

# Эффекты репродуктивных технологий и SPF-статуса на некоторые физиологические и поведенческие характеристики крыс с артериальной гипертензией (линия НИСАГ)

Д.С. Рагаева<sup>1</sup>, Т.О. Абрамова<sup>1</sup>, И.Н. Рожкова<sup>1</sup>, Е.Ю. Брусенцев<sup>1</sup>, Е.В. Калиниченко<sup>2</sup>, Т.Н. Игонина<sup>1</sup>, С.Я. Амстиславский<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Современные стандарты в исследованиях на лабораторных животных направлены на то, чтобы работать с лабораторными животными высокого качества, в частности со свободными от специфических патогенов (SPF) мышами и крысами. С другой стороны, вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) широко используются в современной медицине для лечения бесплодия человека, а также для создания криобанков генетических ресурсов. В данной работе проведено сравнение массы тела, артериального давления (АД) и поведения в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) трех групп крыс линии НИСАГ (наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертензия): группа крыс, рожденных и выращенных в конвенциональном виварии, и двух групп из SPF-вивария (рожденных естественным путем и полученных путем применения репродуктивных технологий). Различий по величине АД между исследуемыми группами обнаружено не было, но выявлены различия в поведении крыс линии НИСАГ при разных условиях содержания. Время груминга, а также число актов дефекации и урикации за время теста было достоверно ниже у крыс обеих групп, родившихся в условиях SPF-вивария, по сравнению с крысами, рожденными в условиях конвенционального вивария. Поведение крыс линии НИСАГ, рожденных при помощи ВРТ, отличалось от поведения крыс линии НИСАГ, рожденных естественным путем. Тест ПКЛ выявил снижение тревожности у первых. Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что как условия содержания, так и применение репродуктивных технологий влияют на поведение крыс линии НИСАГ, при этом гипертензия развивается во всех случаях.

Ключевые слова: крысы НИСАГ; артериальное давление; вспомогательные репродуктивные технологии; поведение.

## КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Рагаева Д.С., Абрамова Т.О., Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Калиниченко Е.В., Игонина Т.Н., Амстиславский С.Я. Эффекты репродуктивных технологий и SPF-статуса на некоторые физиологические и поведенческие характеристики крыс с артериальной гипертензией (линия НИСАГ). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):383-387. DOI 10.18699/VJ15.048

## HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Ragaeva D.S., Abramova T.O., Rozhkova I.N., Brusentsev E.Yu., Kalinichenko E.V., Igonina T.N., Amstislavsky S.Ya. Effects of reproductive technologies and SPF status on some physiological and behavioral characteristics in rats with arterial hypertension (ISIAH strain). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):383-387. DOI 10.18699/VJ15.048

DOI 10.18699/VJ15.048

УДК 573.7:575:591.3:592/599

Поступила в редакцию 23.06.2015 г.

Принята к публикации 10.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

 e-mail: amstis@bionet.nsc.ru

## Effects of reproductive technologies and SPF status on some physiological and behavioral characteristics in rats with arterial hypertension (ISIAH strain)

D.S. Ragaeva<sup>1</sup>, T.O. Abramova<sup>1</sup>, I.N. Rozhkova<sup>1</sup>, E.Yu. Brusentsev<sup>1</sup>, E.V. Kalinichenko<sup>2</sup>, T.N. Igonina<sup>1</sup>, S.Ya. Amstislavsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Modern standards of Laboratory Animal Science include working with laboratory animals of high quality, in particular, with specific pathogen free (SPF) mice and rats. On the other hand, assisted reproductive technologies (ART) are widely used in modern medicine for human infertility treatment as well as for genome resource banking. In the present study, a comparison of body weight, blood pressure (BP) and behavior in the «elevated plus maze» (EPM) test was made between three groups of ISIAH (inherited stress induced arterial hypertension) rats: a group of animals that were born and raised in a conventional animal facility and two groups from an SPF animal facility (one with animals born naturally and another with animals resulting from ART). There were no changes in BP between the groups, but the behavior of ISIAH differed depending on rearing conditions. In particular, grooming time, as well as the number of defecations and the number of urinations during the test were decreased in both groups of ISIAH rats born in the SPF animal facility as compared to ISIAH rats born in the conventional animal facility. The behavior of the ISIAH rat offspring resulting from ART was different from that of the naturally born group: the EPM test revealed reduced anxiety in the former. The results of the present study indicate that the rearing conditions as well as reproductive technologies affect some behavioral characteristics in adult ISIAH rats, although they develop arterial hypertension in all the conditions used in this study.

Key words: ISIAH rats; blood pressure; assisted reproductive technologies; behavior.

Традиционно механизмы формирования артериальной гипертензии изучают преимущественно на специальных моделях, созданных на лабораторных животных, главным образом на гипертензивных линиях крыс (Рагаева и др., 2014). В ИЦиГ СО РАН путем селекции получена линия крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ), физиологические и поведенческие характеристики которой достаточно полно описаны (Маркель, 1981; Амстиславский, 2006; Рагаева и др., 2014). Однако до настоящего времени исследования проводили на крысах НИСАГ конвенционального статуса. Относительно недавно линия крыс НИСАГ была редеривирована и появилась в коллекции SPF-вивария ИЦиГ СО РАН (Амстиславский и др., 2013).

Придание SPF-статуса животным позволяет получать более точные результаты исследований, а также уменьшить число экспериментальных животных в группах за счет уменьшения неконтролируемой изменчивости (Festing et al., 1998). В литературе, однако, имеются данные о том, что некоторые физиологические и биохимические характеристики экспериментальных животных, такие как содержание белка фактора роста нервов у мышей и некоторые другие, могут изменяться в зависимости от того, в каком виварии выращивают крыс: в SPF- или конвенциональном виварии (Tanaka, Matsuda, 2005). С другой стороны, вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ), такие как культивирование *in vitro* в сочетании с трансплантацией и криоконсервацией эмбрионов, широко используют в медицине и биологической науке, но отдаленные эффекты по отношению к поведению и физиологическому статусу потомков изучены недостаточно (Рагаева и др., 2014).

Задачами данного исследования было сравнить (1) физиологические параметры (вес и кровяное давление) и (2) характеристики поведения у крыс НИСАГ трех различных групп: родившихся в конвенциональном виварии в результате естественного размножения; родившихся в SPF-виварии в результате естественного размножения; родившихся в SPF-виварии в результате ВРТ.

## Материалы и методы

### Экспериментальные животные

В качестве доноров эмбрионов использовали половозрелых самок крыс НИСАГ (возраст 10–14 нед). Для получения эмбрионов самок крыс спаривали с самцами тех же линий и того же возраста. Среднее значение артериального давления (АД) для самок –  $159,5 \pm 1,1$ ; для самцов –  $177,0 \pm 0,9$ . Животных содержали в стандартных условиях конвенционального вивария ИЦиГ СО РАН при естественном освещении и свободном доступе к сбалансированному корму и воде.

Реципиентами для трансплантации эмбрионов крыс линии НИСАГ явились гибриды, полученные путем скрещивания двух инбредных нормотензивных линий крыс, Sprague-Dawley и ручных крыс-пасюков (Амстиславский и др., 2013). Животные-реципиенты содержались в SPF-виварии ИЦиГ СО РАН при круглогодичных стандартных параметрах условий содержания в соответствии с требованиями GLP: комфортной температуре 22–24 °С,

свободном доступе к автоклавированному стандартному корму (V1534-300, Sniff, Soest, Германия) и очищенной воде, при режиме освещения 14 ч день / 10 ч ночь (Новосибирск, Россия).

Все эксперименты на животных были одобрены комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики (протокол № 5 от 13.05.2011) и соответствуют Европейской конвенции о защите позвоночных животных.

### Получение преимплантационных эмбрионов крыс

Проводили контролируемое спаривание самок-доноров НИСАГ с самцами той же линии. Определение фертильного спаривания проводили по наличию сперматозоидов в вагинальных мазках согласно стандартной методике (Амстиславский, 2006).

Самок крыс подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков. Яйцеводы и матку извлекали и промывали средой EMCARE Complete Ultra Flushing Solution (ICPbio Reproduction, США), как описано ранее (Амстиславский и др., 2013). Для получения преимплантационных эмбрионов на ранних стадиях дробления (2–4 бластомера) эмбрионы вымывали через 72 ч после обнаружения сперматозоидов во влагалищных мазках самок крыс (3-й день беременности). Эмбрионы подсчитывали и оценивали с использованием микроскопа МБС-10 (Россия). Качество эмбрионов оценивали с использованием таких критериев, как стадия эмбрионального развития и целостность *zona pellucida* (ZP) (Van Soom et al., 2010); число жизнеспособных клеток (Emiliani et al., 2000). Некачественные эмбрионы отбраковывали, эмбрионы хорошего качества промывали в трех каплях среды EMCARE™ Holding Solution (ICPbio reproduction, США) и замораживали, как описано ниже.

### Замораживание эмбрионов

После эквипирации в среде EMCARE™ Holding Solution (ICPbio reproduction, США) с криопротектором глицерином (10 % v/v глицерин (EMCARE, ICPbio Reproduction, США)) 10–15 эмбрионов помещали в пластиковые соломины вместимостью 0,25 мл (Cryo Bio System, Франция), каждая из которых была заполнена тремя порциями криопротектора, разделенными двумя воздушными пузырьками. Центральная часть содержала эмбрионы. Соломины с эмбрионами помещали в программный замораживатель CL 8 800 (CryoLogic, Австралия), охлаждали в соответствии со следующей программой: от 18 °С до –7 °С со скоростью –1 °С/мин; 10 мин при –7 °С, сидинг через 1 мин; от –7 °С до –35 °С со скоростью –0,3 °С/мин; 10 мин при –35 °С – и погружали в жидкий азот при этой температуре.

### Оттаивание, отмывание и культивирование эмбрионов

Эмбрионы крыс размораживали следующим способом: выдерживали в течение 40 с при комнатной температуре, а затем помещали на 40 с в водяную баню при 30,0 °С. После оттаивания содержимое соломины выдавливали на 35 мм чашки Петри (Corning, США), криопротектор удаляли с использованием специальной среды Thawing System (EMCARE, ICPbio Reproduction, США) при 37 °С.

**Таблица 1.** Масса тела и артериальное давление крыс исследуемых групп в возрасте 2 мес.

Группа (самцы)	Масса тела, г	Артериальное давление, мм рт. ст.
НИСАГ конвенциональные	231,0±8,2 (n = 5)	171,6±4,4 (n = 5)
НИСАГ SPF	258,0±4,5 (n = 10)*	165,0±5,5 (n = 10)
НИСАГ <i>in vitro</i>	251,7±15,8 (n = 7)	170,7±9,0 (n = 7)

В скобках указано число животных в исследуемых группах. \*  $p < 0,05$  по сравнению с конвенциональными животными. НИСАГ – линия крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией. SPF (specified pathogen free) означает отсутствие видоспецифичных патогенных микроорганизмов.

После удаления криопротектора эмбрионы, независимо от их качества, последовательно промывали в десяти каплях стерильной среды Holding Solution (200 мкл EMCARE, ICPBio Reproduction, США) со сменой стеклянных капилляров для стерильного переноса между каплями и оценивали визуально при помощи микроскопа M205 FA (Leica Microsystems) при увеличении до  $\times 230$ . Эмбрионы, у которых было разрушено более 25 % blastomeres и/или имелись нарушения прозрачной оболочки, были отбракованы, остальные поставлены на культивирование *in vitro*.

Эмбрионы крыс переносили в ранее подготовленные и уравновешенные в условиях CO<sub>2</sub> инкубатора BINDER 150-UL (Германия) (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C и 80 % влажности) капли объемом 50 мкл со средой для культивирования R1ECM (rat 1-cell culture medium) (Amstislavsky et al., 2015), покрывали минеральным маслом (Sigma, США) и культивировали в течение 48 ч. Каждые 24 ч оценивали стадию развития эмбрионов при помощи инвертированного микроскопа DM IL LED (Leica Microsystems, Германия) с увеличением  $\times 50$  и  $\times 100$  и производили фотосъемку. Для трансплантации отбирали эмбрионы, достигшие стадии морулы или blastocysts в течение 48 ч культивирования.

#### Трансплантация эмбрионов самкам-реципиентам

Для трансплантации эмбрионов крыс использовали самок-реципиентов 3-го дня беременности (считая день обнаружения сперматозоидов в вагинальном мазке 1-м днем). Операцию проводили по стандартной методике, описанной ранее (Амстиславский и др., 2013).

#### Методы исследования потомков

Исследования проводились на самцах из трех экспериментальных групп: НИСАГ из конвенционального вивария ( $n = 5$ ), НИСАГ из SPF-вивария ( $n = 10$ ) и НИСАГ *in vitro* – группа потомков, родившихся после культивирования эмбрионов *in vitro* и трансплантации ( $n = 7$ ).

#### Взвешивание

Взвешивание животных производили в возрасте 2 мес. на весах ScoutPro SPS2001 F (Ohaus Corporation, США) с точностью измерений 0,1 г.

#### Измерение артериального давления

Измерение артериального давления производили у крыс в возрасте 2 мес. сфигмографическим методом при по-

мощи манжеты, надеваемой на хвост и соединенной с датчиком давления Elema Schonender EMT-510 (Швеция), согласно ранее описанной методике (Амстиславский, 2006).

#### Поведенческие тесты

Для тестирования поведения использовали «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ). Тест заключался в следующем: тестируемое животное помещали в лабиринт, состоящий из симметрично расположенных 2 закрытых и 2 открытых рукавов. В течение пятиминутного тестирования фиксировались следующие параметры поведения, являющиеся обязательными при проведении данного теста (Rodgers, Cole, 1994): общее число заходов в открытые и закрытые рукава; время, проведенное в открытых и закрытых рукавах. Дополнительно оценивали число заходов в центр установки, время пребывания в центре, число вертикальных стоек, время, проведенное в стойках, число мочевых меток и актов дефекации, а также число и продолжительность актов груминга.

#### Статистический анализ

Результаты исследования физиологических и поведенческих показателей сравнивали с использованием U-критерия Манна–Уитни. Результаты при  $p < 0,05$  считали статистически значимыми. Данные были проанализированы с использованием стандартного пакета программного обеспечения STATISTICA V 8.0 (StatSoft, Inc).

#### Результаты

Сравнение физиологических характеристик, таких как масса тела и АД (табл. 1), показало, что у самцов НИСАГ масса тела в возрасте 2 мес. при содержании в SPF условиях достоверно выше, чем при содержании в конвенциональном виварии ( $p < 0,05$ ). В то же время на такую характеристику, как АД, условия содержания не повлияли.

В табл. 2 приведены результаты тестирования поведения в тесте ПКЛ крыс линии НИСАГ, выращенных в условиях конвенционального и SPF-вивариев. Основные различия животных SPF-статуса (как группы рожденных после естественного спаривания, так и группы, полученной после применения репродуктивных технологий) заключались в уменьшении времени груминга ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ). Следует особо обратить внимание, что при этом число актов груминга оставалось примерно одинаковым. У животных обеих групп, полученных в SPF-виварии, были также достоверно снижены показатели дефекации

**Таблица 2.** Поведение в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» крыс исследуемых групп

Параметр	Группа крыс НИСАГ (самцы)		
	конвенциональные (n = 5)	SPF (n = 10)	<i>in vitro</i> (n = 7)
Общее число заходов в рукава	6,8±2,0	6,7±0,8	6,7±0,5
Заходы в открытые рукава, %	38,7±12,2	39,3±1,4	47,2±3,3
Время, проведенное в открытых рукавах, %	17,2±6,4	17,5±3,4	43,4±8,6 <sup>*</sup>
Число вертикальных стоек (rearing)	11,4±1,6	15,9±1,8	9,7±1,3
Время в стойках (rearing), с	23,0±2,9	31,0±3,6	20,8±3,8
Число актов груминга	3,2±0,8	2,8±0,3	1,8±0,4
Общее время груминга, с	61,2±12,0 <sup>*,**</sup>	24,1±3,8	23,1±7,3
Число актов дефекации	5,4±0,9 <sup>##</sup>	0	0,4±0,3
Число актов урикации	12,2±2,8 <sup>##</sup>	2,0±0,4	3,6±0,4

<sup>\*</sup>  $p < 0,05$  по сравнению с НИСАГ SPF. <sup>\*</sup>  $p < 0,05$  по сравнению с НИСАГ *in vitro*. <sup>\*\*</sup>  $p < 0,01$  по сравнению с НИСАГ SPF. <sup>##</sup>  $p < 0,01$  по сравнению с НИСАГ SPF и НИСАГ *in vitro*. НИСАГ – линия крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией. SPF (specified pathogen free) означает отсутствие видоспецифичных патогенных микроорганизмов.

( $p < 0,01$ ) и урикации ( $p < 0,01$ ). Таким образом, по этим трем важным показателям теста ПКЛ крысы НИСАГ обеих групп, рожденные в условиях SPF-вивария, отличались от конвенциональных животных в сходном направлении.

Однако по такому ключевому для данного теста показателю, как время, проведенное в открытых рукавах лабиринта, крысы из группы, полученной посредством ВРТ (НИСАГ *in vitro*), отличались от крыс НИСАГ SPF-статуса. Крысы именно этой группы проводили в открытых рукавах более чем в два раза больше времени ( $p < 0,05$ ) по сравнению с крысами, рожденными естественным путем в SPF-виварии (табл. 2).

### Обсуждение

В данном исследовании были обнаружены различия некоторых форм поведения при сравнении крыс НИСАГ SPF-статуса и животных этой же линии конвенционального статуса, в частности это касалось различий в длительности груминга, а также показателей дефекации и урикации. Результаты исследования поведения крыс НИСАГ в тесте ПКЛ показывают, что у конвенциональных животных процент времени груминга был повышен, при этом число актов груминга оставалось примерно одинаковым, что позволяет предположить, что крысы из конвенционального вивария гораздо чаще демонстрируют так называемый «длительный» груминг (т. е. умывание не только головы и лап, но и всего туловища). «Длительный» груминг в отличие от «кратковременного» не является стрессорным поведением для грызунов, а служит именно для очистки тела (Калуев, 2006). Повышение процента времени именно «длительного» груминга у крыс конвенционального вивария вполне объясняется наличием у них патогенной микрофлоры.

Повышение числа актов дефекации и урикации у конвенциональных животных позволяет говорить о более высокой эмоциональности данной группы. Уровень дефекации напрямую отображает соотношение процессов возбуждения и торможения в вегетативной нервной

системе (Маркель, 1981). Ранее в исследовании на мышах было показано, что наличие патогенов само по себе может влиять на некоторые виды поведения, характеризующие состояние тревожности (Lyte et al., 2006). Можно предположить, что присутствие патогенного окружения делает конвенциональных животных более эмоциональными, что отражается в более высоких показателях дефекации и урикации в этой экспериментальной группе. С другой стороны, известно, что структура эпителия кишечника отличается у крыс, выращенных в условиях конвенционального вивария и полностью свободных от всех патогенов (germ-free) (Abrams et al., 1963). Кроме того, было показано, что животные SPF-статуса также имеют различия в структуре кишечника, а именно: меньшую длину ворсин и менее глубокие крипты по сравнению с конвенциональными (Clarke, 1975). Таким образом, придание SPF-статуса может изменять функциональные характеристики кишечного тракта (Sharma et al., 1995), и именно это обстоятельство может быть причиной уменьшения показателей дефекации у животных двух групп НИСАГ, рожденных в условиях SPF-вивария, по сравнению с конвенциональными животными.

Масса тела крыс из SPF-вивария была достоверно повышена по сравнению с конвенциональными – это связано, скорее всего, с различиями в диете. Более того, известно, что SPF-животные набирают вес быстрее, чем конвенциональные (Clarke, 1975). Артериальное давление животных этих двух групп не отличалось, хотя имела место небольшая тенденция к уменьшению показателей АД у животных SPF-статуса. Можно было бы предположить, что животные из конвенционального вивария испытывают больший стресс в условиях наличия патогенной микрофлоры, чем животные SPF-вивария, и это может влиять на выраженность гипертензии у стресс-сенситивной линии гипертензивных крыс НИСАГ. Действительно, в исследованиях на мышах было показано, что наличие патогенной микрофлоры меняет некоторые виды стресс-реактивности (Gareau et al., 2011). Тем не менее достоверных различий по показателям артериального давления

мы не обнаружили ни в одной из исследованных групп. Артериальное давление у крыс линии НИСАГ является генетически обусловленной, полигенной характеристикой, которая при высокой генетической предрасположенности развивается практически при любых внешних условиях (Амстиславский, 2006).

Животные из группы НИСАГ *in vitro* в тесте ПКЛ демонстрировали более низкий уровень тревожности (больше времени проводили в открытых рукавах) в сравнении с группой из SPF-вивария; по другим параметрам животные этой группы не отличались от крыс SPF-статуса, рожденных естественным путем. Феномен снижения тревожности у животных после культивирования и трансплантации уже наблюдался в экспериментах на мышах (Ecker et al., 2004). Отметим, что такой же эффект в тесте ПКЛ был замечен у крыс с повреждением структуры гиппокампа (Kjelstrup et al., 2002), что позволяет предположить, что процедура культивирования каким-то образом нарушает нормальное функционирование гиппокампа.

В данной работе не обнаружены изменения величины артериального давления в зависимости от патогенного фона и применения ВРТ, но выявлены изменения в поведении на крысах линии НИСАГ с гипертонией при разных условиях содержания (конвенциональные и SPF). Впервые было исследовано поведение потомков крыс линии НИСАГ после процедур ВРТ (культивирования и трансплантации) и показано снижение тревожности по результатам тестирования в приподнятом крестообразном лабиринте.

### Благодарности

Задачи проведенного исследования сформулированы в рамках бюджетного проекта № VI.53.2.1.

Работа выполнена на базе вивариев ИЦиГ СО РАН при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Соглашение № 14.621.21.0010 о предоставлении субсидии от 04.12.2014 г. (RFMEFI62114X0010) и Соглашение о предоставлении субсидии № 14.619.21.0005 от 22.08.2014 г. (RFMEFI61914X0005)), а также гранта РФФИ № 13-04-00685.

Авторы выражают благодарность заведующему ЦКП «Виварий конвенциональных животных» к.в.н. В.А. Напримерову.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

Амстиславский С.Я. Эмбриотехнологические подходы к сохранению исчезающих видов млекопитающих: Дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск, 2006.  
Амстиславский С.Я., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Роговая А.А., Рагаева Д.С., Напримеров В.А., Литвинова Е.А., Плюснина И.Ф., Маркель А.Л. Редеривация путем трансплан-

тации эмбрионов линий лабораторных мышей и крыс. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013;17(1):147-161.  
Калуев А.В. Анализ грумिंगа в нейробиологических исследованиях: нейрогенетика, нейрофармакология и экспериментальные модели стресса. Нейронауки. 2006;4(6):14-19.  
Маркель А.Л. К оценке основных характеристик поведения крыс в тесте открытого поля. Журн. высш. нервн. деятельности. 1981;31(2):301-307.  
Рагаева Д.С., Брусенцев Е.Ю., Амстиславский С.Я. Вспомогательные репродуктивные технологии и артериальная гипертензия. Онтогенез. 2014;45(5):299-313.  
Abrams G.D., Bauer H., Sprinz H. Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice. Lab Invest. 1963;12:355-364.  
Amstislavsky S., Brusentsev E., Kizilova E., Igonina T., Abramova T., Rozhkova I. Embryo cryopreservation and *in vitro* culture of preimplantation embryos in Campbell's hamster (*Phodopus campbelli*). Theriogenology. 2015;82:1056-1063. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.12.013  
Clarke R.M. Diet, mucosal architecture and epithelial cell production in the small intestine of specified-pathogen-free and conventional rats. Laboratory Animals. 1975;9:201-209. DOI: 10.1258/002367775780994600  
Ecker D.J., Stein P., Xu Z., Williams C.J., Kopf G.S., Bilker W.B., Abel T., Schultz R.M. Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004;101(6):1595-1600. DOI: 10.1073/pnas.0306846101  
Emiliani S., Van den Bergh M., Vannin A.S., Biramanel J., Englert Y. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. Hum. Reprod. 2000;4:905-910. DOI: 10.1093/humrep/15.4.905  
Festing M.F.W., Baumans V., Combes R.D., Halder M., Hendriksen C.F., Howard B.R., Wilson M.S. Reducing the use of laboratory animals in biomedical research: problems and possible solutions. ATLA-NOTTINGHAM. 1998;26:283-302.  
Gareau M.G., Wine E., Rodrigues D.M., Cho J.H., Whary M.T., Philpott D.J., Macqueen G., Sherman P.M. Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. Gut. 2011;60(3):307-317. DOI: 10.1136/gut.2009.202515  
Kjelstrup K.G., Tuvnes F.A., Steffenach H.A., Murison R., Moser E.I., Moser M.B. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002;99:10825-10830. DOI: 10.1073/pnas.152112399  
Lyte M., Li W., Opitz N., Gaykema R.P., Goehler L.E. Induction of anxiety-like behavior in mice during the initial stages of infection with the agent of murine colonic hyperplasia *Citrobacter rodentium*. Physiol. Behav. 2006;89(3):350-357. DOI: 10.1016/j.physbeh.2006.06.019  
Rodgers R.J., Cole J.C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. Ethol. Psychopharmacol. 1994.  
Sharma R., Schumacher U., Ronaasen V., Coates M. Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. Gut. 1995;36(2):209-214.  
Tanaka A., Matsuda H. Expression of nerve growth factor in itchy skins of atopic NC/NgaTnd mice. J. Vet. Med. Sci. 2005;67(9):915-919. DOI: 10.1292/jvms.67.915  
Van Soom A., Wrathall A.E., Herrler A., Nauwynck H.J. Is the zona pellucida an efficient barrier to viral infection? Reprod. Fert. Dev. 2010;22:21-31. DOI: 10.1071/RD09230