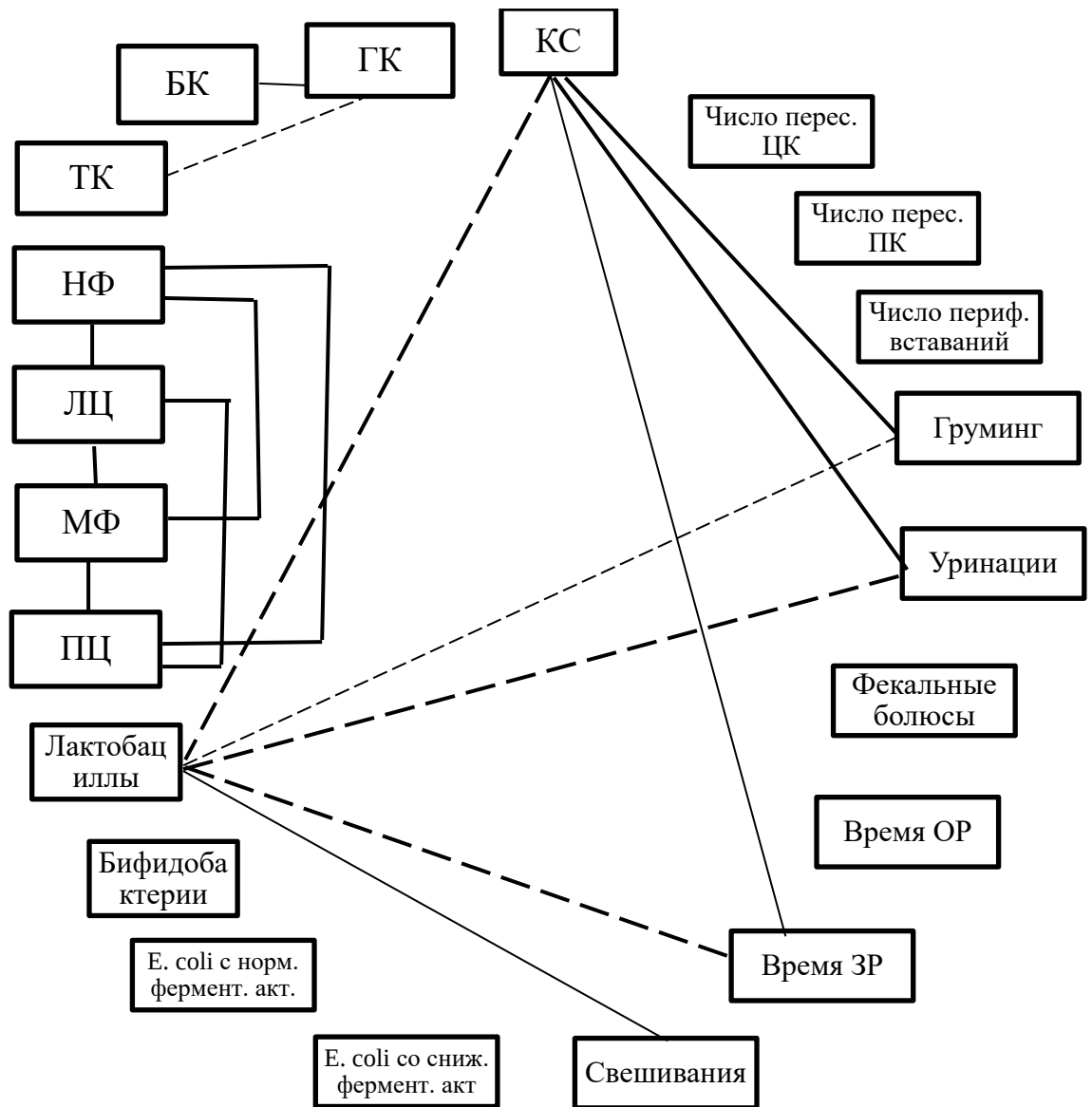


Рисунок 11 – Корреляционные взаимосвязи изучаемых показателей в группе контрольных нестрессированных животных.

Примечание. Условные обозначения (здесь и далее на рисунках 12-18): сплошная линия – прямая корреляционная взаимосвязь; пунктирная линия – обратная корреляционная взаимосвязь; широкая линия 1,5 мм. – связь сильная ($rs \geq 0,70$); узкая линия 0,75 мм. – связь средняя (умеренная) ($0,30 < rs < 0,70$); БК – бокаловидные клетки; ГК – глубина крипт; ЗР – закрытые рукава; КС – кортикостерон; ЛЦ – лимфоциты; МФ – макрофаги; НФ – нейтрофилы; ОР – открытые рукава; ПК – периферические квадраты; ПЦ – плазмоциты; ТК – тучные клетки IV типа; ЦК – центральные квадраты.

Среди морфометрических показателей выявлена прямая умеренная связь между глубиной крипт и количеством бокаловидных клеток ($r_s=0,63$), обратная умеренная связь между числом тучных клеток 4 типа и глубиной крипт ($r_s=-0,67$). Между остальными данными морфометрического исследования имели место прямые сильные взаимосвязи между числом лимфоцитов, макрофагов, нейтрофилов и плазмоцитов.

При анализе показателей состояния толстокишечной микробиоты выявлены сильные обратные взаимосвязи между количеством лактобацилл и уровнем кортикостерона ($r_s=-0,81$), числом уринаций ($r_s=-0,91$), временем, проведенным в закрытых рукавах ($r_s=-0,71$), а также умеренная обратная связь с количеством актов короткого груминга ($r_s=-0,66$). Кроме того, число лактобактерий прямо умеренно коррелировало с количеством свешиваний из открытых рукавов ($r_s=0,68$).

Хронический иммобилизационный стресс приводил к перенапряжению изучаемых систем, что выражалось в увеличении количества корреляционных связей среди исследуемых показателей (рисунки 12 (сильные связи) и 13 (умеренные связи), таблицы 3 и 4 приложения 1).

При этом уровень кортикостерона прямо сильно коррелировал с поведенческими (количеством актов короткого груминга ($r_s=0,85$), временем, проведенным в закрытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта ($r_s=0,92$)) и с морфометрическими показателями (нейтрофилами ($r_s=0,88$), макрофагами ($r_s=0,89$) и тучными клетками 4 типа ($r_s=0,86$)), сильно обратно - с микробиологическими (количество лактобактерий ($r_s=-0,88$) и бифидобактерий ($r_s=-0,76$)) и поведенческими показателями (время нахождения в открытых рукавах ($r_s=-0,90$) и количество свешиваний с них ($r_s=-0,91$)), а также с глубиной крипт ($r_s=-0,72$).

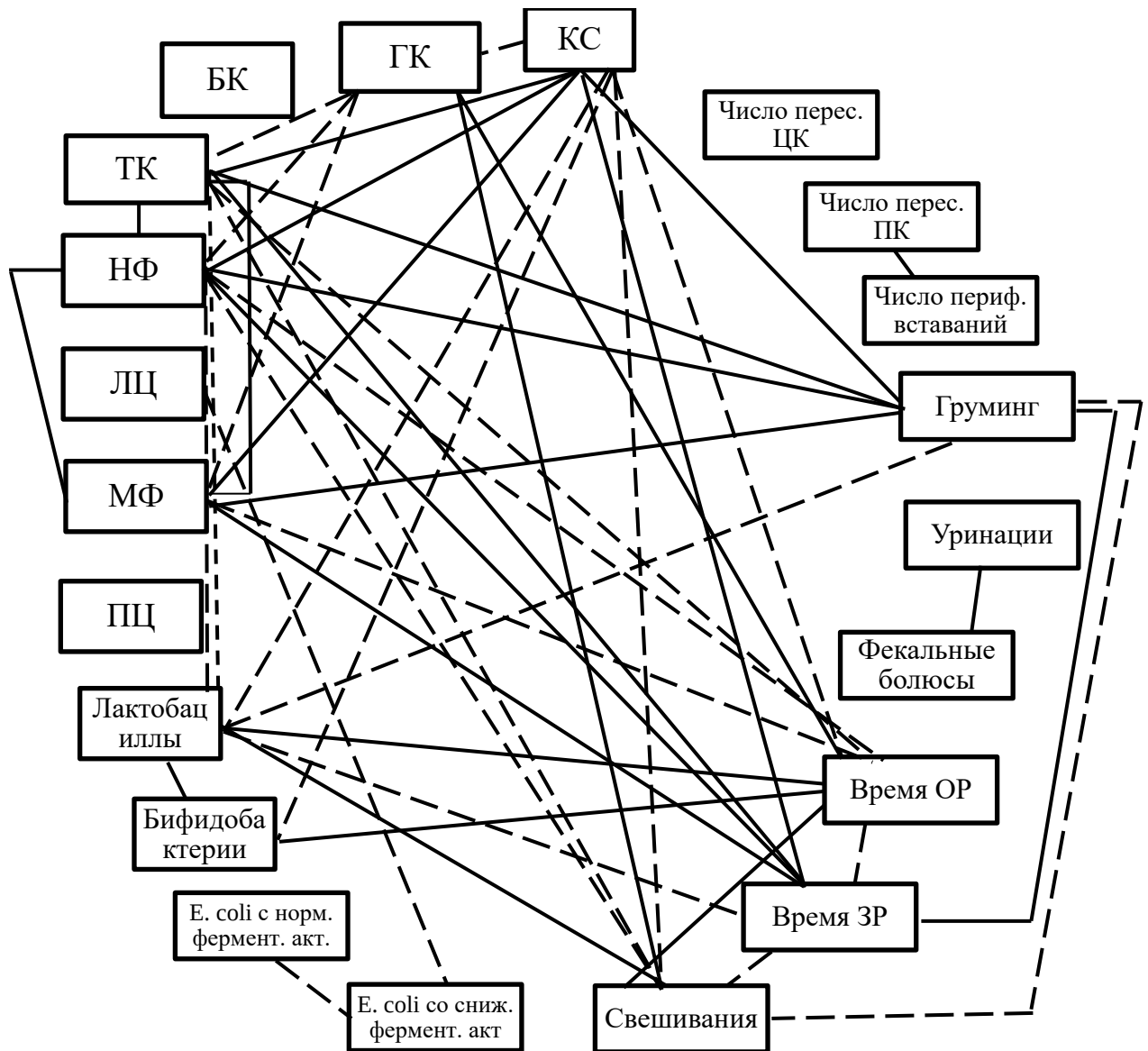


Рисунок 12 – Сильные корреляционные взаимосвязи изучаемых показателей в группе контрольных стрессированных животных.

В условиях стресса в данной группе животных существенно возрастали количество и сила взаимосвязей между показателями состояния толстокишечной микробиоты, поведенческими характеристиками и морфофункциональным состоянием толстой кишки. Так, глубина крипт сильно прямо коррелировала с временем нахождения в открытых рукавах ($r_s=0,79$) и с числом свеживаний ($r_s=0,79$), а умеренно и обратно – с числом актов короткого груминга ($r_s=-0,69$).

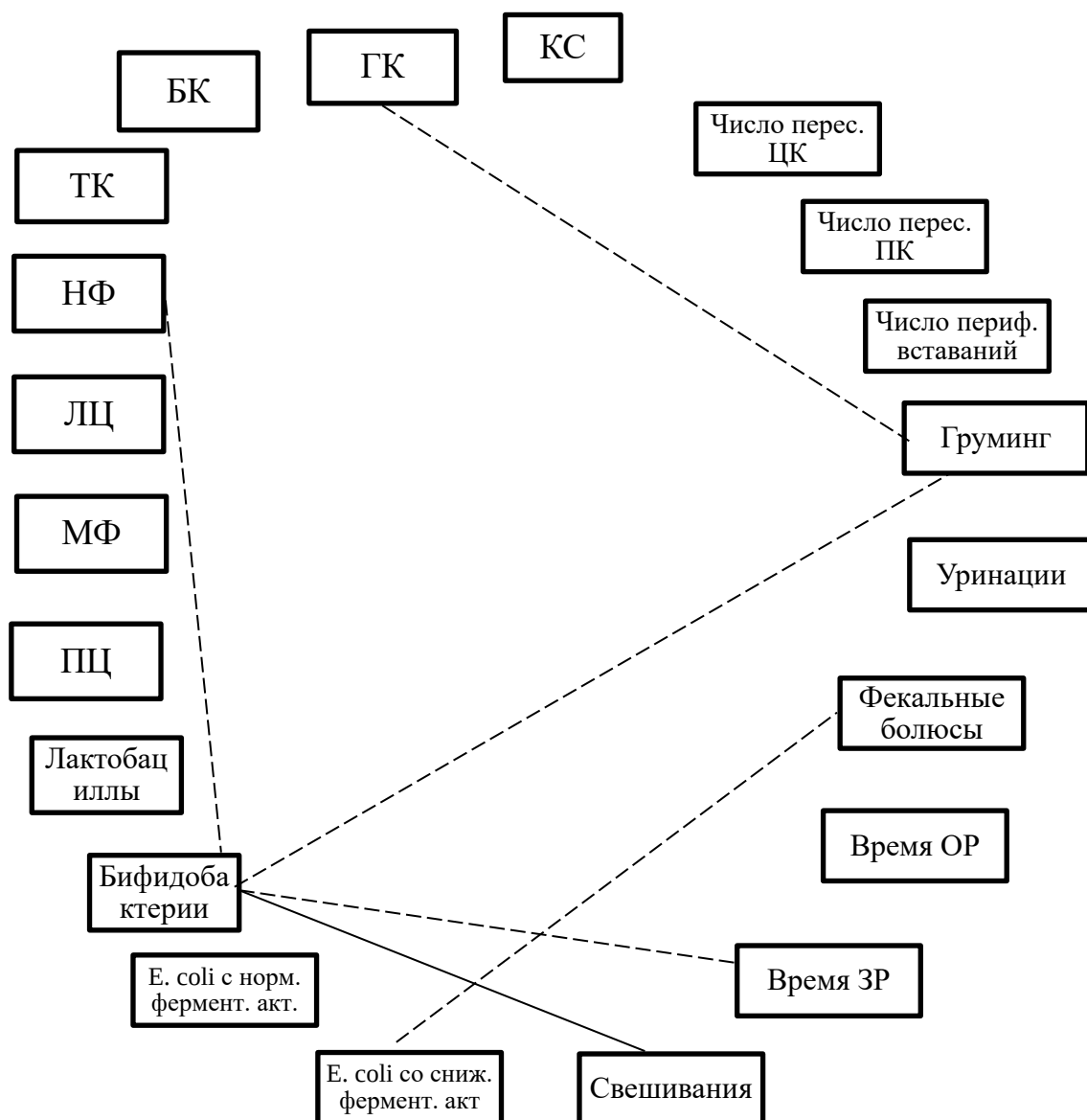


Рисунок 13 – Умеренные корреляционные взаимосвязи изучаемых показателей в группе контрольных стрессированных животных.

Численность лактобацилл имело сильную обратную корреляционную взаимосвязь с числом тучных клеток ($r_s = -0,88$), нейтрофилов ($r_s = -0,90$), макрофагов ($r_s = -0,77$), с временем нахождения в закрытых рукавах ($r_s = -0,81$) и количеством груминга ($r_s = -0,94$), а также умеренную обратную связь – с временем пребывания в периферических квадратах открытого поля ($r_s = -0,67$). Содержание бифидобактерий прямо сильно коррелировало с временем пребывания в открытых рукавах ($r_s = 0,77$) и умеренно – с временем в центральных квадратах ($r_s = 0,65$) и числом свешиваний ($r_s = 0,65$). Численность

кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью имела отрицательную сильную корреляционную связь с количеством *E.coli* со сниженной ферментативной активностью ($r_s = -0,79$). Кроме этого, были установлены сильные прямые корреляционные связи числа короткого груминга с количеством тучных клеток ($r_s = 0,88$), нейтрофилов ($r_s = 0,89$), макрофагов ($r_s = 0,78$), с временем нахождения в закрытых рукавах ($r_s = 0,76$). При этом время нахождения в открытых рукавах ($r_s = -0,73$) и свешивания из них ($r_s = -0,82$) сильно обратно коррелировали с грумингом. Между количеством уринаций и фекальных болюсов имела место сильная прямая взаимосвязь ($r_s = 0,88$).

Установленные многочисленные статистически достоверные корреляционные связи между определяемыми показателями животных контрольной стрессированной группы могут быть следствием напряжения адаптивных реакций организма в условиях продолжительного стрессорного воздействия.

Введение АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 5 мкг/кг стрессированным животным приводило к существенному снижению количества и интенсивности корреляционных связей между изучаемыми показателями в сравнении с контрольной группой стрессированных крыс (рисунок 14, таблицы 5 и 6 приложения 1).

Так, уровень кортикостерона сильно прямо коррелировал с количеством плазмоцитов ($r_s = 0,94$), числом актов короткого груминга ($r_s = 0,90$) и уринаций ($r_s = 0,84$), а также сильно обратно - с количеством свешиваний из открытых рукавов установки ПКЛ ($r_s = -0,80$). В отношении количества бокаловидных клеток выявлена сильная прямая корреляционная взаимосвязь с глубиной крипт ($r_s = 0,98$).

Численность бифидобактерий умеренно прямо коррелировала с количеством вставаний в периферических квадратах открытого поля ($r_s = 0,64$). Число кишечных палочек с нормальной ферментативной

активностью и количество кишечных палочек со сниженной ферментативной активностью имели между собой обратную сильную взаимосвязь ($r_s=-0,74$).

Среди поведенческих показателей обращает на себя внимание сильная прямая связь между числом пересеченных центральных квадратов и временем нахождения в них ($r_s=0,93$). При этом число пересеченных периферических квадратов прямо умеренно коррелировало с количеством вставаний в них ($r_s=0,69$) и сильно – с количеством фекальных болюсов ($r_s=0,73$). Кроме того, установлены сильные обратные взаимосвязи между временем нахождения крыс в открытых рукавах и временем в закрытых рукавах ($r_s=-0,91$), а также числом вставаний в периферических квадратах ($r_s=-0,77$).

Применение пептида АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 50 мкг/кг сопровождалось формированием большего числа сильных корреляционных взаимосвязей между различными группами оцениваемых показателей (рисунки 15 и 16, таблицы 7 и 8 приложения 1). В сравнении с подопытной группой, которая получала гептапептид Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro в дозе 5 мкг/кг, отмечается не только значительное увеличение общего количества связей, но и появление их между микробиологическими и морфологическими показателями, уровнем кортикостерона и клеточным составом кишки, а также поведенческими показателями состояния нервной системы.

При этом уровень кортикостерона прямо коррелировал с морфологическими показателями толстой кишки (число лимфоцитов ($r_s=0,64$), макрофагов ($r_s=0,78$), плазмоцитов ($r_s=0,72$)) и показателями эмоциональности и тревожности (количество актов груминга ($r_s=0,88$), уринаций ($r_s=0,97$), фекальных болюсов ($r_s=0,87$)). Также установлены обратные корреляционные взаимосвязи уровня кортикостерона с содержанием лактобацилл ($r_s=-0,67$), бифидобактерий ($r_s=-0,69$), временем в открытых рукавах ($r_s=-0,66$), глубиной крипт ($r_s=-0,63$). Количество тучных клеток 4 типа прямо умеренно коррелировало с количеством актов короткого груминга ($r_s=0,68$), уринаций ($r_s=0,64$), прямо сильно – с количеством

фекальных болюсов ($r_s=0,72$), обратно сильно – с числом периферических вставаний ($r_s=-0,87$).

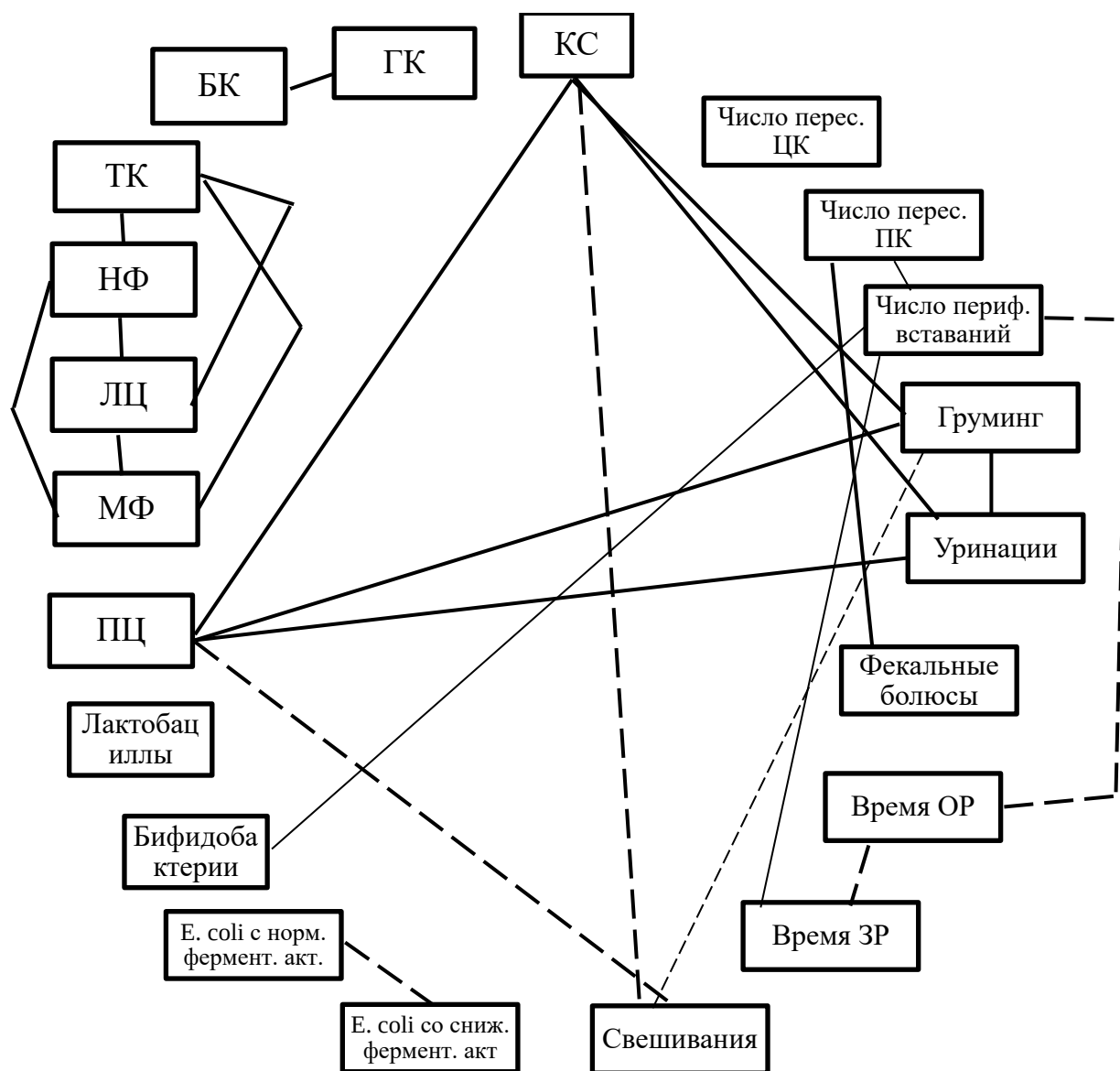


Рисунок 14 – Корреляционные взаимосвязи изучаемых показателей при введении АКТГ₄₋₇-PGR в дозе 5 мкг/кг в условиях хронического иммобилизационного стресса.

Прямые сильные корреляционные взаимосвязи обнаружены для лактобацилл и бифидобактерий ($r_s=0,84$), кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью ($r_s=0,74$ и $r_s=0,80$ соответственно). Кишечные палочки со сниженной ферментативной активностью обратно сильно и умеренно коррелировали с облигатными микроорганизмами. При анализе

поведенческой активности были выявлены сильные прямые связи между грумингом и количеством макрофагов ($r_s=0,77$), плазмоцитов ($r_s=0,74$), число уринаций ($r_s=0,89$), фекальных болюсов ($r_s=0,87$). Последний показатель отрицательно умеренно коррелировал с глубиной крипт ($r_s=-0,68$), отрицательно сильно – с количеством лактобактерий ($r_s=-0,77$). Кроме того, имела место прямая сильная связь между числом свешиваний и количеством пересеченных периферических квадратов ($r_s=0,89$).

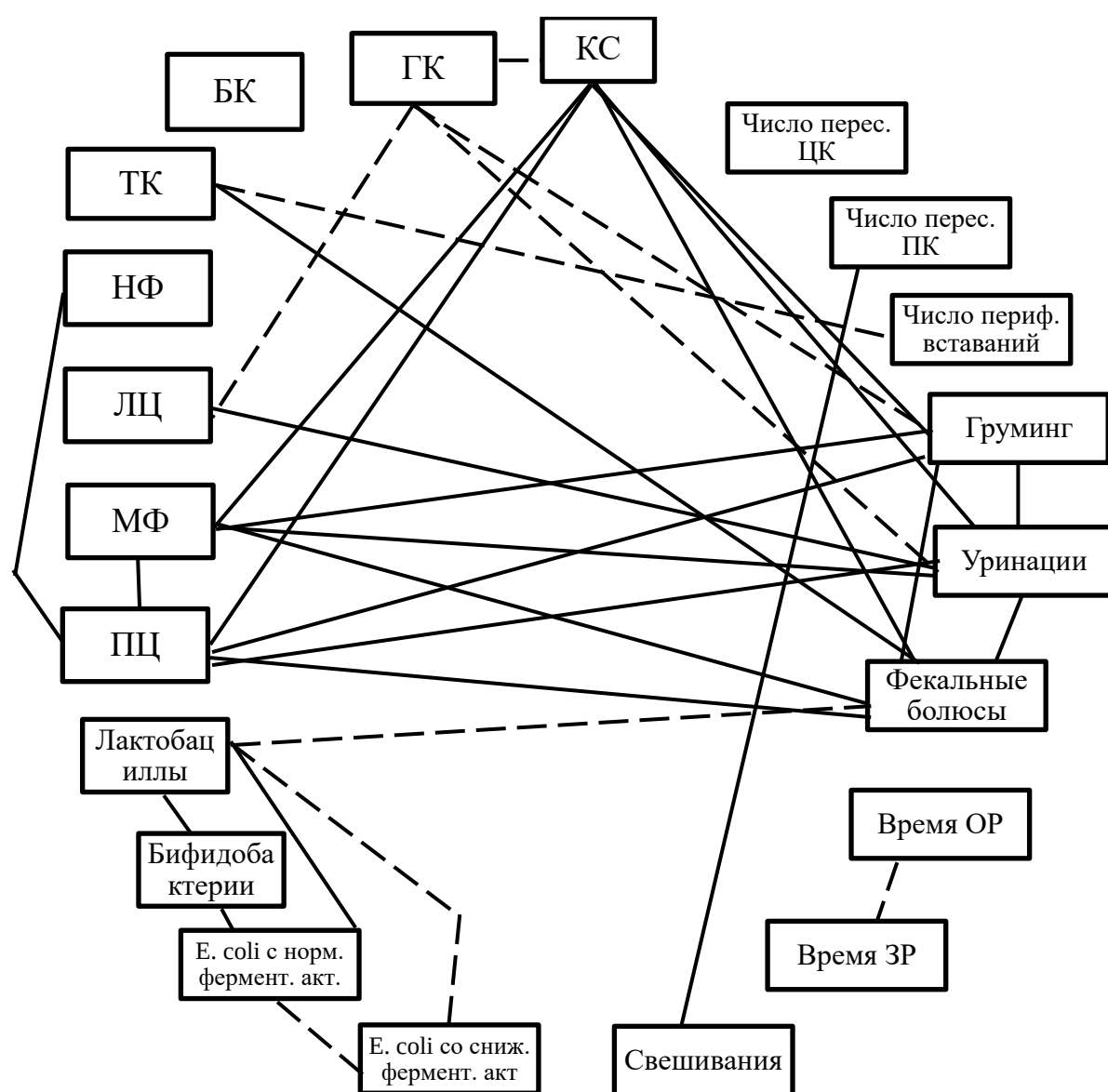


Рисунок 15 – Сильные корреляционные взаимосвязи изучаемых показателей при введении АКТГ₄₋₇-PGR в дозе 50 мкг/кг в условиях хронического иммобилизационного стресса.

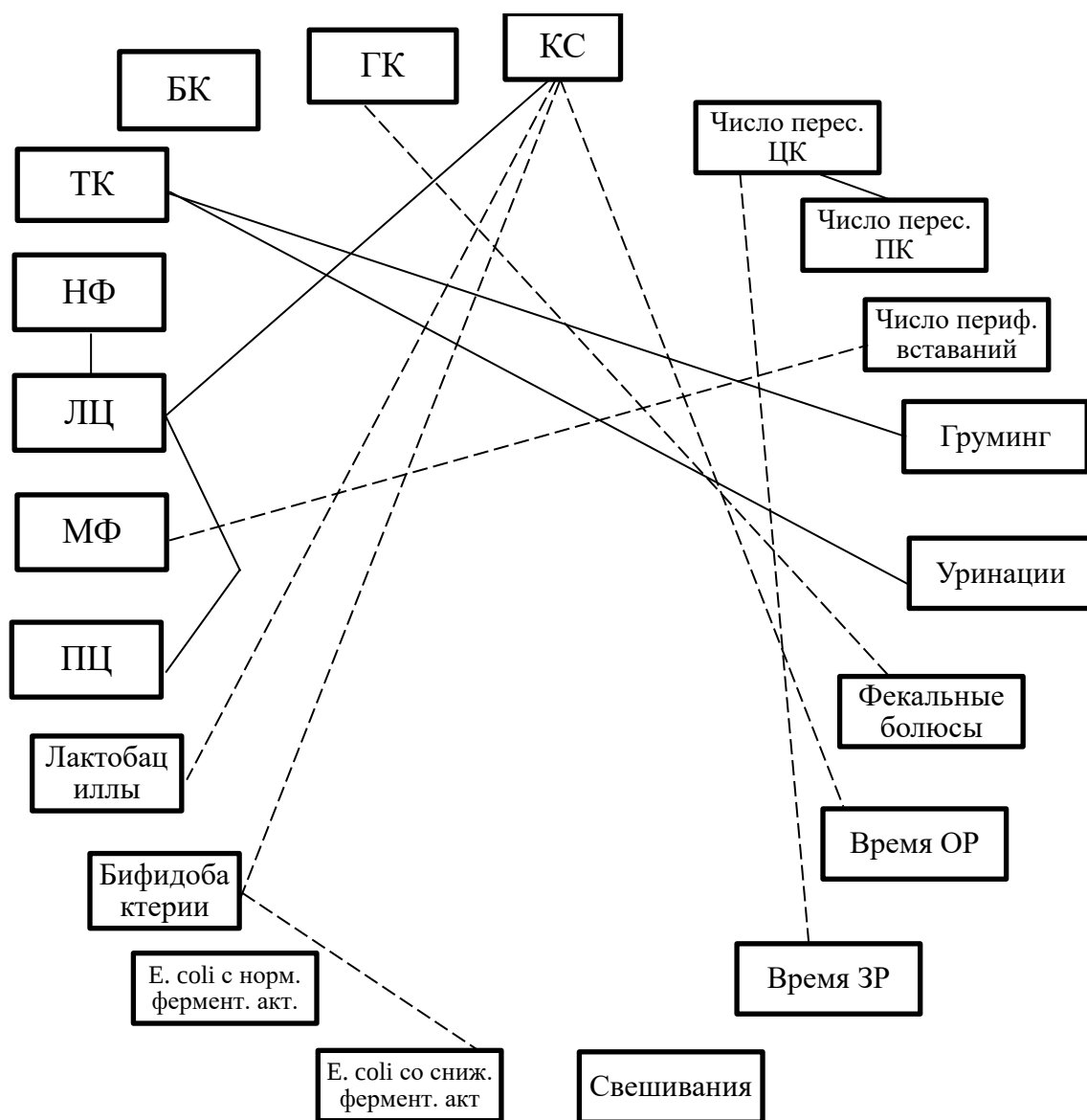


Рисунок 16 – Умеренные корреляционные взаимосвязи изучаемых показателей при введении АКТГ₄₋₇-PGR в дозе 50 мкг/кг в условиях хронического иммобилизационного стресса.

Увеличение дозы гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro до 150 мкг/кг не сопровождалось значительным ростом числа корреляционных взаимосвязей или увеличением их силы, однако в их направленности отмечался ряд особенностей (рисунки 17 и 18, таблицы 9 и 10 приложения 1).

При этом, были выявлены прямые корреляционные взаимосвязи между уровнем кортикостерона и числом тучных клеток 4 типа ($r_s=0,65$), нейтрофилов ($r_s=0,94$), макрофагов ($r_s=0,94$), содержанием кишечных палочек со сниженной ферментативной активностью ($r_s=0,74$), временем в закрытых рукавах крестообразного лабиринта ($r_s=0,92$). Обратная сильная связь определялась для уровня кортикостерона и времени нахождения в открытых рукавах ($r_s=-0,90$), облигатных представителей толстокишечной микробиоты. Последние, в свою очередь, обратно коррелировали с количеством нейтрофилов, макрофагов, числом актов короткого груминга, фекальных болюсов, а также прямо – с временем в открытых рукавах и между собой.

При анализе поведенческих показателей обращают на себя внимание обратные корреляционные взаимосвязи между временем в открытых рукавах и числом тучных клеток ($r_s=-0,64$), нейтрофилов ($r_s=-0,82$), макрофагов ($r_s=-0,78$), *E. coli* со сниженной ферментативной активностью ($r_s=-0,71$), количеством фекальных болюсов ($r_s=-0,64$), временем нахождения в закрытых рукавах лабиринта ($r_s=-0,95$). Число периферических вставаний прямо умеренно коррелировало с количеством макрофагов ($r_s=0,64$).

Значительное количество корреляционных взаимосвязей установлено внутри группы показателей морфофункционального состояния стенки толстой кишки. Так, количество тучных клеток умеренно прямо коррелировало с грумингом ($r_s=0,66$), числом фекальных болюсов ($r_s=0,68$), количеством свешиваний ($r_s=0,65$) и временем нахождения крыс в закрытых рукавах лабиринта ($r_s=0,66$), количество плазмоцитов – прямо сильно с числом лимфоцитов ($r_s=0,77$).

Дальнейшее увеличение дозы АКТГ₄₋₇-PGP до 450 мкг/кг сопровождалось значительным снижением количества взаимосвязей между микробиологическими, поведенческими, морфологическими показателями, а также уровнем кортикостерона (рисунок 19, таблицы 11 и 12 приложения 1). При этом уровень кортикостерона коррелировал прямо умеренно с временем в периферических квадратах ($r_s=0,67$) и обратно - с числом пересеченных

центральных квадратов ($r_s=-0,68$), временем нахождения в них ($r_s=0,67$) и количеством периферических вставаний ($r_s=0,73$).

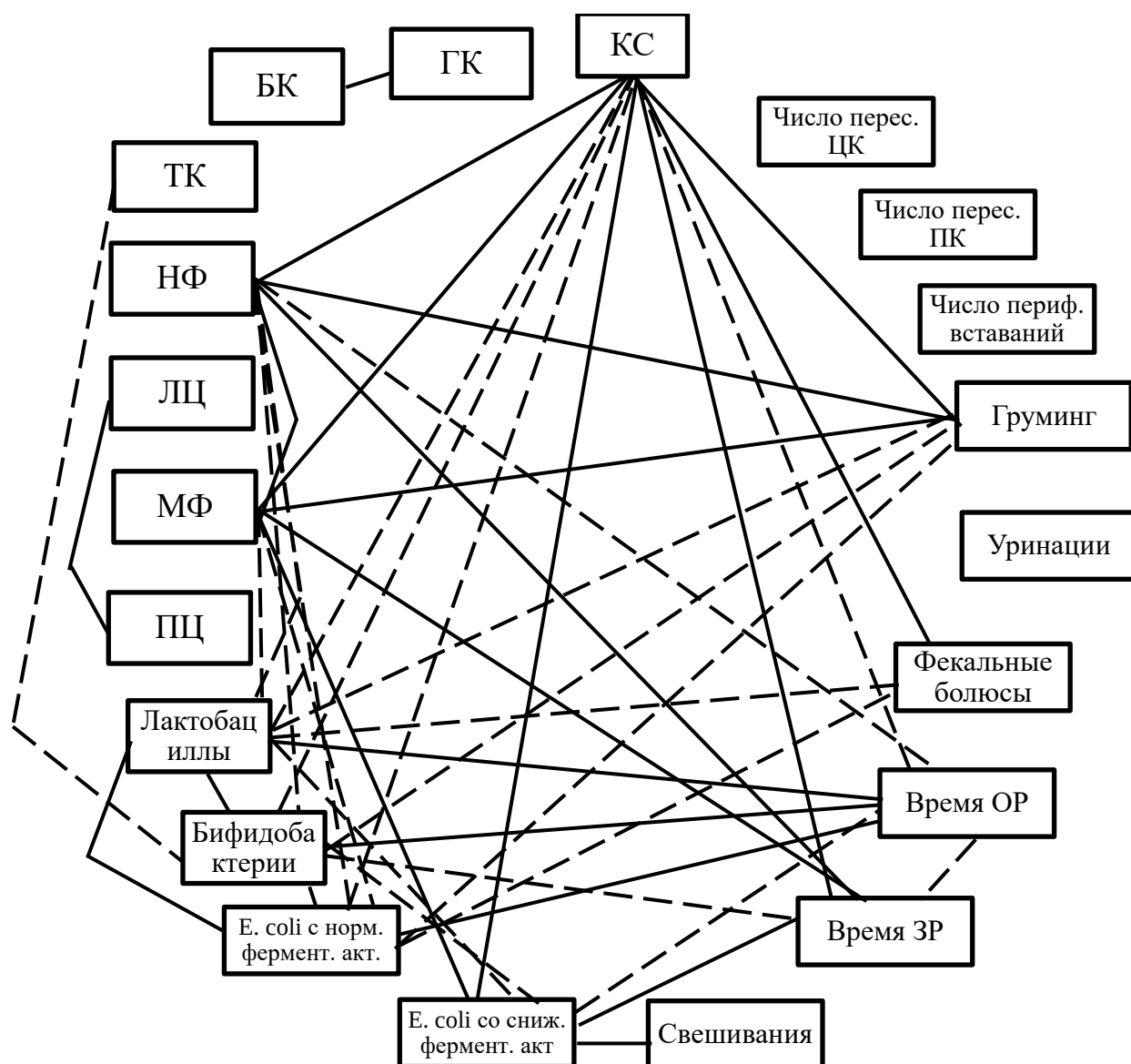


Рисунок 17 – Сильные корреляционные взаимосвязи изучаемых показателей при введении АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 150 мкг/кг в условиях хронического иммобилизационного стресса.

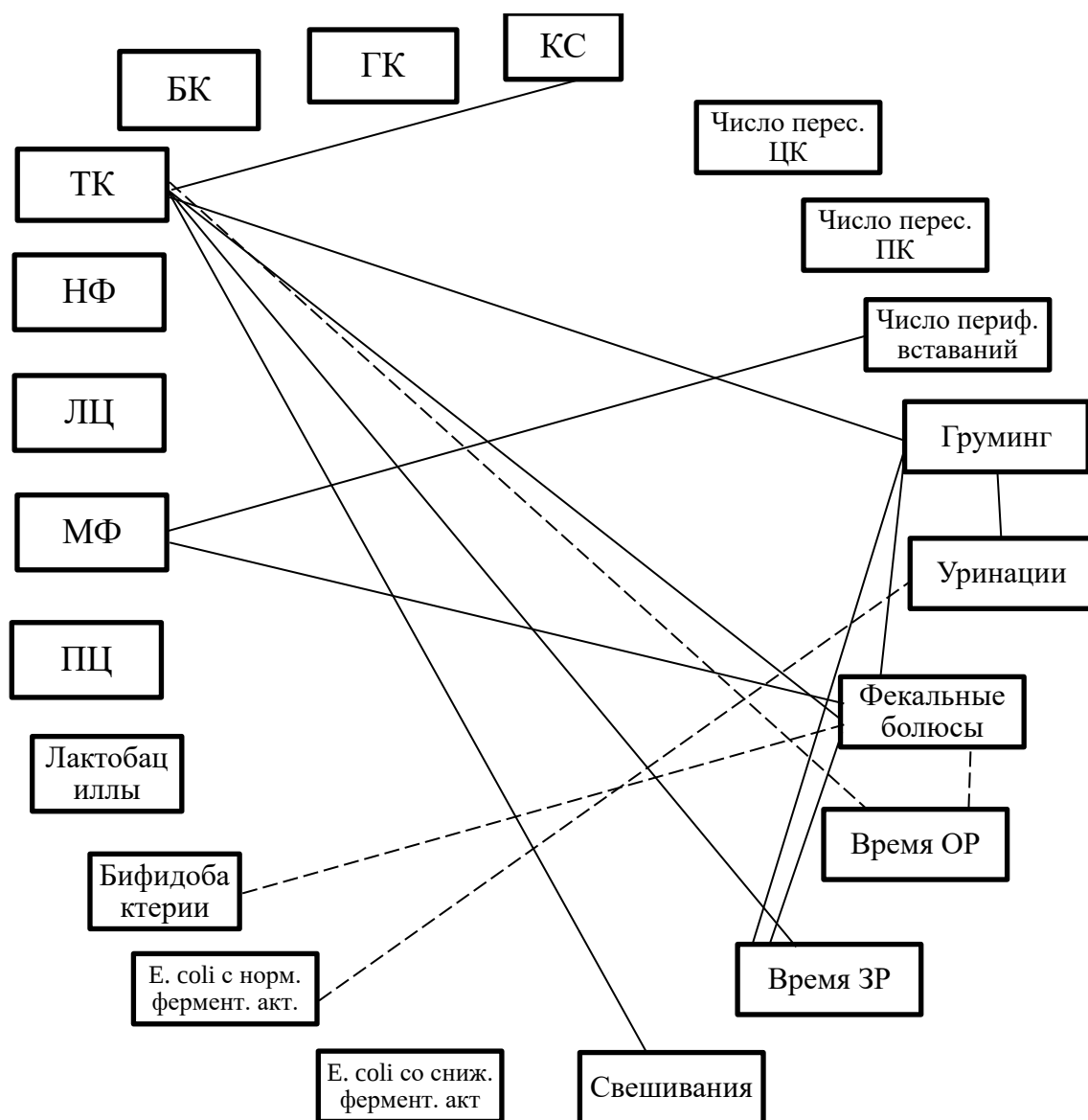


Рисунок 18 – Умеренные корреляционные взаимосвязи изучаемых показателей при введении АКТГ₄₋₇-PGR в дозе 150 мкг/кг в условиях хронического иммобилизационного стресса.

Число нейтрофилов, макрофагов, плазмоцитов, лимфоцитов, тучных клеток прямо коррелировало между собой. Глубина крипт сильно прямо коррелировала с числом бокаловидных клеток ($r_s=0,73$). При этом между показателями состояния толстокишечной микробиоты корреляционных взаимосвязей не было выявлено. Среди поведенческих показателей прямые корреляционные взаимосвязи были обнаружены между временем в центральных квадратах и числом пересеченных центральных квадратов ($r_s=0,99$), а также количеством периферических вставаний ($r_s=0,78$).

Последний показатель имел обратные связи с количеством лимфоцитов ($r_s=-0,65$) и временем, проведенным в периферических квадратах ($r_s=-0,75$). В целом, в данной группе обращает внимание наличие корреляционных взаимоотношений только внутри групп поведенческих и морфологических показателей. Наблюдавшиеся обширные взаимосвязи между всеми группами показателей (особенно после введения пептида в дозах 50 и 150 мкг/кг) в данном случае полностью нивелировались.

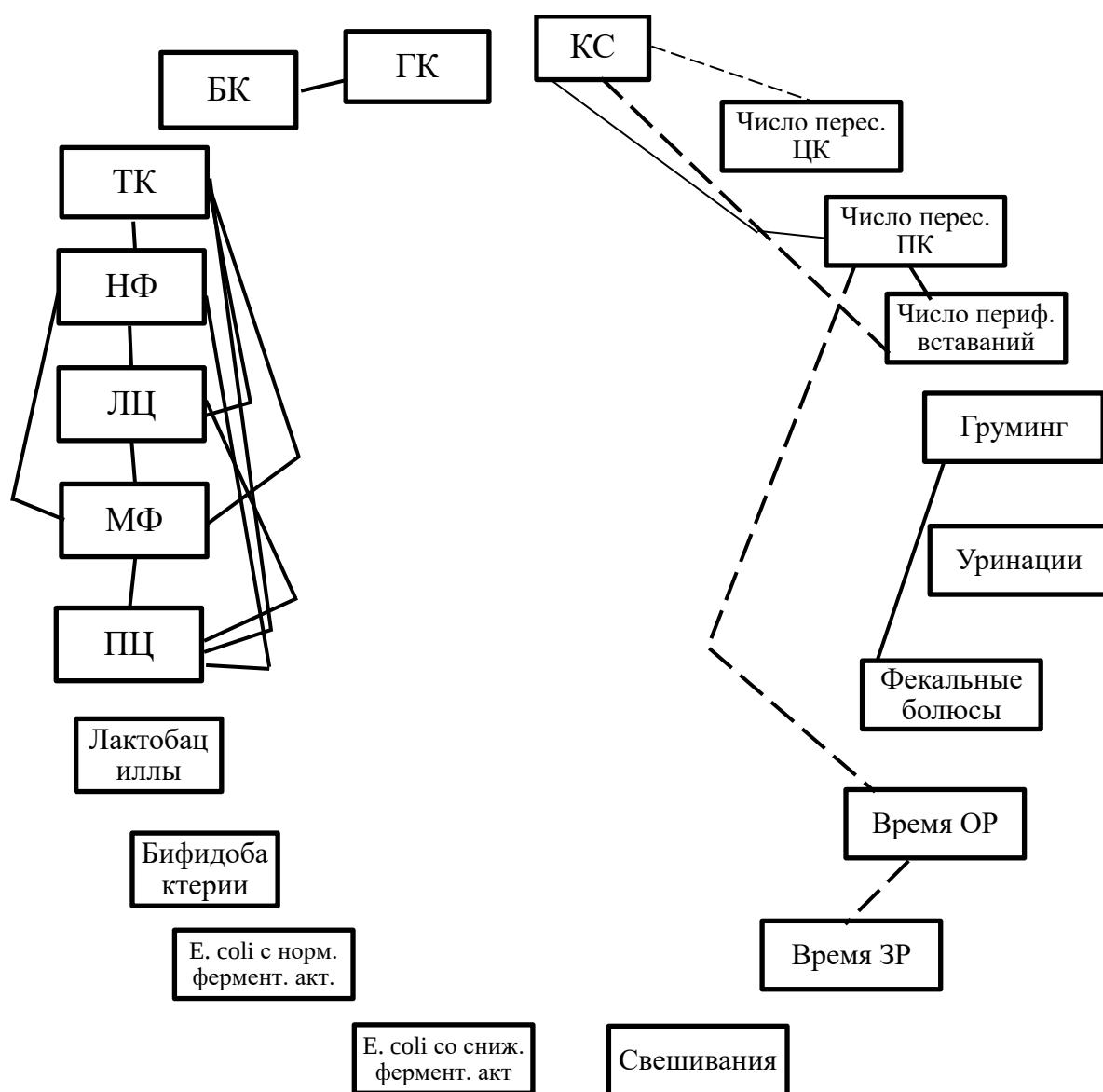


Рисунок 19 – Корреляционные взаимосвязи изучаемых показателей при введении АКТГ₄₋₇-PGR в дозе 450 мкг/кг в условиях хронического иммобилизационного стресса.

Таким образом, воздействие хронического иммобилизационного стресса способствует формированию значительного числа различных по направленности и силе корреляционных взаимосвязей между исследованными в нашей работе микробиологическими, морфометрическими, поведенческими показателями и уровнем кортикостерона сыворотки крови крыс. Введение АКТГ₄₋₇-PGR оказывало значительное влияние на направленность и силу корреляционных взаимоотношений между изучаемыми показателями, которое в значительной степени зависело от величины использованной дозы пептида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты работы, полученные на основании выполненного комплекса исследований, позволяют оценить взаимосвязи между состоянием микробиоты толстой кишки, ее морфометрическими показателями и функциональным состоянием нервной системы крыс при хроническом иммобилизационном стрессе и в условиях применения АКТГ₄₋₇-PGR.

Исследования были выполнены с использованием крыс-самцов Вистар, которые отличаются низкой степенью стрессоустойчивости по сравнению с другими линиями и традиционно применяются в экспериментальных исследованиях по изучению стрессиндуцированных изменений в организме [84]. Хронический иммобилизационный стресс моделировали путем ограничения подвижности в неестественном положении (на спине) в течение 2-х часов ежедневно на протяжении 14 дней [184]. Установленное при этом статистически значимое увеличение уровня кортикостерона в сыворотке крови крыс контрольной стрессированной группы по сравнению с нестрессированными животными свидетельствует о развитии стадии резистентности стресс-реакции в использованной нами модели [72, 78].

В ходе исследования было установлено, что использованная в работе модель стресса вызывала изменение состава микробиоты толстой кишки крыс в виде снижения числа облигатных представителей. Кроме этого, отмечался рост количества *E. coli* со сниженной ферментативной активностью и других факультативных микроорганизмов родов *Proteus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Morganella*, *Candida*. При этом после стрессирования у животных идентифицировались условно-патогенные микроорганизмы родов *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter* и *Staphylococcus aureus*, ранее не выявляемые у контрольной нестрессированной группы крыс.

При этом стрессорное воздействие не влияло на степень доминирования и частоту встречаемости облигатных представителей толстокишечного микробиоценоза, однако значения данных показателей для

факультативных бактерий существенно возросли, что способствовало изменению структуры популяции биотопа толстой кишки за счет роста доли условно-патогенных микроорганизмов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что использованная в работе модель хронического стресса вызывала формирование стрессиндуцированного дисбиоза толстой кишки.

Установленные нарушения относительного динамического равновесия экосистемы толстой кишки согласуются с современными представлениями о кишечно-мозговой оси и во многом обусловлены морфофункциональным состоянием кишечной стенки [93, 141, 149, 177, 243].

Полученные в работе морфометрические показатели стенки толстой кишки позволили установить перестройку тканевых структур в условиях хронического иммобилизационного стресса, характер которой согласуется с современными концепциями о провоспалительном эффекте стресс-реакции на ЖКТ [42, 128, 196].

При этом выявленные в нашей работе после 14 дней стрессорного воздействия морфологические нарушения имеют признаки экссудативного воспалительного процесса и объясняются типичными проявлениями собственно стрессорной реакции в виде истинного (капиллярного) стаза, изменения клеточной и параклеточной проницаемости, увеличения образования полиморфоядерных лейкоцитов и их выхода из костного мозга. В основе установленных изменений могут находиться следующие механизмы [77]. Известно, что стрессорное воздействие определенной силы и продолжительности может уменьшать противовоспалительный эффект блуждающего нерва [218]. При дальнейшем нарастании стресс-реакции подключаются эндокринные механизмы с активацией кортикотропин-рилизинг гормона, который способствует нарушению проницаемости кишки и индуцирует синтез гормонов коры надпочечников [241]. Кортикостероды в свою очередь способствуют снижению экспрессии белка плотного соединения зонулина на фоне повышения продукции фактора некроза

опухоли и разрушения межклеточных контактов, приводя к транслокации комменсальных бактерий и активации местного иммунитета [119, 219, 259].

Кроме того, увеличение параклеточной проницаемости слизистой оболочки кишки вызывает токсическое действие продуктов метаболизма и гибели представителей толстокишечного микробиоценоза [119].

Установленное по результатам данного исследования изменение количества и функциональной активности тучных клеток согласуется с их регуляторной ролью в отношении секреторной активности и локальной гемодинамики, а также провоспалительным действием гистамина [80].

Отмеченные атрофические изменения в виде уменьшения глубины крипт и числа бокаловидных клеток могли являться следствием деструктивных нарушений, обусловленных нарушением моторной и эвакуационной функций толстой кишки, ишемией ее слизистой оболочки в условиях изменения микроциркуляции при стрессе [138, 242].

Таким образом, использованная в работе модель хронического стресса способствует изменениям видового и количественного состава пристеночной микробиоты на фоне развития в стенке толстой кишки морфологических изменений воспалительного и атрофически-деструктивного характера [77].

Выбор гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro для коррекции стрессиндуцированных нарушений состава толстокишечного микробиоценоза был обусловлен следующими обстоятельствами.

Во-первых, в пептид обладает анксиолитическим действием и может корректировать тревожные расстройства, обусловленные различным по продолжительности стрессорным воздействием [15, 16, 21]. Данный эффект препарата может реализовываться с участием центральных механизмов его действия. Во-вторых, для АКТГ₄₋₇-PGP установлены и периферические эффекты за счет его взаимодействия с меланокортиновыми рецепторами, которые могли играть важную роль в нашем исследовании. Кроме того, АКТГ₄₋₇-PGP оказывает существенное влияние на фагоцитирующие клетки и обладает выраженным иммуномодулирующим действием [71, 82]. Поэтому

описанный широкий спектр физиологических эффектов АКТГ₄₋₇-PGR, характерный для регуляторных пептидов, обусловил выбор данного препарата в качестве средства коррекции стрессиндуцированных морфологических и функциональных изменений исследованных в работе показателей.

Выбор используемых в экспериментах доз АКТГ₄₋₇-PGR осуществляли на основании литературных данных. Известно, что наиболее значимые анксиолитический и антидепрессантный эффекты гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro определяются при его интраперитонеальном введении в дозах 0,05 мг/кг и 0,4 мг/кг [15, 16, 21]. В клинической практике введение гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (семакса), как и других препаратов, синтезированных на базе регуляторных пептидов, осуществляется интраназально с целью снижения их биodeградации протеазами. У лабораторных животных вышеуказанный способ введения лекарственного средства достаточно неудобен из-за чихательного рефлекса крыс и его дополнительного неконтролируемого стрессорного воздействия. При этом установлено, что фармакологическая эффективность внутрибрюшинного применения аналогична интраназальному вследствие сходной биodeградации ферментами пептидных молекул и распределения по определенным отделам головного мозга к их мишеням [35, 48, 49]. Также важно отметить, что внутрибрюшинное введение позволяет более точно вводить необходимую дозу препарата в организм животного.

При анализе механизмов выявленных эффектов АКТГ₄₋₇-PGR важно отметить, что после введения пептида в течение 14 суток наблюдалось статистически значимое уменьшение содержания кортикостерона в сыворотке крови по сравнению с контрольной стрессированной группой, имевшее дозозависимый характер. Данное существенное снижение концентрации кортикостерона в сыворотке крови стрессированных крыс может отражать ослабление стрессорного воздействия вследствие анксиолитического эффекта пептида.

Полученные в работе результаты позволили установить, что введение АКТГ₄₋₇-PGR приводит к нивелированию стрессиндуцированных изменений состава микробиоты толстой кишки вследствие увеличения числа облигатных микроорганизмов данного биотопа лактобактерий, бифидобактерий, кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью и снижения количества условно-патогенных бактерий. Также при использовании пептида отмечалось снижение таких показателей для факультативных микроорганизмов как относительное среднее и частота встречаемости. В частности, применение АКТГ₄₋₇-PGR в дозах 5 и 450 мкг/кг значительно не повлияло на структуру микробиоценоза толстой кишки, тогда как при введении гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro в дозах 50 мкг/кг и 150 мкг/кг изучаемые показатели имели значения, сходные с соответствующими в контрольной нестрессированной группе, что указывает на высокую эффективность корректирующего действия препарата в отношении стрессиндуцированного дисбиоза.

Известно, что динамическое равновесие относительного постоянства микробиоценоза в значительной степени зависит от морфофункционального состояния толстой кишки [90, 119, 204, 221, 250]. Полученные нами данные показали, что применение АКТГ₄₋₇-PGR дозозависимо корректирует стрессиндуцированные патоморфологические изменения в стенке толстой кишки за счет снижения количества клеток воспалительного инфильтрата и изменения функциональной активности тучных клеток.

Установленные нарушение состава микробиоты толстой кишки и ее стенки могут быть обусловлены центральным нейротроопным действием АКТГ₄₋₇-PGR, так периферическими эффектами пептида.

В частности, в основе периферического действия АКТГ₄₋₇-PGR могли находиться следующие механизмы. Известно, что введение АКТГ₄₋₇-PGR при многократном иммобилизационном стрессе оказывает противотромбическое действие. Исходя из того, что в условиях стрессорного воздействия активируется свертывающая система крови и

изменение реологических ее свойств в микроциркуляторном русле, применение АКТГ₄₋₇-PGR может способствовать снижению ишемических повреждений стрессорного генеза за счет повышения антикоагулянтной и суммарной фибринолитической активности [24, 28, 41]. Следующим механизмом протекторного действия пептида может являться его воздействие на деформируемость эритроцитов при ишемии и, соответственно, на реологические свойства крови, что за счет улучшения микроциркуляции в тканях может оказывать позитивное влияние на их способность к регенерации [64]. Высокий уровень регенерации всех слоев толстокишечной стенки является одним из важных условий резистентности ее к провоспалительным факторам, которыми в нашем исследовании являются увеличение негативного воздействия определенных представителей пристеночной микробиоты и изменение микроциркуляции в стенке кишечника.

Значительную роль в патогенезе установленных изменений стрессорного генеза и в стресслимитирующем действии АКТГ₄₋₇-PGR могут иметь иммунные механизмы. Известно, что применение АКТГ₄₋₇-PGR у стрессированных крыс восстанавливало показатели фагоцитарной активности и лейкоцитарной формулы, уменьшая деструктивные и макрофагально-пролиферативные процессы в селезенке [71, 84]. Поэтому эффекты пептида на состояние слизистой оболочки толстой кишки могут быть обусловлены его иммуномодуляторным действием в условиях стресса.

Кроме того, влияние АКТГ₄₋₇-PGR на стресс-реакцию может реализовываться за счет действия пептида на симпатическую иннервацию, т.к. введение пептида способствует снижению прироста симпатической иннервации за счет уменьшения плотности адренорецепторов в хвостовой артерии крыс [30].

Важную роль в развитии установленных эффектов пептида могут играть центральные механизмы его действия. Известно, что введение АКТГ₄₋₇-PGR оказывает существенное влияние на различные функции нервной

системы [21, 37]. Поэтому, учитывая тесные коммуникативные взаимоотношения между состоянием центральной нервной системы и желудочно-кишечным трактом, в частности, с толстокишечной микробиотой, нами было выполнено исследование поведенческой активности после введения АКТГ₄₋₇-PGP в условиях стресса.

Поведение экспериментальных животных изучали до начала стрессорного воздействия и после его окончания. Установлено, что исходные значения исследуемых показателей во всех опытных группах до стрессирования не имели статистически значимых отличий, что свидетельствует об одинаковых исходных условиях эксперимента и адекватном распределении животных.

В условиях иммобилизационного стресса у животных наблюдалось увеличение уровня тревожности, которое проявлялось достоверным увеличением времени нахождения в закрытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта и уменьшением количества свешиваний из открытых рукавов установки. Кроме этого, о повышении тревожности свидетельствует и увеличение горизонтальной двигательной активности, эмоциональности в виде роста числа уринаций и фекальных болюсов, а также актов короткого груминга в тесте открытого поля.

Применение АКТГ₄₋₇-PGP у стрессированных крыс способствовало изменению поведенческой активности в открытом поле, выраженность которого имела дозозависимый характер. Так, использование пептида в дозе 5 мкг/кг не оказывало существенного влияния на поведенческие реакции у крыс по сравнению с контрольной группой. Использование гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro в дозе 50 мкг/кг способствовало снижению эмоциональности в виде сокращения количества уринаций и уменьшения актов короткого груминга. В дозе 150 мкг/кг отмечалось снижение двигательной активности в центральной части установки на фоне уменьшения числа уринаций и отсутствия короткого груминга. Увеличение

применяемой дозы нейропептида до 450 мкг/кг приводило к нивелированию выявленных эффектов препарата в дозах 50 и 150 мкг/кг.

При анализе полученных при тестировании в открытом поле данных следует учитывать, что в его основе находится конфликт двух мотиваций: инстинктивной ориентировочно-исследовательской активности животных в новом окружении и страха опасности от такового [6]. Известно, что наиболее информативным показателем панической реакции у животных является короткий груминг, снижение которого может быть проявлением уменьшения тревоги. Поэтому на основании полученных данных можно полагать, что наибольшее снижение уровня тревоги и страха в открытом поле отмечалось после применения АКТГ₄₋₇-PGR в дозе 150 мкг/кг. Кроме того, в данной подопытной группе отмечалось достоверное снижение количества уринаций, свидетельствующее об уменьшении эмоциональности животных.

При применении минимальной и максимальной используемых в эксперименте доз (5 и 450 мкг/кг) число актов короткого груминга и количество уринаций не изменялось, что указывает на отсутствие корректирующего влияния введения АКТГ₄₋₇-PGR на выраженность страха у крыс.

В приподнятом крестообразном лабиринте эффекты АКТГ₄₋₇-PGR имели анксиолитическую направленность и зависели от используемой дозы. При этом введение пептида в дозах 50 и 150 мкг/кг оказывало наибольший корректирующий эффект и способствовало снижению тревожности стрессированных крыс до уровня нестрессированного контроля.

Таким образом, на основании полученных в экспериментах в открытом поле и приподнятом крестообразном лабиринте данных можно заключить, что применение АКТГ₄₋₇-PGR в дозах 50 и 150 мкг/кг оказывало значительное влияние на уровень стрессиндуцированной тревожности у крыс, тогда как в дозах 5 и 450 мкг/кг эффекты пептида имели слабовыраженный неустойчивый характер. Данный характер зависимости выраженности и направленности нейротропного действия АКТГ₄₋₇-PGR от

использованной дозы известен как U-эффект и описан для целого ряда регуляторных пептидов. В данном случае его механизм представляется следующим. Известно, что передача сигнала с меланокортиновых рецепторов осуществляется за счет взаимодействия с аденилатциклазой и активации цАМФ-сигнального пути. Однако пути передачи сигнала могут зависеть от концентрации лиганда и передаваться с включением других систем вторичных мессенджеров. В частности, сигнал с меланокортиновых рецепторов 3 типа может передаваться по фосфоинозитольному пути [181], а с меланокортиновых рецепторов 5 типа с участием Jak/STAT [113].

Нейротропное действие гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro может осуществляться вследствие роста концентрации нейротрофинов в определенных отделах ЦНС и активации самой системы биогенных аминов [47]. Так, введение АКТГ₄₋₇-PGP способствовало увеличению концентрации BDNF в тканях мозга, который оказывает влияние на созревание нейронов и на процессы обучения и памяти [209, 211, 235]. Кроме того, данный нейротрофический фактор участвует в регуляции тревожных и стрессорных расстройств и за счет изменения его экспрессии может реализовываться анксиолитический эффект АКТГ₄₋₇-PGP [21]. Участие в модуляции реакции тревоги и депрессии у экспериментальных животных также возможно вследствие влияния пептида на серотонин-, норадрен- и дофаминергическую системы головного мозга [12, 46, 236].

Таким образом, описанные нейротропные и иммунокорригирующие эффекты АКТГ₄₋₇-PGP могут приводить к восстановлению динамического равновесия замкнутой системы: слизистая оболочка толстой кишки - пристеночная микробиота, способствуя эффективной коррекции стрессиндуцированного дисбиоза данного биотопа.

С целью выявления функциональных взаимосвязей между изучаемыми показателями функций нервной системы и состава микробиоты толстой кишки был проведен корреляционный анализ полученных данных. При этом

в корреляционных плеядах были представлены только статистически достоверные и патогенетически обоснованные взаимосвязи.

В группе нестрессированных контрольных крыс достоверно значимые прямые взаимосвязи установлены между уровнем кортикостерона в сыворотке крови и числом актов короткого груминга, количеством уринаций, временем, проведенным в закрытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта, а для количества лактобацилл данная связь носила обратный характер. Вероятно, положительные взаимосвязи между уровнем кортикостерона и коротким грумингом, а также временем нахождения в закрытых рукавах установки отражает повышенный уровень тревожности (фрустрации) у животных. В данном случае, характер установленных взаимосвязей между вышеуказанными показателями может быть проявлением нейрофизиологических особенностей инбрендных крыс Вистар которым характерен высокий тревожно-фобический уровень [84].

При этом отрицательные связи между содержанием лактобактерий и временем нахождения в закрытых рукавах ПКЛ, числом уринаций, коротким грумингом указывает на наличие взаимосвязей между уровнем тревожности и количеством облигатных представителей толстокишечного микробиоценоза. Морфометрические показатели состояния толстой кишки имели корреляционные взаимосвязи только между собой.

На основании данных корреляционного анализа исследованных показателей у контрольных нестрессированных крыс можно заключить, что между состоянием толстокишечной микробиоты, нервной системы и содержанием кортикостерона в сыворотки крови существуют значимые взаимосвязи, определенное значение в формировании которых имеют уровень тревожности и активация стресс-реакции.

Иммобилизационный стресс вызвал формирование значительного количества новых взаимосвязей не только внутри групп изучаемых показателей, но и между ними. Подобное явление может быть следствием активации адаптационных реакций в организме, включающих

стрессреализующую (СРС) и стресслимитирующие системы (СЛС). В целом, характер выявленных корреляционных связей может свидетельствовать о значительной стрессиндуцированной перестройке взаимоотношений в кишечно-мозговой оси. При этом часть взаимосвязей, установленная в контрольной нестрессированной группе, сохранялась, представляя собой стабильную малоизменяющуюся составляющую данных взаимоотношений.

Использование АКТГ₄₋₇-PGR в дозе 5 мкг/кг оказывало существенное влияние на характер и число связей, вызванных стрессорным воздействием, которые были сходны с таковыми у крыс группы нестрессированного контроля, что свидетельствует о стресскорригирующем действии пептида. При этом определялась прямая корреляционная связь между количеством кортикостерона и числом плазмоцитов, которое сильно прямо коррелировало с коротким грумингом и числом уринаций. Остальные морфометрические показатели не имели достоверных взаимосвязей с показателями состояния микробиоценоза и нервной системы. Однако, прямые связи между числом тучных клеток, лимфоцитов, макрофагов и нейтрофилов могут отражать эффекты АКТГ₄₋₇-PGR в отношении иммунных клеток, участвующих в воспалительной реакции [71, 82].

Связь между состоянием микробиоты и функциями нервной системы в данной опытной группе отражалась в наличии умеренной прямой корреляционной взаимосвязи среди количества бифидобактерий и числа вставаний в периферических квадратах. Данные факты позволяют предполагать наличие связи между ориентировочно-исследовательской активностью животных и содержанием облигатных представителей микробиоценоза толстой кишки.

Кроме того, следует отметить сохранение положительных связей уровня кортикостерона с количеством уринаций и актов короткого груминга. Последний в свою очередь умеренно обратно коррелировал с количеством свешиваний в открытых рукавах, что является следствием отражения в данных поведенческих реакциях уровни тревожности у крыс.

При применении АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 50 мкг/кг направленность корреляционных взаимосвязей по сравнению двумя предыдущими группами существенно изменялась. Так, в отличие от группы животных, получавших пептид в дозе 5 мкг/кг, были установлены связи между показателями клеточной инфильтрации и поведенческими показателями в тесте открытого поля. При этом количество плазмоцитов и макрофагов прямо коррелировало с коротким грумингом, числом уринаций и фекальных болюсов. Отрицательные взаимоотношения между количеством лактобактерий и количеством фекальных болюсов указывают на наличие взаимосвязей между эмоциональным состоянием крыс и содержанием облигатных бактерий.

Введение АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 150 мкг/кг вызывало значительное увеличение количества и силы связей между показателями, характеризующими состояние толстокишечной микробиоты. В отличие от двух предыдущих групп, в данном случае показатели микробиоценоза сильно коррелировали не только с поведенческими показателями в открытом поле, но и в ПКЛ. Так, бифидобактерии, лактобациллы и кишечные палочки с нормальной ферментативной активностью имели положительную корреляционную взаимосвязь с временем проведенным в открытых рукавах установки ПКЛ, а бифидобактерии обратно коррелировали со временем в закрытых рукавах. Последний показатель, отражающий уровень тревожности у экспериментальных животных, имел прямые сильные корреляционные взаимосвязи с количеством макрофагов, нейтрофилов и содержанием кортикостерона. Следует отметить, что в данной подопытной группе уровень кортикостерона обратно коррелировал со всеми облигатными микроорганизмами толстокишечного биотопа: лактобациллами, бифидобактериями, кишечными палочками с нормальной ферментативной активностью. При этом обратная связь данных представителей микробиоценоза с количеством актов короткого груминга также может свидетельствовать о наличии выраженной взаимосвязи между состоянием тревожности и составом микробиоты.

Таким образом, после применения АКТГ₄₋₇-PGR в дозе 150 мкг/кг установлены достоверные взаимосвязи поведенческих показателей, отражающих уровень тревожности у крыс с состоянием микробиоты и стенки толстой кишки. При этом выявлен существенный рост числа сильных разнонаправленных связей между гистологическими показателями, характеризующими клеточную инфильтрацию и участвующими в развитии экссудации, и представителями микробиоценоза на фоне их устойчивых взаимоотношений с поведенческими показателями.

Дальнейшее увеличение используемой дозы АКТГ₄₋₇-PGR до 450 мкг/кг приводило к существенному снижению количества и характера взаимосвязей между уровнем кортикостерона, микробиологическими, поведенческими и морфометрическими показателями. При этом содержание кортикостерона прямо коррелировало с временем нахождения в периферических квадратах и обратно - с количеством пересеченных центральных квадратов, временем, проведенным в них, и числом периферических вставаний. В общей сложности, в данной группе отмечается наличие корреляционных взаимосвязей лишь внутри групп поведенческих и гистологических показателей. Выявленное множество взаимосвязей в предыдущих группах (особенно при использовании АКТГ₄₋₇-PGR в дозах 50 и 150 мкг/кг) в данном случае нивелировалось.

На основании вышеизложенных данных можно заключить, что в условиях хронического иммобилизационного стресса формируются значительные изменения в составе толстокишечного микробиоценоза и в функциональном состоянии нервной системы, которые отражаются в корреляционных взаимосвязях между ними. Состояние микробиоты в условиях стресса характеризовалось сокращением содержания облигатных представителей биотопа толстой кишки и их доли в популяции на фоне роста количества условно-патогенных бактерий, их частоты встречаемости и относительного среднего. Важно отметить, что данный характер изменений состава микробиоты был установлен после ежедневной иммобилизации в

течение 14 дней на фоне развития стресса стадии резистентности. Поэтому можно предположить, что в данных условиях в оси кишечник-мозг функциональные сдвиги происходили в направлении от нервной системы к кишечнику. Дисбиотические нарушения к окончанию эксперимента, вероятно, только начинали формироваться и могли оказывать значительного влияния на функциональное состояние ЦНС. В связи с этим представляется необходимым дальнейшее изучение взаимоотношений между составом толстокишечного микробиоценоза и состоянием функций центральной нервной системы при более продолжительном стрессорном воздействии.

Использование АКТГ₄₋₇-PGR приводило к нормализации видового и количественного состава микробиоценоза, изменению поведенческой активности, проявляющееся снижением тревожности и уменьшением содержания кортикостерона у животных. Одним из важных результатов выполненной работы является доказательство дозозависимого корректирующего действия АКТГ₄₋₇-PGR в отношении стрессиндуцированных изменений исследованных показателей, в основе которого могут находиться как центральные, так и периферические механизмы. Полученные опытным путем данные о состоянии регуляторных систем макроорганизма таких, как иммунная, нервная, эндокринная позволяют предполагать формирующийся в стрессорных условиях дисбиоз проявлением дизрегуляторной патологии [38]. Поэтому важным результатом нашей работы является патогенетическое обоснование терапии данных расстройств препаратами, созданными на основе регуляторных пептидов, обладающих полифункциональной активностью.

Таким образом, при хроническом иммобилизационном стрессе и в условиях использования АКТГ₄₋₇-PGR выявлены значительные изменения состояния микробиоты, стенки толстой кишки и функциональных показателей нервной системы, между которыми существуют корреляционные взаимоотношения различной силы и направленности.

ВЫВОДЫ

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

2. Применение пептида АКТГ₄₋₇-PGR в дозах 50 мкг/кг и 150 мкг/кг корректировало стрессиндуцированный дисбиоз вследствие роста количества и доли облигатных представителей микробиоты кишечника, а также снижения удельного содержания факультативных микроорганизмов, частоты их встречаемости и доли в исследуемой популяции.

3. Морфофункциональное состояние толстой кишки после ХИС характеризовалось развитием атрофических проявлений, признаками экссудативного воспаления, увеличением числа и изменением функциональной активности тучных клеток. Применение АКТГ₄₋₇-PGR вызывало дозозависимое нивелирование стрессиндуцированных патоморфологических изменений в стенке толстой кишки.

4. Введение пептида АКТГ₄₋₇-PGR в условиях ХИС способствовало коррекции стрессиндуцированных сдвигов в поведении у крыс в виде уменьшения уровней тревожности и эмоциональности (в дозах 50 и 150 мкг/кг), горизонтальной двигательной активности (в дозе 150 мкг/кг). Характер эффектов пептида при этом имел анксиолитическую направленность.

5. Применяемая в нашем исследовании модель иммобилизационного стресса способствовала росту концентрации в сыворотке крови кортикостерона, характерному для стресс-реакции в стадии резистентности.

Применение АКТГ₄₋₇-PGR во всех использованных дозах вызывало значительное снижение уровня гормона в крови экспериментальных животных.

6. ХИС способствовал формированию многочисленных корреляционных связей различной направленности и силы между исследованными показателями, отражающих развитие стрессиндуцированных сдвигов в организме. Введение стрессированным крысам АКТГ₄₋₇-PGR оказывало влияние дозозависимой направленности на характер корреляционных взаимоотношений исследуемых параметров вследствие уменьшения числа связей и их направленности.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Учитывать установленные эффекты при введении пептида АКТГ₄₋₇-PGP в отношении состояния микробиоты толстой кишки на изученной модели в случае возможного его использования у пациентов, находящихся в условиях продолжительного стрессорного воздействия.

2. Использовать в учебном процессе медицинских и биологических ВУЗов данные о полифункциональности регуляторных пептидов на примере эффектов гептапептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКТГ	—	адренотропный гормон
АКТГ ₄₋₇ -PGP	—	метионин-глутамин-гистидин-фенилаланин-пролин-глицин-пролин
ВНС	—	вегетативная нервная система
ЖКТ	—	желудочно-кишечный тракт
КРФ	—	кортикотропин-рилизинг-фактор
МК	—	меланокортины
МСГ	—	меланоцитстимулирующие гормоны
ОП	—	открытое поле
СЛС	—	стресслимитирующая система
СРС	—	стрессреализующая система
ПКЛ	—	приподнятый крестообразный лабиринт
ХИС	—	хронический иммобилизационный стресс
ХВЗК	—	хронические воспалительные заболевания кишки
ЦНС	—	центральная нервная система
ЭНС	—	энтеральная нервная система
BDNF	—	brain-derived neurotrophic factor
GALT	—	gut-associated lymphoid tissue
IFN	—	interferon
IL	—	interleukin
TLR	—	toll-like receptors
MCR	—	melanocortin receptor

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аналог АКТГ(4-10) – стимулятор обучения пролонгированного действия / М. А. Пономарева-Степная, В. Н. Незавибатько, Л. В. Антонова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 1984. – № 7. – С. 790–795.
2. Бельмер С. В. Роль кишечной микрофлоры в обеспечении организма фолиевой кислотой, витаминами В12 и К / С. В. Бельмер // Вопросы современной педиатрии. – 2005. – Т. 4, № 5. – С. 74–76.
3. Богданова, Е. А. Исследование пристеночной микрофлоры желудочно-кишечного тракта крыс при пероральном введении пробиотических препаратов / Е. А. Богданова, Ю. В. Несвижский, А. А. Воробьев // Вестник РАМН. – 2006. – № 2. – С. 6–10.
4. Бондаренко, В. М. Дисбактериоз кишечника как клинико-лабораторный синдром: современное состояние проблемы / В. М. Бондаренко, Т. В. Мацулевич. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 304 с.
5. Бондаренко, В. М. Патогенетические механизмы и принципы терапии заболеваний, связанных с нарушением взаимосвязей кишечно-мозговой оси / В. М. Бондаренко, Е. В. Рябиченко // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. – 2013. – № 4. – С. 1–15.
6. Буреш, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон. – Москва: Высшая школа, 1991. – 268 с.
7. Взаимодействие трипептида Pro–Gly–Pro, меченного по С-концевому остатку пролина, с плазматическими мембранами мозга крыс / Т. В. Вьюнова, К. В. Шевченко, В. П. Шевченко [и др.] // Доклады Академии наук. – 2008. – Т. 419, № 1. – С. 136–137.
8. Власова, И. М. Спектроскопические флуоресцентные методы исследований нейропротекторных свойств препарата семакс при

- ишемическом инсульте / И. М. Власова, А. М. Салецкий // Альманах клинической медицины. – 2008. – № 17-1. – С. 45–48.
9. Влияние аналога АКТГ на процессы обучения и памяти у крыс / В. М. Гецова, Н. В. Орлова, А. А. Фоломкина [и др.] // Журнал высшей нервной деятельности имени И. П. Павлова. – 1988. – Т. 38, № 6. – С. 1041–1047.
 10. Влияние олигопептидов на спонтанный канцерогенез у мышей / В. К. Мешавкин, Н. В. Кост, О. Ю. Соколов [и др.] // Доклады Академии наук. – 2013. – Т. 449, № 4. – С. 480–483.
 11. Влияние семакса на гомеостаз слизистой оболочки желудка белых крыс / С. Е. Жуйкова, Е. А. Смирнова, З. В. Бакаева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2000. – № 9. – С. 300–302.
 12. Влияние Семакса на дофамин- и серотонинергические системы мозга / К. О. Еремин, В. С. Кудрин, И. А. Гривенников [и др.] // Доклады Академии наук. – 2004. – Т. 394, № 1. – С. 130–132.
 13. Влияние Семакса на индометациновое язвообразование у крыс и один из возможных механизмов его действия / С. Е. Жуйкова, В. И. Сергеев, Г. Е. Самонина [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 133, № 6. – С. 665–667.
 14. Влияние Семакса на содержание и обмен моноаминов в мозге мышей линии C57/BL / К. О. Еремин, В. С. Кудрин, Л. А. Андреева [и др.] // Нейрохимия. – 2002. – Т. 19, № 3. – С. 202–205.
 15. Влияние Семакса на эмоциональное состояние белых крыс в норме и на фоне действия холецистокинина-тетрапептида / Н. Г. Левицкая, Д. А. Виленский, Е. А. Себенцова // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2010. – № 2. – С. 231–237.
 16. Влияние хронического введения Семакса на исследовательскую активность и эмоциональное состояние белых крыс / Д. А. Виленский, Н. Г. Левицкая, Л. А. Андреева [и др.] // Российский физиологический журнал имени И. М. Сеченова. – 2007. – Т. 93, № 6 – С. 661–669.

17. Воеводин, Д. А. Дисбактериоз и иммунопатологический процесс / Д. А. Воеводин, Г. Н. Розанова, Н. А. Стенина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2005. – № 2. – С. 89–92.
18. Временная динамика экспрессии генов нейротрофического фактора мозга и фактора роста нервов в гиппокампе и лобной коре крыс под действием Семакса / Т. Ю. Агапова, Я. В. Агниуллин, Д. Н. Силачев [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. – 2008. – № 3. – С. 28–32.
19. Высокостабильные регуляторные олигопептиды: опыт и перспективы применения / И. П. Ашмарин, З. В. Бакаева, Б. В. Васьковский [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2003. – № 4. – С. 2–7.
20. Гаркави, Л. Х. Антистрессорные реакции и активационная терапия (Реакция активации как путь к здоровью через процессы самоорганизации) / Л. Х. Гаркави, Е. Б. Квакина, Т. С. Кузьменко. – Москва : ИМЕДИС, 1998. – 656 с.
21. Гептапептид семакс ослабляет последствия непредсказуемого хронического стресса у крыс / К. А. Яценко, Н. Ю. Глазова, Л. С. Иноземцева [и др.] // Доклады Академии наук. – 2013. – Т. 453, № 5. – С. 581–585.
22. Гржибовский, А. М. Корреляционный анализ / А. М. Гржибовский // Экология человека. – 2008. – № 9. – С. 50–59.
23. Гривенников, И. А. Факторы пептидной природы в процессах пролиферации, дифференцировки и поддержания жизнеспособности клеток нервной системы млекопитающих / И. А. Гривенников, О. В. Долотов, Ю. И. Гольдина // Молекулярная биология. – 1999. – Т. 33, № 1. – С. 120–126.
24. Григорьева, М. Е. Противосвертывающие и антитромбоцитарные эффекты препарата "семакс" в условиях острого и хронического

- иммобилизационного стресса / М. Е. Григорьева, Л. А. Ляпина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 149, № 1. – С. 49–52.
25. Действие Семакса и его С-концевого трипептида RGR на экспрессию генов факторов роста и их рецепторов в условиях экспериментальной ишемии мозга крыс / В. Г. Дмитриева, Л. В. Дергунова, О. В. Поварова [и др.] // Доклады Академии наук. – 2008. – Т. 422, № 2. – С. 258–261.
 26. Зависимость отставленных эффектов аналога АКТГ 4–10 Семакса от сроков его неонатального введения / Е. А. Себенцова, Н. Ю. Глазова, Н. Г. Левицкая [и др.] // Российский физиологический журнал имени И. М. Сеченова. – 2005. – Т. 91, № 2. – С. 122–131.
 27. Заквасочные культуры лактобацилл – продуценты нейромедиаторов: биогенных аминов и аминокислот / А. В. Олескин, О. Г. Жиленкова, Б. А. Шендеров [и др.] // Молочная промышленность. – 2014. – № 9. – С. 42–43.
 28. Защитные противотромботические эффекты пролинсодержащих пептидов при стрессогенных воздействиях на организм животных / Л. А. Ляпина, М. Е. Григорьева, Л. А. Андреева [и др.] // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2010. – № 4. – С. 462–467.
 29. Защитные функции микрофлоры кишечника / С. А. Крамарев, О. В. Выговская, Д. С. Янковский [и др.] // Новости медицины и фармации. Гастроэнтерология. – 2008. – № 251. – С. 62–67.
 30. Изменение симпатической иннервации хвостовой артерии крысы при экспериментальном инфаркте миокарда; влияние пептида "семакс" / А. М. Горбачева, А. Б. Бердалин, А. Н. Стулова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 161, № 4. – С. 462–468.
 31. Изменение экспрессии генов внутриклеточных сигнальных путей в гиппокампе крыс под действием пептида Семакс / Т. Ю. Агапова, Я. В.

- Агниуллин, Д. Н. Силачев [и др.]// Доклады Академии наук. – 2007. – Т. 417, № 4. – С. 550–552.
32. Изучение особенностей связывания нейропептида Семакс, меченного по концевому остатку пролина, с плазматическими мембранами мозга крыс / Т. В. Вьюнова, К. В. Шевченко, В. П. Шевченко [и др.] // Нейрохимия. – 2006. – Т. 23, № 1. – С. 57–62.
33. Ингибирующее действие семакса и селанка на энкефалиндеградирующие ферменты сыворотки крови человека / Н. В. Кост, О. Ю. Соколов, М. В. Габаева [и др.] // Биоорганическая химия. – 2001. – Т. 27, № 3. – С. 180–183.
34. Исследование протеолиза аминокпептидазами аналогов Семакса с разными N-концевыми аминокислотами / К. В. Шевченко, Т. В. Вьюнова, И. Ю. Нагаев [и др.] // Биоорганическая химия. – 2011. – Т. 37, № 4. – С. 475–482.
35. Исследование спектра физиологической активности аналога АКТГ4-10 гептапептида семакс / Н. Г. Левицкая, Н. Ю. Глазова, Е. А. Себенцова [и др.] // Нейрохимия. – 2008. – Т. 25, № 1. – С. 111–118.
36. Кишечная микробиота человека и нейродегенеративные заболевания / Б. А. Шендеров, В. Л. Голубев, А. Б. Данилов [и др.] // Поликлиника. – 2016. – № 1. – С. 7–13.
37. Королева, С. В. Семакс – универсальный препарат для терапии и исследований / С. В. Королева, Н. Ф. Мясоедов // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2018. – № 6. – С. 1–13.
38. Крыжановский, Г. Н. Дизрегуляционная патология / Г. Н. Крыжановский // Патологическая физиология. – 2002. – № 3. – С. 2–19.
39. Кузнецов, О. Ю. Бактериальная колония как сложно организованное сообщество клеток / О. Ю. Кузнецов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2005. – № 2. – С. 3–7.

40. Левицкая, Н. Г. Меланокортиновая система / Н. Г. Левицкая, А. А. Каменский // Успехи физиологических наук. – 2009. – Т. 40, № 1. – С. 44–65.
41. Ляпина, Л. А. Функциональное состояние противосвертывающей системы при воздействии на организм регуляторных пептидов Pro-Gly, Pro-Gly-Pro, семакса и тафцина в соединении с природным гепарином / Л. А. Ляпина, В. Е. Пасторова, Т. Ю. Оберган // Нейрохимия. – 2008. – Т. 25, № 1–2. – С. 23–29.
42. Мамылина, Н. В. Влияние эмоционально-болевого стресса на уровень провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в ткани костного мозга у экспериментальных животных / Н. В. Мамылина, В. И. Павлова // Вестник Южно-Уральского государственного гуманитарно-педагогического университета Вестник Южно-Уральского государственного гуманитарно-педагогического университета. – 2011. – №12-2. – С. 296–303.
43. Минушкин, О. Н. Нарушение баланса микрофлоры и ее коррекция / О. Н. Минушкин, Г. А. Елизаветина, М. Д. Ардатская // Эффективная фармакотерапия. – 2013. – Т. 41. – С. 16–20.
44. Морозов, В. Н. К современной трактовке механизмов стресса / В. Н. Морозов, А. А. Хадарцев // Вестник новых медицинских технологий. – 2010. – Т. XVII, № 1. – С. 15–17.
45. Нейропротективное и антиамнестическое действие семакса при экспериментальном ишемическом инфаркте коры головного мозга / Г. А. Романова, Д. Н. Силачев, Ф. М. Шакова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 142, № 12. – С. 618–621.
46. Нейропротекторные эффекты семакса на фоне МФТП-вызванных нарушений дофаминергической системы мозга / Н. Г. Левицкая, Е. А. Себенцова, Л. А. Андреева [и др.] // Российский физиологический журнал имени И. М. Сеченова. – 2002. – Т. 88, № 11. – С. 1369–1377.

47. Нейротрофические факторы. Перспективы применения в клинической неврологии / М. Г. Соколова, Т. М. Алексеева, С. В. Лобзин [и др.] // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета имени И. И. Мечникова. – 2014. – Т. 6, № 3. – С. 75–81.
48. Ноотропные и анальгетические эффекты семакса при различных способах введения / Д. М. Манченко, Н. Ю. Глазова, Н. Г. Левицкая [и др.] // Российский физиологический журнал имени И. М. Сеченова. – 2010. – Т. 96, № 10. – С. 1014–1023.
49. Ноотропный аналог адренотропного гормона 4-10 – семакс (15-летний опыт разработки и изучения) / И. П. Ашмарин, В. Н. Незавибатько, Н. Ф. Мясоедов [и др.] // Журнал высшей нервной деятельности имени И. П. Павлова. – 1997. – Т. 47, № 2. – С. 420–430.
50. Олескин, А. В. Биополитический подход к реабилитологии: потенциальная роль микробной нейрхимии / А. В. Олескин, Б. А. Шендеров // Вестник восстановительной медицины. – 2013. – №1. – С. 60–67.
51. Определение уровня тревожности у крыс: расхождение результатов в тестах «открытое поле», «крестообразный приподнятый лабиринт» и тесте Фогеля / С. К. Судаков, Г. А. Назарова, Е. В. Алексеева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155, № 3. – С. 268–269.
52. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» : ОСТ 91500.11.0004-2003 от 9.06.2003. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200119089>
53. Отставленные поведенческие эффекты хронического неонатального введения аналога АКТГ 4–10 Семакса детенышам белых крыс / Е. А. Себенцова, А. В. Денисенко, Н. Г. Левицкая [и др.] // Журнал высшей нервной деятельности имени И. П. Павлова. – 2005. – Т. 55, №2. – С. 213–220.

54. Оценка состояния микробиоценоза толстой кишки экспериментальных животных в условиях иммобилизационного стресса / А.Ю. Мухина, О.А. Медведева, М.В. Свищева // Астраханский медицинский журнал. – 2019. – Т. 14, № 1. – С. 54-60.
55. Плоскирева, А. А. Системный подход к оценке микробиоценоза желудочно-кишечного тракта при острых кишечных инфекциях у детей / А. А. Плоскирева, А. В. Горелов // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – С. 151–165.
56. Подковкин, В. Г. Влияние краткосрочной изоляции на поведение крыс в тесте «открытое поле» / В. Г. Подковкин, Д. Г. Иванов // Успехи современного естествознания. – 2009. – № 6. – С. 817–818.
57. Правдивцева, М. И. Влияние экзополисахаридов лактобацилл на микрофлору толстого отдела кишечника самок крыс при различных видах стресса / М. И. Правдивцева, Л. В. Карпунина, М. Д. Сметанина // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. – 2011. – № 11. – С. 89–93.
58. Роль микрофлоры кишечника, состава пищи, GPR41- и GPR43-рецепторов к короткоцепочечным жирным кислотам в энергетическом обмене позвоночных животных // И. Н. Тюренков, Д. В. Куркин, Е. В. Волотова [и др.] / Успехи физиологических наук. – 2017. – Т.48, № 2. – С. 100–112.
59. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. I / под ред. А. Н. Миронова. – Москва : Грифф и К, 2012. – 944 с.
60. Связывание аналога АКТГ-4-10-гептапептида семакс с плазматическими мембранами базальных ядер переднего мозга крысы и его биodeградация / О. В. Долотов, Ю. А. Золотарев, Е. М. Дорохова [и др.] // Биоорганическая химия. – 2004. – Т. 30, № 3. – С. 241–246.
61. Семакс и его С-концевой фрагмент PGP влияют на экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов в условиях неполной глобальной

- ишемии мозга крыс / В. В. Ставчанский, Т. В. Творогова, А. Ю. Бочина [и др.] // Молекулярная биология. – 2011. – Т. 45, № 6. – С. 1026–1035.
62. Семакс предотвращает гибель тирозингидроксилаза-положительных нейронов в смешанной нейроглиальной культуре клеток среднего мозга эмбрионов крысы в модели нейротоксического повреждения 6-гидроксидофамином / О. В. Долотов, К. О. Еремин, Л. А. Андреева [и др.] // Нейрохимия. – 2015. – Т. 32, № 4. – С. 317.
63. Семакс предупреждает повышение генерации оксида азота в мозге крыс, обусловленное неполной глобальной ишемией / О. Е. Фадюкова, А. А. Алексеев, В. Г. Башкатова [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2001. – Т. 64, №2. – С. 31–34.
64. Семакс увеличивает деформируемость эритроцитов сдвигом потока у интактных крыс и у крыс с ишемией головного мозга / О. Е. Фадюкова, А. Ю. Тюрина, А. Е. Луговцов [и др.] // Доклады Академии наук. – 2011. – Т. 439, № 5. – С. 1–4.
65. Семакс усиливает эффекты d-амфетамина на уровень внеклеточного дофамина в стриатуме крыс Спрег-Дуули и на локомоторную активность мышей C57Bl/6 / К. О. Еремин, П. Сарансаари, С. Ойя [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2004. – Т. 67, № 2. – С. 8–11.
66. Симонова, Е. В. Роль нормальной микрофлоры в поддержании здоровья человека / Е. В. Симонова, О. А. Пономарева // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2008. – № 8. – С. 20–25.
67. Сопоставление гастропротекторных свойств семакса и его метаболитов // З. В. Бакаева, К. Е. Багликова, П. А. Климова [и др.] / Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 2009. – № 4. – С. 3–7.
68. Состав микробиоты толстой кишки крыс на фоне применения пептида АКТГ₍₄₋₇₎-PGP (семакс) в условиях иммобилизационного стресса / Свищева М.В., Мухина А.Ю., Медведева О.А. [и др.] // Бюллетень

- экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 169, № 3. – С. 330-333.
69. Специфическое связывание Семакса в различных отделах мозга крыс / Т. В. Вьюнова, К. В. Шевченко, В. П. Шевченко [и др.] // Доклады Академии наук. – 2006. – Т. 410, № 1. – С. 1–2.
70. Сравнительное исследование анальгетической активности фрагмента АКТГ₄₋₁₀ и его аналога семакса / Д. М. Иванова, Н. Г. Левицкая, Л. А. Андреева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 143, № 1. – С. 8–12.
71. Стресс-протекторное и иммуномодулирующее действие семакса в условиях экспериментального информационного стрессе / А. Л. Ясенявская, М. А. Самотруева, Н. Ф. Мясоедов // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". – 2019. – № 2. – С. 57–64.
72. Типологические особенности поведения крыс / Н. Р. Григорьев, Т. А. Баталова, Е. Ф. Кириченко [и др.] // Российский физиологический журнал имени И. М. Сеченова. – 2007. – Т. 93, № 8. – С. 817–827.
73. Морфологические особенности толстой кишки крыс при стресс-индуцированном дисбиозе / А.Ю. Мухина, И.И. Бобынцев, О.А. Медведева [и др.] // Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье. – 2019. – № 2. – С. 80-86.
74. Морфофункциональное состояние толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса и при применении пептида АКТГ₍₄₋₇₎-PGR (семакса) / М.В. Свищева, Е.С. Мишина, О.А. Медведева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 170, № 9. – С. 383-387.
75. Физиологическое значение кишечной микрофлоры / С. Ю. Кучумова, Е. А. Полуэктова, А. А. Шептулин [и др.] // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2011. – Т. 21, № 5. – С. 17–27.

76. Формирование пространственной памяти у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры мозга; эффекты синтетического аналога АКТГ(4–7) / Д. Н. Силачев, С. И. Шрам, Ф. М. Шакова [и др.] // Журнал высшей нервной деятельности имени И. П. Павлова. – 2008. – Т. 58, № 4. – С. 458–466.
77. Функции кишечной микрофлоры организма в норме и при патологии / О. С. Моложавая, Т. В. Ивахнюк, А. Н. Макаренко [и др.] // Актуальные проблемы современной медицины. – 2016. – Т. 16, № 4. – С. 333–340.
78. Циммерман, Я. С. Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника и/или «синдром избыточного бактериального роста» / Я. С. Циммерман // Клиническая медицина. – 2005. – Т. 83, № 4. – С. 14–22.
79. Циммерман, Я. С. Эубиоз и дисбиоз желудочно-кишечного тракта: мифы и реалии / Я. С. Циммерман // Клиническая медицина. – 2013. – Т. 91, № 1. – С. 4–11.
80. Циркин, В. И. Роль гистамина в репродукции (обзор литературы) / В. И. Циркин, С. В. Хлыбова // Вятский медицинский вестник. = 2006. – № 3–4. – С. 62–67.
81. Шульпекова, Ю. О. Кишечный микробиом как особый орган / Ю. О. Шульпекова // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2014. – Т. 24, № 5. – С. 82–88.
82. Экспериментальное обоснование применения Семакса как модулятора иммунного ответа на модели “социального” стресса / М. А. Самотруева, А. Л. Ясенявская, В. Х. Мурталиева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – № 12. – С. 718–722.
83. Эффекты Семакса на фоне блокады дофаминергических рецепторов галоперидолом / Е. А. Себенцова, Н. Г. Левицкая, Л. А. Андреева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, № 2. – С. 128–132.

84. Эффекты хронического мягкого стресса у крыс Вистар и Август: поведение и содержание моноаминов в стриатуме / Н. А. Яна, Н. Н. Хлебникова, И. Н. Орлова [и др.] // Патогенез. – 2012. – Т. 10, № 2. – С. 50–58.
85. Янковский, Д. С. Интегральная роль симбиотической микрофлоры в физиологии человека / Д. С. Янковский, В. П. Широбоков, Г. С. Дымент. – Киев : Червона Рута-Турс, 2011. – 160 с.
86. Яснецов, В. В. Исследование противогипоксических и антиамнестических свойств мексидола и семакса / В. В. Яснецов, Т. А. Воронина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73, № 4. – С. 2–7.
87. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing / J. Qin, R. Li, J. Raes [et al.] // Nature. – 2010. – Vol. 464, Iss. 7285. – P. 59–65.
88. A metagenomewide association study of gut microbiota in type 2 diabetes / J. Qin, Y. Li, Z. Cai. [et al.] // Nature. – 2012. – Vol. 490, No. 77418. – P. 55–60.
89. A randomized, double-blind, placebo controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome / A. V. Rao, A. C. Bested, T. M. Bealune [et al.] // Gut pathogens. – 2009. – Vol. 1, Iss. 1. – P. 1–6. – URL: <https://doi.org/10.1186/1757-4749-1-6>.
90. Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats / M. Crumeyrolle-Arias, M. Jaglin, A. Bruneau [et al.] // Psychoneuroendocrinology. – 2014. – Vol. 42. – P. 207–217.
91. Adult hippocampal neurogenesis is regulated by the microbiome / E. S. Ogbonnaya, G. Clarke, F. Shanahan [et al.] // Biological Psychiatry. – 2015. – Vol. 78, Iss. 4. – P. 7–9.
92. Alteration of behavior and monoamine levels attributable to *Lactobacillus plantarum* PS128 in germ-free mice / W. H. Liu, H. L. Chuang, Y. T. Huang

- [et al.] // Behavioural Brain Research. – 2016. – Vol. 298, Pt. B. – P. 202–209.
93. Alterations in the vaginal microbiome by maternal stress are associated with metabolic reprogramming of the offspring gut and brain / E. Jasarevic, C. L. Howerton, C. D. Howard, T. L. Bale // Endocrinology. – Vol. 156, Iss. 9. – P. 3265–3276.
 94. Altering host resistance to infections through microbial transplantation / B. P. Willing, A. Vacharaksa, M. Croxen [et al.] // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, Iss. 10. – P. 269–288.
 95. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity / L. V. Hooper, T. S. Stappenbeck, C. V. Hong [et al.] // Nature immunology. – 2003. – Vol. 4. – P. 269–273.
 96. Archaea and the human gut: new beginning of an old story / N. Gaci, G. Borrel, W. Tottey [et al.] // World Journal of Gastroenterology. – 2014. – Vol. 20, Iss. 43. – P. 16062–16078.
 97. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects / M. Messaoudi, R. Lalonde, N. Violle [et al.] // British Journal of Nutrition. – 2011. – Vol. 105, Iss. 5. – P. 755–764
 98. Backhed, F. Programming of host metabolism by the gut microbiota / F. Backhed // Annals of Nutrition and Metabolism. – 2011. – Vol. 58, Iss. 2. – P. 44–52.
 99. Bailey, M. T. Influence of stressor-induced nervous system activation on the intestinal microbiota and the importance for immunomodulation / M. T. Bailey // Advances in experimental medicine and biology. – 2014. – Vol. 817. – P. 255–276.
 100. Basal blood corticosterone level is correlated with susceptibility to chronic restraint stress in mice / J. G. Kim, H. S. Jung, K. J. Kim [et al.] // Neuroscience letters. – 2013. – Vol. 555. – P. 137–142

101. Beneficial effects of probiotics, prebiotics, synbiotics, and psychobiotics in inflammatory bowel disease / A. Wasilewski, M. Zielińska, M. Storr [et al.] // *Inflammatory bowel diseases*. – 2015. – Vol.21, Iss. 7. – P. 1674–1682.
102. Benton, D. Impact of consuming a milk drink containing a probiotic on mood and cognition / D. Benton, C. Williams, A. Brown // *European journal of clinical nutrition*. – 2007. – Vol. 61, Iss. 3. – P. 355–361.
103. Bercik, P. Microbes and the gut-brain axis / P. Bercik, S. M. Collins, E. F. Verdu // *Neurogastroenterology and motility*. – 2012. – Vol. 24, Iss. 5. – P. 405–413.
104. Beyond diversity: functional microbiomics of the human colon / M. Egert, A. A. de Graaf, H. Smidt [et al.] // *Trends in Microbiology*. – 2006. – Vol. 14, Iss. 2. – P. 86–91.
105. Bienenstock, J. On communication between gut microbes and the brain / J. Bienenstock, P. Forsythe, W. A. Kunze // *Current Opinion in Gastroenterology*. – 2012. – Vol.28, Iss. 6. – P. 557–562
106. Bienenstock, J. Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication / J. Bienenstock, P. Forsythe, W. A. Kunze // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2014. – Vol. 817. – P. 115–133.
107. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate / S. Fukuda, H. Toh, K. Hase [et al.] // *Nature*. – 2011. – Vol. 469, Iss. 7331. – P. 543–547.
108. Bifidobacteria exert strain-specific effects on stress-related behavior and physiology in BALB/c mice / H. M. Savignac, B. Kiely, T. G. Dinan [et al.] // *Neurogastroenterology and motility*. – 2014. – Vol. 26, Iss. 11. – P. 1615–1627.
109. Bile acid reduces the secretion of very low density lipoprotein by repressing microsomal triglyceride transfer protein gene expression mediated by hepatocyte nuclear factor-4 / H. Hirokane, M. Nakahara, S.

- Tachibana [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279, Iss. 44. – P. 45685–45692.
110. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c / M. Watanbe, S. M. Houten, L. Wang [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2004. – Vol. 113, Iss. 10. – P. 1408–1418.
 111. Blaser, M. J. Исчезающая микробиота : пер. с англ. / M. J. Blaser, S. Falkow // *Клиническая фармакология и терапия*. – 2014. – Vol. 23, Iss. 4. – P. 7–15.
 112. Brain-gut-microbe communication in health and disease / S. Grenham, G. Clarke, J.F. Cryan [et al.] // *Frontiers in Physiology*. – 2011. – Vol. 2. – P. 94.
 113. Buggy, J. J. Binding of alpha-melanocyte-stimulating hormone to its G-protein-coupled receptor on B-lymphocytes activates the Jak-STAT pathway / J. J. Buggy // *Biochemical Journal*. – 1998. – Vol. 331, Iss. 1. – P. 211–216.
 114. Cani, P. D. Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism / P. D. Cani, T. Duparc, A. Everard // *Current Opinion Pharmacology*. – 2013. – Vol.13, Iss. 6. – P. 935–940.
 115. Cani, P. D. How gut microbes talk to organs: the role of endocrine and nervous routes / P. D. Cani, C. Knauf // *Molecular Metabolism*. – 2016. – Vol. 5, Iss. 9. – P. 743–752.
 116. Cario, E. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C / E. Cario, G. Gerken, D. K. Podolsky // *Gastroenterology* – 2004. – Vol. 127, Iss. 1. – P. 224–238.
 117. Case study of the distribution of mucosa-associated Bifidobacterium species, Lactobacillus species, and other lactic acid bacteria in the human colon / D.S. Nielsen, P.L. Moller, V. Rosenfeld [et al.] // *Applied and environmental microbiology*. – 2003. – Vol. 69, Iss. 12. – P. 7545–7548.

118. Chen, H. Chronic nicotine self-administration augments hypothalamic-pituitary-adrenal responses to mild acute stress / H. Chen, Y. Fu, B. M. Sharp // *Neuro-psychopharmacology*. – 2008. – Vol. 33, Iss. 4. – P. 721–730.
119. 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 [et al.] // *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. – 2017. – Vol. 23, Iss. 1. – P. 135–143.
120. Chronic gastrointestinal inflammation induces anxiety-like behavior and alters central nervous system biochemistry in mice / P. Bercik, E. F. Verdu, J. A. Foster [et al.] // *Gastroenterology*. – 2010. – Vol. 139, Iss. 6. – P. 2102–2112.
121. Chronic social stress in the visible burrow system modulates stress-related gene expression in the bed nucleus of the stria terminalis / D. C. Choi, M. M. Nguyen, K. L. Tamashiro [et al.] // *Physiology & behavior*. – 2006. – Vol. 89, Iss. 3. – P. 301–310.
122. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner / Y. M. Ulrich-Lai, H. F. Figueiredo, M. M. Ostrander [et al.] // *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. – 2006. – Vol. 291, Iss. 5. – P. 965–973.
123. Chronic stress induces structural alterations in splenic lymphoid tissue that are associated with changes in corticosterone levels in wistar-kyoto rats / M. E. Hernandez, L. Martinez-Mota, C. Salinas [et al.] // *BioMed research international*. – 2013. – Vol. 2013, Art. 868742. – 6 p. – URL: <https://doi.org/10.1155/2013/868742>.
124. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury / Q. Zhang, M. Raoof, Y. Chen [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 464, Iss. 7285. – P. 104–107.
125. Clinical and metabolic response to probiotic administration in patients with major depressive disorder: a randomized, double-blind, placebo-

- controlled trial / G. Akkasheh, Z. Kashani-Poor, M. Tajabadi-Ebrahimi [et al.] // Nutrition. – 2016. – Vol. 32, Iss. 3. – P. 315–320.
126. Clinical trial: the effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome / D. B. Silk, A. Davis, J. Vulevic [et al.] // Alimentary pharmacology & therapeutics. – 2009. – Vol. 29, Iss. 5. – P. 508–518.
 127. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy / A. Sivan, L. Corrales, N. Hubert [et al.] // Science. – 2015. – Vol. 350, Iss. 6264. – P. 1084–1089.
 128. Comorbidity between depression and inflammatory bowel disease explained by immune-inflammatory, oxidative, and nitrosative stress; tryptophan catabolite; and gut–brain pathways / M. Martin-Subero, G. Anderson, B. Kanchanatawan [et al.] // CNS spectrums. – 2015. – Vol. 21, Iss. 1. – P. 184–198.
 129. Comparison of the temporary dynamics of NGF and BDNF gene expression in rat hippocampus, frontal cortex, and retina under Semax action / M. Shadrina, M. Shadrina, P. Slominsky [et al.] // Journal of molecular neuroscience : MN. – 2010. – Vol. 41, Iss. 1. – P. 30–35.
 130. Correlation between the human fecal microbiota and depression / A. Naseribafrouei, K. Hestad, E. Avershina [et al.] // Neurogastroenterology and motility. – 2014. – Vol. 26, Iss. 8. – P. 1155–1162.
 131. Cryan J. F Microbial genes, brain & behaviour - epigenetic regulation of the gut-brain axis / J. F. Cryan, T. G. Dinan, R. M. Stilling // Genes, brain, and behavior. – 2014. – Vol. 13, Iss. 1. – P. 69–86.
 132. Deranged spermatogenesis of adult swiss albino mice as effect of immobilization stress-histological study / B. Khandve, V. Gujar, P. Bokariya [et al.] // Journal of pharmacy. – 2013. – Vol. 3, Iss. 2. – P. 7–10. – URL: http://www.iosrphr.org/papers/v3i2/Part_1/B032107010.pdf.

133. Detection of Melanocortin 4 Receptor in rat liver and its regulation during acute phase response / I. A. Malik, J. Triebel, J. Posselt [et al.] // *Zeitschrift für Gastroenterologie*. – 2011. – Vol. 49, Iss. 1. – P. 1–32.
134. Dinan, T. G. Melancholic microbes: a link between gut microbiota and depression? / T. G. Dinan, J. F. Cryan // *Neurogastroenterology and Motility*. – 2013. – Vol. 25, Iss. 9. – P. 713–719.
135. Dinan, T. G. Psychobiotics: a novel class of psychotropic / T. G. Dinan, C. Stanton, J. F. Cryan // *Biological Psychiatry*. – 2013. – Vol. 74, Iss. 10. – P. 720–726.
136. Dinan, T. G. Regulation of the stress response by the gut microbiota: Implications for psychoneuroendocrinology / T. G. Dinan, J. F. Cryan // *Psychoneuroendocrinology*. – 2012. – Vol. 37, Iss. 9. – P. 1369–1378.
137. Distinct *Bifidobacterium* strains drive different immune responses in vitro / P. López, M. Gueimonde, A. Margolles [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2010. – Vol. 138, Iss. 1-2. – P. 157–165.
138. Diversity of the human intestinal microbial flora // P. B. Eckburg, E. M. Bik, C. N. Bernstein [et al.] // *Science*. – 2005. – Vol. 308, Iss. 5728. – P. 1635–1638.
139. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota / C. A. Lozupone, J. I. Stombaugh, J. I. Gordon [et al.] // *Nature*. – 2012. – Vol. 489, Iss. 7415. – P. 220–230.
140. Dong, P. The role of intestinal bifidobacteria on immune system development in young rats / P. Dong, Y. Yang, W. P. Wang // *Early Human Development*. – 2010. – Vol. 86, Iss. 1. – P. 51–58.
141. 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 [et al.] // *Biological Psychiatry*. – 2009. – Vol. 65, Iss. 3. – P. 263–267.
142. Effect of peptide semax on synaptic activity and short-term plasticity of glutamatergic synapses of co cultured dorsal root ganglion and dorsal

- horn neurons / M. S. Shypshyna, N. S. Veselovsky, N. F. Myasoedov [et al.] // *Fiziologicheskii zhurnal*. – 2015. – Vol. 61, Iss. 4. – P. 48–55.
143. Effect of powdered fermented milk with *Lactobacillus helveticus* on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension / K. Aihara, O. Kajimoto, H. Hirata [et al.] // *Journal of the American College of Nutrition*. – 2005. – Vol. 24, Iss. 4. – P. 257–265.
 144. Effectiveness of gamma-irradiation in the inactivation of histamine-producing bacteria / D. Nei, S. Kawasaki, Y. Inatsu [et al.] // *Food Control*. – 2013. – Vol. 28. – P. 143–146.
 145. Effects of repeated restraint stress on gastric motility in rats / J. Zheng [et al.] // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2009. – Vol. 296, Iss. 5. – P. R1358–1365.
 146. Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression / L. Desbonnet, L. Garrett, G. Clarke [et al.] // *Neuroscience*. – 2010. – Vol. 170, Iss. 4. – P. 1179–1188.
 147. Enterotypes of the human gut microbiome / M. Arumugam, J. Raes, E. Pelletier [et al.] // *Nature*. – 2011. – Vol. 473. – P. 174–180.
 148. Entry of the synthetic ACTH(4-10) analogue into the rat brain following intravenous injection / V. N. Potaman, L. V. Antonova, V. A. Dubynin [et al.] // *Neuroscience letters*. – 1991. – Vol. 127, Iss. 1. – P. 133–138.
 149. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation / M. T. Bailey, S. E. Dowd, J. D. Galley [et al.] // *Brain, Behavior and Immunity*. – 2011. – Vol. 25, Iss. 3. – P. 397–407.
 150. Exposure to a social stressor disrupts the community structure of the colonic mucosa-associated microbiota / J. D. Galley, M. C. Nelson, Z. Yu [et al.] // *BMC microbiology*. – 2014. – Vol. 14. – Art. 189. – URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-189>.

151. Farzi, A. Neuropeptides and the microbiota-gut-brain axis / A. Farzi, P. Holzer. // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2014. – Vol. 817. – P. 195–219.
152. Formation of spatial memory in rats with ischemic lesions to the prefrontal cortex; effects of a synthetic analog of ACTH (4–10) / D. N. Silachev, S. I. Shram, F. M. Shakova [et al.] // *Neuroscience and behavioral physiology*. – 2009. – Vol. 39, Iss. 8. – P. 749–756.
153. Foster, J. A. Gut brain axis: diet microbiota interactions and implications for modulation of anxiety and depression / J. A. Foster, R. A. Luna // *Current opinion in Biotechnology*. – 2015. – Vol. 32. – P. 35–41.
154. Foster, J. A. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression / J. A. Foster, K. A. McVey Neufeld // *Trends in neurosciences*. – 2013. – Vol. 36, Iss. 5. – P. 305–312.
155. Fung, T. C. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease / T. C. Fung, C. A. Olson, E. Y. Hsiao // *Natural Neuroscience*. – 2017. – Vol. 20, Iss. 2. – P. 145–155.
156. Furness, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology / J. B. Furness // *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. – 2012. – Vol. 9, Iss. 5. – P. 286–294.
157. Gareau, M. G. Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage / M. G. Gareau, M. A. Silva, M. H. Perdue // *Current Molecular Medicine*. – 2008. – Vol. 8, Iss. 4. – P. 274–281.
158. Genton, L. Interactions between the enteric nervous system and the immune system: role of neuropeptides and nutrition / L. Genton, K.A. Kudsk // *The American Journal of Surgery*. – 2003. – Vol. 186, Iss. 3. – P. 253–258.
159. Goehler, L. E. Vagal complexity: substrate for body-mind connections? / L. E. Goehler // *Bratislavské lekárske listy*. – 2006. – Vol. 107, Iss. 8. – P. 275–276.

160. Got worms? Perinatal exposure to helminths prevents persistent immune sensitization and cognitive dysfunction induced by early-life infection / L. L. Williamson, E. A. McKenney, Z. E. Holzknecht [et al.] // *Brain, Behavior and Immunity*. – 2016. – Vol. 51. – P. 14–28.
161. Gupta, A. Gut brain axis and the microbiota / A. Gupta, E. A. Mayer, K. Tillisch // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2015. – Vol. 125, Iss. 3. – P. 926–938.
162. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota / H. Chung, S. J. Pamp, J. A. Hill [et al.] // *Cell*. – 2012. – Vol. 149, Iss. 7. – P. 1578–1593.
163. Gut microbes and the brain: paradigm shift in neuroscience / E. A. Mayer, R. Knight, S. K. Mazmanian [et al.] // *The Journal of Neuroscience*. – 2014. – Vol. 34, Iss. 46. – P. 15490–15496.
164. Gut microbial communities modulating brain development and function / M. Al-Asmakh, F. Anuar, F. Zadjali [et al.] // *Gut microbes*. – 2012. – Vol. 3, Iss. 4. – P. 366–373.
165. Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics / L. Geurts, A. M. Neyrinck, N. M. Delzenne [et al.] // *Beneficial microbes*. – 2014. – Vol. 5, Iss. 1. – P. 3–17.
166. Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: implications for brain and behaviour / L. Desbonnet, G. Clarke, A. Traplin [et al.] // *Brain, Behavior and Immunity*. – 2015. – Vol. 48. – P. 165–173.
167. Gut-microbiota-brain axis and its effect on neuropsychiatric disorders with suspected immune dysregulation / A. I. Petra, S. Panagiotidou, E. Hatziagelaki [et al.] // *Clinical Therapeutics*. – 2015. – Vol. 37, Iss. 5. – P. 984–995.
168. Hill, M. J. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis / M. J. Hill // *European Journal of Cancer Prevention*. – 1997. – Vol. 6, Iss. 2. – P. 43–45.

169. Histamine content and histamine-forming bacteria in mahi-mahi (*Coryphaea hippurus*) fillets and dried products / C. S. Lin, H. C. Tsai, C. M. Lin [et al.] // *Food Control*. – 2014. – Vol. 42. – P. 165–171.
170. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS / D. Erny, A.L. Hrabé de Angelis, D. Jaitin [et al.] // *Nature Neuroscience*. – 2015. – Vol. 18, Iss. 7. – P. 965–977.
171. Host-gut microbiota metabolic interactions / J. K. Nicholson, E. Holmes, J. Kinross [et al.] // *Science*. – 2012. – Vol. 336, Iss. 6086. – P. 1262–1267.
172. Houten, S. M. Endocrine functions of bile acids / S. M. Houten, M. Watanabe, J. Auwerx // *The Embo Journal*. – 2006. – Vol. 25, Iss. 7. – P. 1419–1425.
173. Hyland, N. P. Microbiota-host interactions in irritable bowel syndrome: epithelial barrier, immune regulation and brain-gut interactions / N. P. Hyland, E. M. Quigley, E. Brint // *World Journal of Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 20, Iss. 27. – P. 8859–8866.
174. Immobilization stress causes extra-cellular oxidant-antioxidant imbalance in rats: Restoration by L-NAME and vitamin E / A. Nadeem, A. Masooda, N. Masood [et al.] // *European neuropsychopharmacology*. – 2006. – Vol. 16, Iss. 4. – P. 260–267.
175. Immune-mediated neural dysfunction in a murine model of chronic *Helicobacter pylori* infection / P. Bercik, R. De Giorgio, P. Blennerhassett [et al.] // *Gastroenterology*. – 2002. – Vol. 123, Iss. 4. – P. 1205–1215.
176. Implication of brain-derived neurotrophic factor in the release of dopamine and dopamine-related behaviors induced by methamphetamine / M. Narita, K. Aoki, M. Takagi [et al.] // *Neuroscience*. 2003. – Vol. 119, Iss. 3. – P. 767–775.
177. In depression, bacterial translocation may drive inflammatory responses, oxidative and nitrosative stress (O&NS), and autoimmune responses directed against O&NS-damaged neoepitopes / M. Maes, M.

- Kubera, J. C. Leunis [et al.] // *Acta Psychiatrica Scandinavica*. – 2013. – Vol. 127, Iss. 5. – P. 344–354.
178. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis / J. M. Yano, K. Yu, G. P. Donaldson [et al.] // *Cell*. – 2015. – Vol. 161, Iss. 2. – P. 264–276.
 179. Ingestion of *Lactobacillus* strain reduces anxiety and improves cognitive function in the hyperammonemia rat / J. Luo, T. Wang, S. Liang [et al.] // *Science China Life Sciences*. – 2014. – Vol. 57, Iss 3. – P. 327–335.
 180. 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 [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2011. – Vol. 108, Iss. 38. – P. 16050–16055.
 181. Interaction of dual intracellular signaling pathways activated by the melanocortin-3 receptor / Y. Konda, I. Gantz, J. DelValle [et al.] // *J. Biol. Chem*. – 1994. – Vol. 269, Iss. 18. – P. 13162–13166.
 182. Intestinal bacteria modify lymphoma incidence and latency by affecting systemic inflammatory state, oxidative stress, and leukocyte genotoxicity / M. L. Yamamoto, I. Maier, A. T. Dang [et al.] // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73, Iss. 14. – P. 4222–4232.
 183. Juster, R. P. Allostatic load biomarkers of chronic stress and impact on health and cognition / R. P. Juster, B. S. McEwen, S. J. Lupien // *Neuroscience and biobehavioral reviews*. – 2010. – Vol. 35, Iss. 1. – P. 2–16.
 184. 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 // *Journal of exercise nutrition & biochemistry*. – 2014. – Vol. 18, Iss. 1. – P. 97–104.

185. Kim, Y. K. The Microbiota-Gut-Brain Axis in Neuropsychiatric Disorders: Pathophysiological Mechanisms and Novel Treatments / Y. K. Kim, C. Shin // *Current Neuropharmacology*. – 2018. – Vol. 16, Iss. 5. – P. 559–573.
186. Kopin, I. J. Definition of stress and sympathetic neuronal responses / I. J. Kopin // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1995. – Vol. 771, Iss. 1. – P. 19–30. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1995.tb44667.x>.
187. Lactobacilli and streptococci induce inflammatory chemokine production in human macrophages that stimulates Th1 cell chemotaxis / V. Veckman, M. Miettinen, S. Matikainen [et al.] // *Journal of Leucocyte Biology*. – 2003. – Vol. 74, Iss. 3. – P. 395–402.
188. *Lactobacillus johnsonii* HY7042 ameliorates *Gardnerella vaginalis*-induced vaginosis by killing *Gardnerella vaginalis* and inhibiting NF- κ B activation / H. M. Joo, Y. J. Hyun, K. S. Myoung [et al.] // *International Immunopharmacology*. – 2011. – Vol. 11, Iss. 11. – P. 1758–1765.
189. *Lactobacillus johnsonii* N6.2 Mitigates the Development of Type 1 Diabetes in BB-DP Rats / R. Valladares, D. Sankar, N. Li [et al.] // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5, Iss. 5. – Art. 10507. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010507>.
190. Leonard, B. E. HPA and immune axes in stress: involvement of the serotonergic system / B. E. Leonard // *Neuroimmunomodulation*. – 2006. – Vol. 13, Iss. 5-6. – P. 268–276.
191. Leunis, J. C. Normalization of leaky gut in chronic fatigue syndrome (CFS) is accompanied by a clinical improvement: effects of age, duration of illness and the translocation of LPS from gram-negative bacteria / J. C. Leunis, M. Maes // *Neuro endocrinology letters*. – 2008. – Vol. 29, Iss. 6. – P. 902–910.

192. Logan, A. C. Major depressive disorder: probiotics may be an adjuvant therapy / A. C. Logan, M. Katzman // *Medical hypotheses*. – 2005. – Vol. 64, Iss. 3. – P. 533–538.
193. Lutgendorff, F. The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastro-intestinal damage / F. Lutgendorff, L. M. Akkermans, J. D. Soderholm // *Current Molecular Medicine*. – 2008. – Vol. 8, Iss. 4. – P. 282–298.
194. Ly6C(hi) monocytes provide a link between antibiotic-induced changes in gut microbiota and adult hippocampal neurogenesis / L. Mohle, D. Mattei, M. M. Heimesaat [et al.] // *Cell Reports*. – 2016. – Vol. 15, Iss. 9. – P. 1945–1956.
195. Maes, M. An intriguing and hitherto unexplained cooccurrence: depression and chronic fatigue syndrome are manifestations of shared inflammatory, oxidative and nitrosative (IO&NS) pathways / M. Maes // *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. – 2011. – Vol. 35, Iss. 3. – P. 784–794.
196. Maes, M. The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative & nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression / M. Maes // *Neuroendocrinology Letters*. – 2008. – Vol. 29, Iss. 3. – P. 287–291.
197. Marin, M. T. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats / M. T. Marin, F. C. Cruz, C. S. Planeta // *Physiology & behavior*. – 2007. – Vol. 90, Iss. 1. – P. 29–35.
198. Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction / S. M. O'Mahony, N. P. Hyland, T. G. Dinan, J. F. Cryan // *Psychopharmacology*. – 2011. – Vol. 214, Iss. 1. – P. 71–88.
199. May the force Be with you: the light and dark sides of the microbiota-gut-brain Axis in neuropsychiatry / E. Sherwin, K. V. Sandhu, T. G. Dinan [et al.] // *CNS drugs*. – 2016. – Vol. 30, Iss. 11. – P. 1019–1041.

200. Mayer, E. A. Brain-gut microbiome interactions and functional bowel disorders / E. A. Mayer, T. Savidge, R. J. Shulman // *Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 146, Iss. 6. – P. 1500–1512.
201. McEwen, B. S. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain / B. S. McEwen // *Dialogues in clinical neuroscience*. – 2006. – Vol. 8, Iss. 4. – P. 367–381.
202. McEwen, B. S. Stress- and allostasis-induced brain plasticity / B. S. McEwen, P. J. Gianaros // *Annual review of medicine*. – 2011. – Vol. 62. – P. 431–445.
203. Microbes & neurodevelopment–Absence of microbiota during early life increases activity-related transcriptional pathways in the amygdala / R. M. Stilling, F. J. Ryan, A. E. Hoban [et al.] // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2015. – Vol. 50. – P. 209–220.
204. Microbiota and host determinants of behavioural phenotype in maternally separated mice / G. De Palma, P. Blennerhassett, J. Lu [et al.] // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6. – Art. 7735. – URL: <https://doi.org/10.1038/ncomms8735>.
205. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders / E. Y. Hsiao, S. W. McBride, S. Hsien [et al.] // *Cell*. – 2013. – Vol. 155, Iss. 7. – P. 1451–1463.
206. Miller, A. H. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target / A. H. Miller, C. L. Raison // *Nature reviews. Immunology*. – 2016. – Vol. 16, Iss. 1. – P. 22–34.
207. Miller, M. B. Quorum sensing in bacteria / M. B. Miller, B. I. Bassler // *Annual review of microbiology*. – 2001. – Vol. 55. – P. 165–199.
208. Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function / E. G. Zoetendal, B. Cheng, S. Koike, R. I. Mackie // *Current issues in intestinal microbiology*. – 2004. – Vol. 5, Iss. 2. – P. 31–47.

209. Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders / F. Calabrese, R. Molteni, G. Racagni [et al.] // *Psychoneuroendocrinology*. – 2009 – Vol. 34, Iss. 1. – P. 208–216.
210. Neurotoxicity and oxidative stress induced by gibberellic acid in rats during late pregnancy and early postnatal periods: Biochemical and histological changes / A. Troudi, H. Bouaziz, N. Soudani [et al.] // *Experimental and Toxicologic Pathology*. – 2020. – Vol. 64, Iss. 6. – P. 583–590
211. Neurotrophin gene expression in rat brain under the action of Semax, an analogue of ACTH 4-10 / T. Y. Agapova, Y. V. Agniullin, M. I. Shadrina [et al.] // *Neuroscience letters*. – 2007. – Vol. 417, Iss. 2. – P. 201–205.
212. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior / R. Diaz Heijtz, S. Wang, F. Anuar [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2011. – Vol.108, Iss. 7. – P. 3047–3052.
213. Novel synthetic analogue of acth 4-10 (semax) but not glycine prevents the enhanced nitric oxide generation in cerebral cortex of rats with incomplete global ischemia / V. G. Bashkatova, V. B. Koshelev, O. E. Fadyukova [et al.] // *Brain research*. – 2001. – Vol. 894, Iss. 1. – P. 145–149.
214. N-terminal degradation of ACTH(4-10) and its synthetic analog semax by the rat blood enzymes / V. N. Potaman, L. Y. Alfeeva, A. A. Kamensky [et al.] // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1991. – Vol. 176, Iss. 2. – P. 741–746.
215. O'Hara, A. M. The gut flora as a forgotten organ / A. M. O'Hara, F. Shanahan // *EMBO reports*. – 2006. – Vol. 7, Iss. 7. – P. 688–693.
216. Oral treatment with *Lactobacillus rhamnosus* attenuates behavioural deficits and immune changes in chronic social stress / A. Bharwani, M. F. Mian, M. G. Surette [et al.] // *BMC Medicine*. – 2017. – Vol. 15, Iss. 1. – Art. 7. – URL: <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0771-7>.

217. Oxidative stress in patients with cardiovascular disease and chronic renal failure / A. Popolo, G. Autore, A. Pinto [et al.] // *Free radical research*. – 2013. – Vol. 47, Iss. 5. – P. 346–356.
218. Parashar, A. Gut microbiota regulates key modulators of social behavior / A. Parashar, M. Udayabanu // *European neuropsychopharmacology*. – 2016. – Vol. 26, Iss. 1. – P. 78–91.
219. Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction / J. Demaude, C. Salvador-Cartier, J. Fioramonti [et al.] // *Gut*. – 2006. – Vol. 55, Iss. 5. – P. 655–661.
220. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice / N. Sudo, Y. Chida, Y. Aiba [et al.] // *The Journal of Physiology*. – 2004. – Vol. 558, Iss. 1. – P. 263–275.
221. Prenatal stress-induced alterations in major physiological systems correlate with gut microbiota composition in adulthood / A. V. Golubeva, S. Crampton, L. Desbonnet [et al.] // *Psychoneuroendocrinology*. – 2015. – Vol. 60. – P. 58–74.
222. Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats / A. Ait-Belgnaoui, H. Durand, C. Cartier [et al.] // *Psychoneuroendocrinology*. – 2012. – Vol. 37, Iss. 11. – P. 1885–1895.
223. Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice / A. Ait-Belgnaoui, A. Colom, V. Braniste [et al.] // *Neurogastroenterology and motility*. – 2014. – Vol. 26, Iss. 4. – P. 510–520.
224. Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress / M. Zareie, K. Johnson-Henry, J. Jury [et al.] // *Gut*. – 2006. – Vol. 55, Iss. 11. – P. 1553–1560.

225. Prut, L. The open field as a paradigm to measure the effects of drugson anxiety-like behaviors: a review / L. Prut, C. Belzung // *European Journal of Pharmacology*. – 2003. – Vol. 463, Iss. 1-3. – P. 3–33.
226. Psychobiotics and the manipulation of bacteria-gut-brain signals / A. Sarkar, S. M. Lehto, S. Harty [et al.] // *Trends in Neurosciences*. – 2016. – Vol. 39, Iss. 11. – P. 763–781
227. Psychosocial stress and liver disease status / C. C. Vere, C. T. Streba, L. M. Streba [et al.] // *World journal of gastroenterology*. – 2009. – Vol. 15, Iss. 24. – P. 2980–2986.
228. Quantitative proteomic profiling of host–pathogen interactions: The macrophage response to *Mycobacterium tuberculosis* lipids / W. Shui, S. A. Gilmore, L. Sheu [et al.] // *Journal of proteome research*. – 2009. – Vol. 8, Iss. 1. – P. 282–289.
229. Rajilić-Stojanović, M. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota / M. Rajilić-Stojanović, W. M. De Vos // *FEMS microbiology reviews*. – 2014. – Vol. 38, Iss. 5. – P. 996–1047.
230. Rapid induction of neurotrophin mRNAs in rat glial cell cultures by Semax, an adrenocorticotropic hormone analog / M. I. Shadrina, O. V. Dolotov, I. A. Grivennikov [et al.] // *Neuroscience letters*. – 2001. – Vol. 308, Iss. 2. – P. 115–118.
231. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice / K. M. Neufeld, N. Kang, J. Bienenstock [et al.] // *Neurogastroenterology and Motility*. – 2011. – Vol. 23, Iss. 3. – P. 255–264.
232. Release of mast cell mediators into the jejunum by cold pain stress in humans / J. Santos, E. Saperas, C. Nogueiras [et al.] // *Gastroenterology*. – 1998. – Vol. 114, Iss. 4. – P. 640–648.
233. Review article: probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome–focus on lactic acid bacteria / G. Clarke, J. F. Cryan, T. G. Dinan [et al.] // *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. – 2012. – Vol. 35, Iss. 4. – P. 403–413.

234. Roshchina, V. V. Evolutionary considerations of neurotransmitters in microbial, plant and animal cells / V. V. Roshchina // *Microbial endocrinology: interkingdom signaling in infectious disease and health*. – Springer, 2010. – P. 17–52.
235. Semax an analogue of adrenocorticotropin (4–10), binds specifically and increases levels of brain-derived neurotrophic factor protein in rat basal forebrain / O. V. Dolotov, E. A. Karpenko, T. S. Seredenina [et al.] // *Journal of neurochemistry*. – 2006. – Vol. 97, Iss. 1. – P. 82–86.
236. Semax, an ACTH(4-10) analogue with nootropic properties, activates dopamine- and serotonergic brain systems in animals / K. O. Eremin, V. S. Kudrin, P. Saransaari [et al.] // *Neurochemical research*. – 2005. – Vol. 30, Iss. 12. – P. 1493–1500.
237. Semax, an analog of ACTH(4-10) with cognitive effects, regulates BDNF and trkB expression in the rat hippocampus / O. V. Dolotov, E. A. Karpenko, L. S. Inozemtseva [et al.] // *Brain research*. – 2006. – Vol. 1117, Iss. 1. – P. 54–60.
238. Shen, Q. In vitro and in vivo antioxidant activity of *Bifidobacterium animalis* 01 isolated from centenarians / Q. Shen, N. Shang, P. Li // *Current microbiology*. – 2011. – Vol. 62, Iss. 4. – P. 1097–1103.
239. Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice / E. F. Verdú, P. Bercik, M. Verma-Gandhu [et al.] // *Gut*. – 2006. – Vol. 55, Iss. 2. – P. 182–190.
240. Stark, P. L. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life / P. L. Stark, A. Lee // *Journal of Medical Microbiology*. – 1982. – Vol. 15, Iss. 2. – P. 189–203.
241. Stratakis, C. A. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system / C. A. Stratakis, G. P. Chrousos // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1995. – Vol. 771. – P. 1–18. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1995.tb44666.x>.

242. Stress and the gastrointestinal tract III. Stress-related alterations of gut motor function: role of brain corticotrophin-releasing factor receptors / V. Tache, M. Martinez, Y. Million, L. Wang // *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology.* – 2001. – Vol. 280, Iss. 2. – P. G173–177.
243. Structural & functional consequences of chronic psychosocial stress on the microbiome & host / A. Bharwani, M. F. Mian, J. A. Foster [et al.] // *Psychoneuroendocrinology.* – Vol. 63. – P. 217–227.
244. Synthetic ACTH analogue semax displays nootropic-like activity in human / A. Y. Kaplan, A. G. Kochetova, V. N. Nezavibathko [et al.] // *Neuroscience Research Communications.* – 1996. – Vol. 19, Iss. 2. – P. 115–123.
245. Systematic Genome Assessment of B-vitamin Biosynthesis Suggests Co-Operation Among Gut Microbes / S. Magnúsdóttir, D. Ravcheev, V. de Crécy-Lagard, I. Thiele // *Frontiers in Genetics.* – 2015. – Vol. 6. – Art. 148. – URL: <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00148>.
246. Targeted profiling of circulating and hepatic bile acids in human, mouse, and rat using a UPLC-MRM-MS-validated method / J. C. Garcia-Canaveras, M. T. Donato, J. V. Castell [et al.] // *Journal of Lipid Research.* – 2013. – Vol. 52, Iss. 10. – P. 2231–2241.
247. Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation / A. Catania, S. Gatti, G. Colombo [et al.] // *Pharmacological reviews.* – 2004. – Vol. 56, Iss. 1. – P. 1–29.
248. The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication / P. Bercik, A. J. Park, D. Sinclair [et al.] // *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society.* – 2011. – Vol. 23, Iss. 12. – P. 1132–1139.

249. The gut microbiota in internal medicine: implications for health and disease / J. M. Lankelma, M. Nieuwdorp, W. M. de Vos, W. J. Wiersinga // The Netherlands Journal of Medicine. – 2015. – Vol.73, Iss. 2. – P. 61–68.
250. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems / M. Carabotti, A. Scirocco, M. A. Maselli [et al.] // Annals of Gastroenterology. – 2015. – Vol. 28, Iss. 2. – P. 203–209.
251. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression / M. Maes, R. Yirmiya, J. Norberg [et al.] // Metabolic Brain Disease. – 2009. – Vol. 24, Iss. 1. – P. 27–53.
252. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice / P. Bercik, E. Denou, J. Collins [et al.] // Gastroenterology. – 2011. – Vol. 141, Iss. 2. – P. 591–593.
253. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner / G. Clarke, S. Grenham, P. Scully [et al.] // Molecular Psychiatry. – 2013. – Vol. 18, Iss. 6. – P. 666–673.
254. The microbiota-gut-brain axis in gastrointestinal disorders: stressed bugs, stressed brain or both? / G. De Palma, S. M. Collins, P. Bercik, E. F. Verdu // The Journal of Physiology. – 2014. – Vol. 592, Iss. 14. – P. 2989–2997.
255. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: an assessment of potential antidepressant properties in the rat / L. Desbonnet, L. Garrett, G. Clarke [et al.] // Journal of Psychiatric Research. – 2008. – Vol. 43, Iss. 2. – P. 164–174.
256. The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor / M. B. Clarke, D. T. Hughes, C. Zhu [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2006. – Vol. 103, Iss. 27. – P. 10420–10425.

257. The role of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in restraint stress-induced liver injury in mice / Q. Zhu, L. Gu, Y. Wang [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, Iss. 3. – P. 1–9.
258. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders / J. Penders, E. E. Stobberingh, P. A. van den Brandt, C. Thijs // Allergy. – 2007. – Vol. 62, Iss. 11. – P. 1223–1236.
259. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota / K. Atarashi, T. Tanoue, K. Oshima [et al.] // Nature. – 2013. – Vol. 500. – P. 232–236.
260. Ultradian corticosterone rhythm and the propensity to behave aggressively in male rats / J. Haller, J. Halasz, E. Mikics [et al.] // Journal of neuroendocrinology. – 2000. – Vol. 12, Iss. 10. – P. 937–940.
261. Walf, A. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents / A. A. Walf, Ch. A. Frye // Nature protocols. – 2007. – Vol. 2, Iss. 2. – P. 322–328.
262. Wang, S. W. Effects of restraint stress and serotonin on macronutrient selection: a rat model of stress-induced anorexia // Eat. Weight. Disord. – 2002. – Vol. 7, Iss. 1. – P. 23–31.
263. Zoetendal, E. G. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria / E. G. Zoetendal, A. D. Akkermans, W. M. De Vos // Applied and Environmental Microbiology. – 1998. – Vol. 64, Iss. 10. – P. 3854–3859.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1
(справочное)

Таблица 1 – Значения коэффициентов ранговой корреляции Спирмена между исследуемыми показателями поведенческой активности в группе нестрессированного контроля (введение физиологического раствора) (r_s)

	Число пересеченных ЦК	Время, проведенное в ЦК	Число пересеченных ПК	Время, проведенное в ПК	Число вставаний периф.	Количество актов груминга	Количество уринаций	Количество фекальных болюсов	Время в ОР	Время в ЗР	Время на центральной площадке	Количество свешиваний
Число пересеченных ЦК	1,00	0,53	-0,58	-0,43	-0,15	0,05	0,01	0,19	-0,14	0,29	-0,43	-0,05
Время, проведенное в ЦК	0,53	1,00	-0,32	-0,50	-0,07	0,20	0,24	0,33	-0,20	0,36	-0,48	-0,24
Число пересеченных ПК	-0,58	-0,32	1,00	0,32	0,09	-0,45	-0,44	0,03	0,53	-0,57	0,51	0,27
Время, проведенное в ПК	-0,43	-0,50	0,32	1,00	0,07	-0,20	-0,24	-0,33	0,20	-0,36	0,48	0,24
Число вставаний периф.	-0,15	-0,07	0,09	0,07	1,00	-0,04	-0,15	0,22	-0,30	0,33	-0,15	0,23
Количество актов груминга	0,05	0,20	-0,45	-0,2	-0,04	1,00	0,56	0,24	-0,47	0,52	-0,23	-0,49
Количество уринаций	0,01	0,24	-0,44	-0,24	0,15	0,56	1,00	0,25	-0,62	0,55	-0,50	-0,59
Количество фекальных болюсов	0,19	0,33	0,03	-0,33	0,22	0,24	0,25	1,00	0,03	-0,03	0,01	-0,19
Время в ОР	-0,14	-0,20	0,53	0,20	-0,30	-0,47	-0,62	0,03	1,00	-0,43	0,06	0,40
Время в ЗР	0,29	0,36	-0,57	-0,36	0,33	0,52	0,55	-0,03	-0,43	1,00	-0,43	-0,49
Время на центральной площадке	-0,43	-0,48	0,51	0,48	-0,15	-0,23	-0,50	0,01	0,06	-0,43	1,00	0,34
Количество свешиваний	-0,05	-0,24	0,27	0,24	0,23	-0,49	-0,59	-0,19	0,40	-0,49	0,34	1,00

Условные обозначения (здесь и далее в таблицах): полужирным шрифтом отмечены статистически достоверные взаимосвязи ($p \leq 0,05$); КС – кортикостерон; ГК – глубина крипт; БК – бокаловидные клетки; ТК – тучные клетки IV типа; НФ – нейтрофилы; ЛФ – лимфоциты; МФ – макрофаги; ПЦ – плазмоциты; ЦК – центральные квадраты; ПК – периферические квадраты; ОР – открытые рукава; ЗР – закрытые рукава.

Таблица 2 – Значения коэффициентов ранговой корреляции Спирмена между исследуемыми показателями в группе нестрессированного контроля (введение физиологического раствора) (r_s)

	КС	ГК	БК	ТК	НФ	ЛФ	МФ	ПЦ	Лактоба циллы	Бифидоб актерии	Е. coli с норм. ферм. акт.	Е. coli со сниж. ферм. акт.
КС	1,00	0,01	0,40	-0,01	0,16	0,01	-0,00	-0,02	-0,81	-0,31	-0,36	-0,47
ГК	0,01	1,00	0,63	-0,67	-0,52	-0,52	-0,58	-0,52	-0,11	-0,16	-0,05	-0,46
БК	0,40	0,63	1,00	-0,45	-0,33	-0,34	-0,34	-0,31	-0,36	0,28	-0,41	-0,40
ТК	-0,01	-0,67	-0,44	1,00	0,48	0,48	0,50	0,45	0,09	0,11	-0,18	0,12
НФ	0,16	-0,52	-0,33	0,48	1,00	0,97	0,93	0,94	-0,19	-0,18	0,36	-0,25
ЛФ	0,01	-0,52	-0,35	0,48	0,97	1,00	0,98	0,99	-0,05	-0,05	0,44	-0,21
МФ	-0,00	-0,58	-0,34	0,50	0,93	0,98	1,00	0,98	-0,01	0,01	0,44	-0,20
ПЦ	-0,02	-0,52	-0,31	0,45	0,94	0,99	0,98	1,00	-0,01	-0,01	0,43	-0,20
Лактобациллы	-0,81	-0,11	-0,36	0,09	-0,19	-0,04	-0,01	-0,01	1,00	0,45	0,49	0,44
Бифидобактерии	-0,31	-0,16	0,27	0,11	-0,18	-0,05	0,01	-0,01	0,45	1,00	-0,12	0,53
Е. coli с норм. ферм. акт.	-0,36	-0,05	-0,41	-0,18	0,36	0,44	0,44	0,43	0,49	-0,12	1,00	-0,15
Е. coli со сниж. ферм. акт.	-0,47	-0,46	-0,40	0,12	-0,25	-0,21	-0,20	-0,20	0,44	0,53	-0,15	1,00
Число пересеченных ЦК	0,08	0,24	0,15	0,08	0,23	0,16	0,08	0,20	0,00	-0,33	-0,07	-0,38
Время, проведенное в ЦК	0,19	0,23	0,36	0,08	-0,06	-0,07	-0,08	0,02	-0,05	-0,12	-0,34	-0,36
Число пересеченных ПК	-0,60	-0,38	-0,28	0,14	-0,42	-0,28	-0,17	-0,24	0,59	0,54	-0,06	0,48

Продолжение

Время, проведенное в ПК	-0,19	-0,22	0,36	-0,08	0,06	0,08	0,08	-0,02	0,05	0,12	0,34	0,36
Число вставаний периф.	0,03	0,32	0,24	0,20	-0,39	-0,42	-0,46	-0,46	-0,23	0,19	-0,67	0,15
Количество актов груминга	0,94	-0,21	0,23	0,18	0,28	0,16	0,17	0,17	-0,66	-0,16	-0,27	-0,35
Количество уринаций	0,75	0,09	0,35	-0,05	0,06	-0,02	0,01	0,00	-0,91	-0,43	-0,51	-0,50
Количество фекальных болюсов	0,30	-0,10	0,53	-0,00	-0,05	-0,12	-0,13	-0,09	-0,33	0,41	-0,61	0,28
Время в ОР	-0,57	-0,06	-0,23	-0,43	-0,28	-0,19	-0,20	-0,14	0,61	0,40	0,34	0,50
Время в ЗР	0,64	0,29	0,33	0,20	0,13	0,03	0,01	0,00	-0,71	-0,55	-0,39	-0,58
Время на центральной площадке	-0,33	-0,64	-0,31	0,51	0,32	0,37	0,44	0,32	0,42	0,51	0,22	0,40
Количество свешиваний	-0,61	0,14	-0,05	0,10	0,01	0,12	0,08	0,11	0,68	0,61	0,37	0,30

Таблица 3 – Значения коэффициентов ранговой корреляции Спирмена между исследуемыми показателями поведенческой активности в группе стрессированного контроля (r_s)

	Число пересеченных ЦК	Время, проведенное в ЦК	Число пересеченных ПК	Время, проведенное в ПК	Число вставаний периф.	Количество актов груминга	Количество уринаций	Количество фекальных болюсов	Время в ОР	Время в ЗР	Время на центральной площадке	Количество свешиваний
Число пересеченных ЦК	1,00	0,90	0,37	-0,90	0,19	-0,43	0,45	0,44	0,36	-0,17	-0,33	0,13
Время, проведенное в ЦК	0,90	1,00	0,21	-1,00	0,09	-0,49	0,22	0,19	0,61	-0,39	-0,33	0,26
Число пересеченных ПК	0,37	0,21	1,00	-0,21	0,80	-0,07	0,13	-0,12	-0,33	0,43	-0,31	-0,35
Время, проведенное в ПК	-0,90	-1,00	-0,21	1,00	-0,09	0,49	-0,22	-0,19	-0,61	0,39	0,33	-0,26
Число вставаний периф.	0,19	0,09	0,80	-0,09	1,00	-0,26	-0,33	-0,46	-0,24	0,23	-0,04	-0,24
Количество актов груминга	-0,43	-0,49	-0,07	0,49	-0,26	1,00	0,35	0,10	-0,73	0,76	-0,28	-0,82
Количество уринаций	0,45	0,22	0,13	-0,22	-0,33	0,35	1,00	0,88	-0,17	0,28	-0,29	-0,25
Количество фекальных болюсов	0,44	0,19	-0,12	-0,19	-0,46	0,10	0,88	1,00	-0,04	0,00	0,07	0,00
Время в ОР	0,36	0,61	-0,33	-0,61	-0,24	-0,73	-0,17	-0,04	1,00	-0,90	0,08	0,85
Время в ЗР	-0,17	-0,39	0,43	0,39	0,23	0,76	0,28	0,00	-0,90	1,00	-0,50	-0,86
Время на центральной площадке	-0,33	-0,33	-0,31	0,33	-0,04	-0,28	-0,29	0,07	0,08	-0,50	1,00	0,28
Количество свешиваний	0,13	0,26	-0,35	-0,26	-0,24	-0,82	-0,25	0,00	0,85	-0,86	0,28	1,00

Таблица 4 – Значения коэффициентов ранговой корреляции Спирмена между исследуемыми показателями в группе стрессированного контроля (r_s)

	КС	ГК	БК	ТК	НФ	ЛФ	МФ	ПЦ	Лактобациллы	Бифидобактерии	Е. coli с норм. ферм. акт.	Е. coli со сниж. ферм. акт.
КС	1,00	-0,72	-0,54	0,86	0,88	-0,22	0,89	0,41	-0,88	-0,76	-0,17	-0,06
ГК	-0,72	1,00	0,50	-0,73	-0,83	0,26	-0,83	-0,17	0,58	0,53	-0,05	0,08
БК	-0,54	0,50	1,00	-0,28	-0,34	0,48	-0,54	0,17	0,24	0,60	0,26	-0,01
ТК	0,86	-0,73	-0,28	1,00	0,91	-0,33	0,83	0,55	-0,88	-0,53	-0,22	0,25
НФ	0,88	-0,83	-0,34	0,91	1,00	-0,19	0,93	0,47	-0,90	-0,67	-0,05	-0,05
ЛФ	-0,22	0,26	0,48	-0,33	-0,19	1,00	-0,35	0,43	0,19	0,23	0,54	-0,70
МФ	0,89	-0,83	-0,54	0,83	0,93	-0,35	1,00	0,25	-0,77	-0,62	-0,20	0,02
ПЦ	0,41	-0,17	0,17	0,55	0,47	0,43	0,25	1,00	-0,57	-0,18	0,02	-0,07
Лактобациллы	-0,88	0,58	0,24	-0,88	-0,90	0,19	-0,77	-0,57	1,00	0,76	0,10	0,00
Бифидобактерии	-0,76	0,53	0,60	-0,53	-0,67	0,23	-0,62	-0,18	0,76	1,00	-0,05	0,28
Е. coli с норм. ферм. акт.	-0,17	-0,05	0,26	-0,22	-0,05	0,54	-0,20	0,02	0,10	-0,05	1,00	-0,79
Е. coli со сниж. ферм. акт.	-0,06	0,08	-0,01	0,25	-0,05	-0,70	0,02	-0,07	0,00	0,28	-0,79	1,00
Число пересеченных ЦК	-0,21	0,15	-0,16	-0,44	-0,45	0,40	-0,33	-0,10	0,56	0,37	-0,05	-0,19
Время, проведенное в ЦК	-0,43	0,32	0,12	-0,48	-0,62	0,28	-0,53	-0,14	0,67	0,65	-0,20	0,14
Число пересеченных ПК	0,28	-0,08	-0,30	-0,05	0,07	-0,06	0,31	-0,39	0,06	-0,08	-0,31	-0,11

Продолжение

Время, проведенное в ПК	0,43	-0,32	-0,12	0,48	0,62	-0,28	0,53	0,14	-0,67	-0,65	0,20	-0,14
Число вставаний периф.	0,17	0,04	-0,39	-0,07	-0,08	-0,38	0,15	-0,57	0,13	-0,14	-0,25	0,09
Количество актов груминга	0,85	-0,69	-0,26	0,88	0,89	-0,22	0,78	0,55	-0,94	-0,66	-0,24	0,11
Количество уринаций	0,35	-0,28	-0,23	0,04	0,21	0,50	0,20	0,32	-0,21	-0,25	0,16	-0,57
Количество фекальных болюсов	0,11	-0,30	-0,21	-0,13	0,08	0,55	0,05	0,21	0,02	-0,13	0,48	-0,70
Время в ОР	-0,90	0,79	0,48	-0,78	-0,93	0,21	-0,93	-0,24	0,80	0,77	0,00	0,20
Время в ЗР	0,92	-0,62	-0,37	0,80	0,87	-0,04	0,86	0,48	-0,81	-0,64	-0,20	-0,10
Время на центральной площадке	-0,33	-0,16	-0,10	-0,27	-0,14	-0,32	-0,13	-0,61	0,26	-0,06	0,49	-0,16
Количество свешиваний	-0,91	0,79	0,43	-0,83	-0,84	0,28	-0,82	-0,27	0,78	0,65	0,24	-0,07

Таблица 5 – Значения коэффициентов ранговой корреляции Спирмена между исследуемыми показателями поведенческой активности в условиях иммобилизационного стресса и применения АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 5 мкг/кг (r_s)

	Число пересеченных ЦК	Время, проведенное в ЦК	Число пересеченных ПК	Время, проведенное в ПК	Число вставаний периф.	Количество актов груминга	Количество уринаций	Количество фекальных болюсов	Время в ОР	Время в ЗР	Время на центральной площадке	Количество свешиваний
Число пересеченных ЦК	1,00	0,93	0,30	-0,93	0,20	0,51	0,52	0,05	-0,37	0,47	-0,36	-0,10
Время, проведенное в ЦК	0,93	1,00	0,23	-1,00	0,10	0,29	0,34	0,00	-0,43	0,46	-0,22	0,02
Число пересеченных ПК	0,30	0,23	1,00	-0,23	0,69	-0,06	-0,03	0,73	-0,49	0,51	-0,23	0,21
Время, проведенное в ПК	-0,93	-1,00	-0,23	1,00	-0,10	-0,29	-0,34	0,00	0,43	-0,46	0,22	-0,02
Число вставаний периф.	0,20	0,10	0,69	-0,10	1,00	-0,28	-0,04	0,15	-0,77	0,65	-0,02	0,38
Количество актов груминга	0,51	0,29	-0,06	-0,29	-0,28	1,00	0,89	0,02	0,30	-0,07	-0,44	-0,64
Количество уринаций	0,52	0,34	-0,03	-0,34	-0,04	0,89	1,00	-0,08	0,13	-0,04	-0,17	-0,47
Количество фекальных болюсов	0,05	0,00	0,73	0,00	0,15	0,02	-0,08	1,00	0,04	-0,03	0,00	0,00
Время в ОР	-0,37	-0,43	-0,49	0,43	-0,77	0,30	0,13	0,04	1,00	-0,91	0,15	-0,37
Время в ЗР	0,47	0,46	0,51	-0,46	0,65	-0,07	-0,04	-0,03	-0,91	1,00	-0,55	0,30
Время на центральной площадке	-0,36	-0,22	-0,23	0,22	-0,02	-0,44	-0,17	0,00	0,15	-0,55	1,00	0,02
Количество свешиваний	-0,10	0,02	0,21	-0,02	0,38	-0,64	-0,47	0,00	-0,37	0,30	0,02	1,00

Таблица 6 – Значения коэффициентов ранговой корреляции Спирмена между исследуемыми показателями в условиях иммобилизационного стресса и применения АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 5 мкг/кг (r_s)

	КС	ГК	БК	ТК	НФ	ЛФ	МФ	ПЦ	Лактобациллы	Бифидобактерии	Е. coli с норм. ферм. акт.	Е. coli со сниж. ферм. акт.
КС	1,00	0,11	0,02	0,13	0,03	0,05	-0,02	0,94	-0,59	-0,37	-0,27	-0,35
ГК	0,11	1,00	0,99	0,25	0,02	0,08	-0,02	-0,12	-0,49	0,28	0,22	-0,36
БК	0,02	0,99	1,00	0,34	0,13	0,18	0,09	-0,22	-0,51	0,35	0,25	-0,30
ТК	0,13	0,25	0,34	1,00	0,97	0,97	0,95	0,10	-0,40	-0,19	0,44	-0,31
НФ	0,03	0,02	0,13	0,97	1,00	0,97	0,99	0,05	-0,24	-0,16	0,38	-0,16
ЛФ	0,05	0,08	0,18	0,97	0,97	1,00	0,98	0,06	-0,32	-0,25	0,49	-0,28
МФ	-0,02	-0,02	0,09	0,95	0,99	0,98	1,00	0,02	-0,21	-0,18	0,46	-0,20
ПЦ	0,94	-0,12	-0,22	0,10	0,05	0,06	0,02	1,00	-0,37	-0,53	-0,13	-0,45
Лактобациллы	-0,59	-0,49	-0,51	-0,40	-0,24	-0,32	-0,21	-0,37	1,00	-0,15	0,10	0,23
Бифидобактерии	-0,37	0,28	0,35	-0,19	-0,16	-0,25	-0,18	-0,53	-0,15	1,00	-0,28	0,44
Е. coli с норм. ферм. акт.	-0,27	0,22	0,25	0,44	0,38	0,49	0,46	-0,13	0,10	-0,28	1,00	-0,74
Е. coli со сниж. ферм. акт.	-0,35	-0,36	-0,30	-0,31	-0,16	-0,28	-0,20	-0,45	0,23	0,44	-0,74	1,00
Число пересеченных ЦК	0,42	-0,13	-0,14	0,11	0,19	0,05	0,13	0,42	-0,12	0,27	-0,36	0,08
Время, проведенное в ЦК	0,23	0,01	0,05	0,33	0,40	0,24	0,34	0,22	-0,17	0,39	-0,18	0,05
Число пересеченных ПК	0,04	0,00	0,00	-0,04	-0,02	-0,08	-0,07	-0,09	-0,13	0,32	-0,55	0,35

Продолжение

Время, проведенное в ПК	-0,23	-0,01	-0,05	-0,33	-0,40	-0,24	-0,34	-0,22	0,17	-0,39	0,18	-0,05
Число вставаний периф.	-0,09	0,12	0,15	-0,27	-0,28	-0,24	-0,28	-0,31	-0,26	0,64	-0,40	0,35
Количество актов груминга	0,90	-0,19	-0,26	0,14	0,13	0,11	0,08	0,92	-0,29	-0,53	-0,29	-0,20
Количество уринаций	0,84	-0,15	-0,18	0,14	0,13	0,12	0,07	0,78	-0,52	-0,30	-0,40	-0,03
Количество фекальных болюсов	0,02	-0,08	-0,12	-0,09	-0,10	-0,15	-0,15	0,01	0,13	-0,19	-0,37	0,12
Время в ОР	0,13	-0,27	-0,33	-0,20	-0,18	-0,21	-0,19	0,26	0,30	-0,62	-0,12	0,08
Время в ЗР	0,03	0,25	0,30	0,30	0,28	0,30	0,28	-0,09	-0,20	0,44	0,10	-0,11
Время на центральной площадке	-0,33	-0,06	-0,04	-0,31	-0,31	-0,28	-0,28	-0,31	-0,12	0,20	0,01	0,11
Количество свешиваний	-0,80	-0,12	0,01	0,09	0,21	0,18	0,22	-0,86	0,38	0,43	0,01	0,58

Таблица 7 – Значения коэффициентов ранговой корреляции Спирмена между исследуемыми показателями поведенческой активности в условиях иммобилизационного стресса и применения АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 50 мкг/кг (r_s)

	Число пересеченных ЦК	Время, проведенное в ЦК	Число пересеченных ПК	Время, проведенное в ПК	Число вставаний периф.	Количество актов груминга	Количество уринаций	Количество фекальных болюсов	Время в ОР	Время в ЗР	Время на центральной площадке	Количество свешиваний
Число пересеченных ЦК	1,00	0,91	0,65	-0,91	0,18	-0,25	-0,29	-0,10	0,60	-0,67	0,32	0,60
Время, проведенное в ЦК	0,91	1,00	0,36	-1,00	0,02	-0,23	-0,26	-0,14	0,48	-0,53	0,23	0,41
Число пересеченных ПК	0,65	0,36	1,00	-0,36	0,62	-0,38	-0,42	-0,30	0,40	-0,47	0,36	0,89
Время, проведенное в ПК	-0,91	-1,00	-0,36	1,00	-0,02	0,23	0,26	0,14	-0,48	0,53	-0,23	-0,41
Число вставаний периф.	0,18	0,02	0,62	-0,02	1,00	-0,43	-0,56	-0,62	0,11	-0,20	0,53	0,50
Количество актов груминга	-0,25	-0,23	-0,38	0,23	-0,43	1,00	0,89	0,87	-0,52	0,46	0,43	-0,52
Количество уринаций	-0,29	-0,26	-0,42	0,26	-0,56	0,89	1,00	0,84	-0,57	0,55	0,22	-0,54
Количество фекальных болюсов	-0,10	-0,14	-0,30	0,14	-0,62	0,87	0,84	1,00	-0,40	0,38	0,17	-0,37
Время в ОР	0,60	0,48	0,40	-0,48	0,11	-0,52	-0,57	-0,40	1,00	-0,99	-0,20	0,29
Время в ЗР	-0,67	-0,53	-0,47	0,53	-0,20	0,46	0,55	0,38	-0,99	1,00	0,03	-0,33
Время на центральной площадке	0,32	0,23	0,36	-0,23	0,53	0,43	0,22	0,17	-0,20	0,03	1,00	0,17
Количество свешиваний	0,60	0,41	0,89	-0,41	0,50	-0,52	-0,54	-0,37	-0,66	-0,33	0,17	1,00

Таблица 8 – Значения коэффициентов ранговой корреляции Спирмена между исследуемыми показателями в условиях иммобилизационного стресса и применения АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 50 мкг/кг (r_s)

	КС	ГК	БК	ТК	НФ	ЛФ	МФ	ПЦ	Лактобациллы	Бифидобактерии	Е. coli с норм. ферм. акт.	Е. coli со сниж. ферм. акт.
КС	1,00	-0,83	0,00	0,55	0,44	0,64	0,78	0,72	-0,68	-0,70	-0,53	0,53
ГК	-0,83	1,00	-0,27	-0,61	-0,42	-0,74	-0,52	-0,52	0,54	0,57	0,37	-0,26
БК	0,00	-0,27	1,00	0,40	-0,56	-0,10	-0,28	-0,37	-0,22	0,02	0,01	-0,16
ТК	0,55	-0,61	0,40	1,00	0,31	0,37	0,60	0,56	-0,44	-0,28	0,10	-0,18
НФ	0,44	-0,42	-0,56	0,31	1,00	0,69	0,62	0,74	-0,02	-0,23	0,03	-0,14
ЛФ	0,64	-0,74	-0,10	0,37	0,69	1,00	0,58	0,64	-0,33	-0,35	-0,33	0,08
МФ	0,78	-0,52	-0,28	0,60	0,62	0,58	1,00	0,97	-0,50	-0,48	-0,13	0,22
ПЦ	0,72	-0,52	-0,37	0,56	0,74	0,64	0,97	1,00	-0,46	-0,44	-0,09	0,18
Лактобациллы	-0,68	0,54	-0,22	-0,44	-0,02	-0,33	-0,50	-0,46	1,00	0,84	0,72	-0,71
Бифидобактерии	-0,70	0,57	0,02	-0,28	-0,23	-0,35	-0,48	-0,44	0,84	1,00	0,80	-0,68
Е. coli с норм. ферм. акт.	-0,53	0,37	0,01	0,10	0,03	-0,33	-0,13	-0,09	0,72	0,80	1,00	-0,82
Е. coli со сниж. ферм. акт.	0,53	-0,26	-0,16	-0,18	-0,14	0,08	0,22	0,18	-0,71	-0,68	-0,82	1,00
Число пересеченных ЦК	-0,24	0,05	0,12	-0,28	-0,29	0,02	-0,05	-0,04	-0,10	0,01	0,05	0,10
Время, проведенное в ЦК	-0,26	0,03	-0,04	-0,15	-0,04	0,03	0,07	0,10	0,10	0,10	0,32	-0,15
Число пересеченных ПК	-0,31	0,11	0,39	-0,55	-0,63	-0,23	-0,56	-0,55	-0,07	0,05	-0,21	0,31

Продолжение

Время, проведенное в ПК	0,26	-0,03	0,04	0,15	0,04	-0,03	-0,07	-0,10	-0,10	-0,10	-0,32	0,15
Число вставаний периф.	-0,45	0,45	-0,26	-0,87	-0,36	-0,37	-0,64	-0,57	0,40	0,39	-0,02	0,25
Количество актов груминга	0,88	-0,74	0,06	0,68	0,41	0,59	0,77	0,74	-0,49	-0,32	-0,17	0,30
Количество уринаций	0,97	-0,84	0,06	0,64	0,48	0,70	0,78	0,72	-0,56	-0,58	-0,41	0,33
Количество фекальных болюсов	0,87	-0,68	0,14	0,72	0,35	0,55	0,85	0,81	-0,77	-0,59	-0,34	0,40
Время в ОР	-0,66	0,50	0,30	-0,26	-0,49	-0,18	-0,40	-0,40	0,28	0,53	0,31	-0,41
Время в ЗР	0,62	-0,46	-0,26	0,31	0,48	0,13	0,38	0,37	-0,27	-0,54	-0,30	0,34
Время на центральной площадке	0,32	-0,30	-0,26	-0,26	0,10	0,30	0,17	0,23	-0,08	0,04	-0,12	0,48
Количество свешиваний	-0,41	0,10	0,32	-0,46	-0,46	-0,28	-0,59	-0,53	-0,08	-0,05	-0,13	0,19

Таблица 9 – Значения коэффициентов ранговой корреляции Спирмена между исследуемыми показателями поведенческой активности в условиях иммобилизационного стресса и применения АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 150 мкг/кг (r_s)

	Число пересеченных ЦК	Время, проведенное в ЦК	Число пересеченных ПК	Время, проведенное в ПК	Число вставаний периф.	Количество актов груминга	Количество уринаций	Количество фекальных болюсов	Время в ОР	Время в ЗР	Время на центральной площадке	Количество свешиваний
Число пересеченных ЦК	1,00	0,99	0,23	-0,99	0,21	-0,18	-0,44	-0,07	0,16	-0,05	-0,34	0,08
Время, проведенное в ЦК	0,99	1,00	0,13	-1,00	0,13	-0,17	-0,49	-0,07	0,20	-0,08	-0,36	0,02
Число пересеченных ПК	0,23	0,13	1,00	-0,13	0,59	-0,15	-0,15	0,15	-0,38	0,47	-0,30	0,29
Время, проведенное в ПК	-0,99	-1,00	-0,13	1,00	-0,13	0,17	0,49	0,07	-0,20	0,08	0,36	-0,02
Число вставаний периф.	0,21	0,13	0,59	-0,13	1,00	0,21	0,15	0,60	-0,47	0,49	-0,10	0,03
Количество актов груминга	-0,18	-0,17	-0,15	0,17	0,21	1,00	0,67	0,65	-0,60	0,67	-0,27	0,44
Количество уринаций	-0,44	-0,49	-0,15	0,49	0,15	0,67	1,00	0,25	-0,42	0,40	0,04	0,23
Количество фекальных болюсов	-0,07	-0,07	0,15	0,07	0,60	0,65	0,25	1,00	-0,64	0,67	-0,13	0,33
Время в ОР	0,16	0,20	-0,38	-0,20	-0,47	-0,60	-0,42	-0,64	1,00	-0,95	-0,11	-0,41
Время в ЗР	-0,05	-0,08	0,47	0,08	0,49	0,67	0,40	0,67	-0,95	1,00	-0,21	0,50
Время на центральной площадке	-0,34	-0,36	-0,30	0,36	-0,10	-0,27	0,04	-0,13	-0,11	-0,21	1,00	-0,29
Количество свешиваний	0,08	0,02	0,29	-0,02	0,03	0,44	0,23	0,33	-0,41	0,50	-0,29	1,00

Таблица 10 – Значения коэффициентов ранговой корреляции Спирмена между исследуемыми показателями в условиях иммобилизационного стресса и применения АКГГ₄₋₇-PGP в дозе 150 мкг/кг (r_s)

	КС	ГК	БК	ТК	НФ	ЛФ	МФ	ПЦ	Лактобациллы	Бифидобактерии	Е. coli с норм. ферм. акт.	Е. coli со сниж. ферм. акт.
КС	1,00	-0,36	-0,17	0,65	0,94	0,20	0,94	0,23	-0,98	-0,94	-0,91	0,74
ГК	-0,36	1,00	0,71	0,06	-0,24	-0,16	-0,15	-0,07	0,35	0,31	0,41	-0,18
БК	-0,17	0,71	1,00	0,27	-0,13	0,25	-0,02	0,47	0,14	0,21	0,21	-0,14
ТК	0,65	0,06	0,27	1,00	0,57	0,23	0,59	0,23	-0,63	-0,71	-0,49	0,52
НФ	0,94	-0,24	-0,13	0,57	1,00	0,08	0,88	0,25	-0,90	-0,84	-0,76	0,62
ЛФ	0,20	-0,16	0,25	0,23	0,08	1,00	0,06	0,77	-0,28	-0,23	-0,26	0,06
МФ	0,94	-0,15	-0,02	0,59	0,88	0,06	1,00	0,13	-0,91	-0,85	-0,88	0,77
ПЦ	0,23	-0,07	0,47	0,23	0,25	0,77	0,13	1,00	-0,25	-0,10	-0,11	-0,20
Лактобациллы	-0,98	0,35	0,14	-0,63	-0,90	-0,28	-0,91	-0,25	1,00	0,95	0,94	-0,74
Бифидобактерии	-0,94	0,31	0,21	-0,71	-0,84	-0,23	-0,85	-0,10	0,95	1,00	0,91	-0,81
Е. coli с норм. ферм. акт.	-0,91	0,41	0,21	-0,49	-0,76	-0,26	-0,88	-0,11	0,94	0,91	1,00	-0,87
Е. coli со сниж. ферм. акт.	0,74	-0,18	-0,14	0,52	0,62	0,06	0,77	-0,20	-0,74	-0,81	-0,87	1,00
Число пересеченных ЦК	-0,30	0,04	0,38	-0,30	-0,24	0,09	-0,27	0,13	0,26	0,34	0,14	0,03
Время, проведенное в ЦК	-0,33	0,06	0,39	-0,28	-0,25	0,11	-0,33	0,17	0,28	0,35	0,20	-0,04
Число пересеченных ПК	0,30	-0,16	0,06	0,05	0,21	0,49	0,35	0,34	-0,27	-0,24	-0,45	0,48

Продолжение

Время, проведенное в ПК	0,33	-0,06	-0,39	0,28	0,25	-0,11	0,33	-0,17	-0,28	-0,35	-0,20	0,04
Число вставаний периф.	0,54	-0,22	0,21	0,04	0,50	0,38	0,64	0,57	-0,57	-0,33	-0,60	0,34
Количество актов груминга	0,77	-0,30	-0,12	0,66	0,71	-0,18	0,72	-0,07	-0,78	-0,79	-0,71	0,63
Количество уринаций	0,60	-0,39	-0,59	0,15	0,51	-0,41	0,63	-0,51	-0,60	-0,61	-0,65	0,56
Количество фекальных болюсов	0,71	-0,13	0,35	0,68	0,58	0,50	0,69	0,54	-0,80	-0,69	-0,71	0,47
Время в ОР	-0,90	0,48	0,21	-0,64	-0,82	-0,38	-0,78	-0,28	0,88	0,85	0,82	-0,71
Время в ЗР	0,92	-0,40	-0,13	0,66	0,85	0,37	0,81	0,27	-0,91	-0,92	-0,90	0,82
Время на центральной площадке	-0,12	-0,22	-0,22	-0,09	-0,11	-0,01	-0,16	0,01	0,16	0,25	0,28	-0,41
Количество свешиваний	0,39	0,26	0,27	0,65	0,28	-0,09	0,51	-0,29	-0,37	-0,48	-0,46	0,78

Таблица 11 – Значения коэффициентов ранговой корреляции Спирмена между исследуемыми показателями поведенческой активности в условиях иммобилизационного стресса и применения АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 450 мкг/кг (r_s)

	Число пересеченных ЦК	Время, проведенное в ЦК	Число пересеченных ПК	Время, проведенное в ПК	Число вставаний периф.	Количество актов груминга	Количество уринаций	Количество фекальных болюсов	Время в ОР	Время в ЗР	Время на центральной площадке	Количество свешиваний
Число пересеченных ЦК	1,00	1,00	0,36	-1,00	0,76	-0,56	-0,47	-0,42	-0,11	0,09	0,08	-0,09
Время, проведенное в ЦК	1,00	1,00	0,35	-1,00	0,75	-0,58	-0,50	-0,43	-0,09	0,07	0,07	-0,09
Число пересеченных ПК	0,36	0,35	1,00	-0,35	0,76	0,24	-0,21	0,29	-0,70	0,61	0,31	-0,20
Время, проведенное в ПК	-1,00	-1,00	-0,35	1,00	-0,75	0,58	0,50	0,43	0,09	-0,07	-0,07	0,09
Число вставаний периф.	0,76	0,75	0,76	-0,75	1,00	-0,17	-0,29	-0,01	-0,49	0,48	0,04	-0,19
Количество актов груминга	-0,56	-0,58	0,24	0,58	-0,17	1,00	0,44	0,82	-0,18	0,10	0,26	-0,18
Количество уринаций	-0,47	-0,50	-0,21	0,50	-0,29	0,44	1,00	0,06	0,26	-0,34	0,26	-0,31
Количество фекальных болюсов	-0,42	-0,43	0,29	0,43	-0,01	0,82	0,06	1,00	-0,35	0,36	-0,03	-0,05
Время в ОР	-0,11	-0,09	-0,70	0,09	-0,49	-0,18	0,26	-0,35	1,00	-0,95	-0,16	-0,48
Время в ЗР	0,09	0,07	0,61	-0,07	0,48	0,10	-0,34	0,36	-0,95	1,00	-0,15	0,46
Время на центральной площадке	0,08	0,07	0,31	-0,07	0,04	0,26	0,26	-0,03	-0,16	-0,15	1,00	0,07
Количество свешиваний	-0,09	-0,09	-0,20	0,09	-0,19	-0,18	-0,31	-0,05	-0,48	0,46	0,07	1,00

Таблица 12 – Значения коэффициентов ранговой корреляции Спирмена между исследуемыми показателями в условиях иммобилизационного стресса и применения АКГГ₄₋₇-PGP в дозе 450 мкг/кг (r_s)

	КС	ГК	БК	ТК	НФ	ЛФ	МФ	ПЦ	Лактоба циллы	Бифидоб актерии	Е. coli с норм. ферм. акт.	Е. coli со сниж. ферм. акт.
КС	1,00	0,08	0,02	0,20	0,43	0,60	0,51	0,49	-0,36	-0,11	0,23	-0,15
ГК	0,08	1,00	0,73	0,39	0,21	0,04	0,02	0,14	-0,11	-0,09	-0,26	0,08
БК	0,02	0,73	1,00	0,50	0,25	0,16	0,27	0,25	0,21	0,04	0,24	0,28
ТК	0,20	0,39	0,50	1,00	0,86	0,75	0,79	0,82	0,43	-0,32	0,22	0,02
НФ	0,43	0,21	0,25	0,86	1,00	0,84	0,83	0,88	0,43	-0,12	0,03	0,11
ЛФ	0,60	0,04	0,16	0,75	0,84	1,00	0,95	0,93	0,33	-0,48	0,36	-0,11
МФ	0,51	0,02	0,27	0,79	0,83	0,95	1,00	0,94	0,48	-0,30	0,51	-0,07
ПЦ	0,49	0,14	0,25	0,82	0,88	0,93	0,94	1,00	0,50	-0,30	0,23	-0,23
Лактобациллы	-0,36	-0,11	0,21	0,43	0,43	0,33	0,48	0,50	1,00	0,11	0,13	0,12
Бифидобактерии	-0,11	-0,09	0,04	-0,32	-0,12	-0,48	-0,30	-0,30	0,11	1,00	-0,21	0,25
Е. coli с норм. ферм. акт.	0,23	-0,26	0,24	0,22	0,03	0,36	0,51	0,23	0,13	-0,21	1,00	0,03
Е. coli со сниж. ферм. акт.	-0,15	0,08	0,28	0,02	0,11	-0,11	-0,07	-0,23	0,12	0,25	0,03	1,00
Число пересеченных ЦК	-0,68	-0,21	0,29	-0,11	-0,25	-0,31	-0,20	-0,29	0,49	0,18	0,17	0,52
Время, проведенное в ЦК	-0,67	-0,25	0,26	-0,11	-0,24	-0,29	-0,18	-0,28	0,49	0,16	0,17	0,52
Число пересеченных ПК	-0,38	-0,08	0,07	-0,08	-0,01	-0,35	-0,28	-0,31	0,03	0,57	-0,25	0,37

Продолжение

Время, проведенное в ПК	0,67	0,25	-0,26	0,11	0,24	0,29	0,18	0,28	-0,49	-0,16	-0,17	-0,52
Число вставаний периф.	-0,73	-0,24	0,10	-0,33	-0,44	-0,65	-0,51	-0,57	0,18	0,54	-0,06	0,30
Количество актов груминга	0,41	0,46	0,14	0,16	0,19	-0,10	-0,12	-0,08	-0,61	0,27	-0,25	0,08
Количество уринаций	0,27	0,25	-0,02	-0,21	-0,17	-0,20	-0,09	-0,21	-0,28	0,28	0,14	0,07
Количество фекальных болюсов	0,34	0,40	0,29	0,26	0,14	-0,01	-0,02	0,03	-0,56	0,13	-0,05	-0,22
Время в ОР	0,47	-0,35	-0,24	-0,18	-0,09	0,22	0,19	0,04	-0,17	-0,27	0,46	0,13
Время в ЗР	-0,41	0,28	0,20	0,05	-0,02	-0,26	-0,24	-0,05	0,13	0,30	-0,49	-0,32
Время на центральной площадке	-0,20	0,21	0,14	0,41	0,35	0,13	0,18	0,03	0,14	-0,11	0,09	0,61
Количество свешиваний	-0,37	0,47	0,16	0,42	0,18	0,17	0,07	0,29	0,27	-0,53	-0,37	-0,40