Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):145-154
DOI 10.18699/VJ16.144

Влияние неонатального хэндлинга на поведение и стресс-ответ у крыс, селекционируемых по реакции на человека

Ю.Э. Гербек[1] ✉, О.А. Амелькина[1, 2, 3], М.Ю. Коношенко[1], С.Г. Шихевич[1], Р.Г. Гулевич[1], Р.В. Кожемякина[1], И.З. Плюснина[1], И.Н. Оськина[1]

[1] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия
[3] Институт исследования животных в зоопарках и в природе Общества им. Лейбница, Отдел репродуктивной биологии, Берлин, Германия

Известно, что неонатальный хэндлинг может приводить к устойчивым изменениям нейробиологического и поведенческого фенотипов. Под влиянием неонатального хэндлинга у крыс, селекционированных на усиление агрессивно-оборонительной реакции по отношению к человеку («агрессивные», 44-е поколение), происходило значительное ослабление агрессии, сопровождаемое снижением стресс-реактивности. Однако и у интактных агрессивных крыс последних поколений (70-е) отмечали более низкий стрессорный уровень кортикостерона относительно 44-го поколения, который не так существенно отличался от соответствующего уровня гормона у «ручных» крыс, селекционируемых в противоположном направлении – на отсутствие агрессии к человеку. Исследование проводили на серых крысах 75-го поколения отбора на агрессивное поведение и для сравнения – на ручное. Целью данной работы было выяснить, сопровождается ли снижение стресс-реактивности у агрессивных крыс на современном этапе селекции ослаблением эффекта хэндлинга на агрессивность. Под влиянием неонатального хэндлинга у агрессивных животных обнаружено достоверное, но существенно меньшее, чем у крыс 44-го поколения, снижение агрессивности. При этом как у агрессивных, так и ручных крыс стрессорный уровень кортикостерона в крови возвращался к базальному уровню в течение более длительного времени, чем у соответствующих контрольных животных. Неонатальный хэндлинг вызывал понижение количества мРНК рецептора глюкокортикоидов (ГР) в гиппокампе агрессивных крыс, но достоверно не влиял на количество мРНК кортикотропин-рилизинг (КРГ) гормона в гипоталамусе. Однако в контроле отмечали более высокое содержание мРНК КРГ у агрессивных крыс относительно ручных и, наоборот, не обнаружили различий в количестве мРНК ГР между линиями в отличие от более ранних поколений. Показано, что хэндлинг детенышей положительно влиял на материнское поведение у ручных крыс. Таким образом, результаты, полученные в 75-м поколении отбора, свидетельствуют о том, что эффект хэндлинга на агрессивность ослабевает на фоне понижения стресс-реактивности у агрессивных крыс. Вероятно, это связано с изменением количества ГР в гиппокампе и усилением глюкокортикоидной обратной связи на современном этапе отбора. Небольшое увеличение продолжительности стресс-ответа, по-видимому, связано со стрессогенной составляющей неонатального хэндлинга и не связано с изменением материнской заботы.

Ключевые слова: неонатальный хэндлинг; агрессия; агрессивные крысы; ручные крысы; материнское поведение; отбор по поведению.

УДК 577.21:159,929
Поступила в редакцию 10.10.2015 г.
Принята к публикации 20.11.2015 г.

✉ e-mail: herbek@bionet.nsc.ru

Effects of neonatal handling on behavior and stress-response in rats selected for reaction towards humans

Yu.E. Herbeck[1] ✉, O.A. Amelkina[1, 2, 3], M.Yu. Konoshenko[1], S.G. Shikhevich[1], R.G. Gulevich[1], R.V. Kozhemyakina[1], I.Z. Plyusnina[1], I.N. Oskina[1]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
[3] Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research, Department of Reproduction Biology

It is known that neonatal handling may cause long-term changes in neurobiological and behavioral phenotypes. Neonatal handling of rats selected for enhanced aggressiveness towards humans ("aggressive" rats of generation 44) significantly mitigated aggression and stress responsiveness. However, levels of corticosterone in stress in intact aggressive rats of later generations (70s) were lower than in generation 44, which differed little from the corresponding value in "tame" rats, selected in the opposite direction, for the absence of aggressiveness towards humans. The study was conducted with Norway rat populations of the 75th generation of selection for aggressive and tame behavior, respectively. The goal was to find out whether the decrease in stress response in aggressive rats at the current stage of selection was accompanied by a decrease in the influence of handling on aggressiveness. It was found that neonatal handling of aggressive animals caused a significant decrease in aggressiveness, although considerably smaller than in generation 44. In both aggressive and tame rats, the blood corticosterone level at stress was getting back to the basal level for a longer time than in the corresponding control groups. Neonatal handling decreased the amount of mRNA for the glucocorticoid receptor (GR) in the hippocampus of aggressive rats but did not affect significantly the amount of mRNA for the corticotropin-releasing hormone (CRH) in the hypothalamus. However, higher contents of CRH mRNA were recorded in aggressive rats than in tame ones in the control groups. However, no differences in glucocorticoid receptor mRNA were found between the strains in contrast to earlier generations. It was shown that neonatal handling was beneficial for maternal behavior in tame rats. Thus, the results obtained in the 75th generation of selection indicate that the effect of handling on aggressiveness weakens with decreasing stress responsiveness in aggressive rats. This is likely to be related to the changing amount of GR in the hippocampus and stronger glucocorticoid-mediated feedback at the current stage of selection. The minor prolongation of the stress response appears to be related to the stressing component of neonatal handling rather than to changes in maternal care.

Keywords: neonatal handling; aggression; maternal behavior; aggressive rats; tame rats; selection for behavior.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Гербек Ю.Э., Амелькина О.А., Коношенко М.Ю., Шихевич С.Г., Гулевич Р.Г., Кожемякина Р.В., Плюснина И.З., Оськина И.Н. Влияние неонатального хэндлинга на поведение и стресс-ответ у крыс, селекционируемых по реакции на человека. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):145-154. DOI 10.18699/VJ16.144

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Herbeck Yu.E., Amelkina O.A., Konoshenko M.Yu., Shikhevich S.G., Gulevich R.G., Kozhemyakina R.V., Plyusnina I.Z., Oskina I.N. Effects of neonatal handling on behavior and stress-response in rats selected for reaction towards humans. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):145-154. DOI 10.18699/VJ16.144

Внешние воздействия на ранних стадиях развития организма приводят к устойчивым изменениям поведенческих и гормональных ответов на широкий круг стрессорных агентов. Феномен ранних воздействий широко изучался еще в 60–70-х годах XX века (Levine, 1967). Однако в связи с высокой фундаментальной значимостью этого явления и из-за его существенного влияния на телесное и психическое здоровье человека количество исследований по данной тематике продолжает расти (Bagot, Meaney, 2010; Tang et al., 2014; Bale, 2015). Известно, что стресс, алкоголь, курение и другие факторы как на самых ранних, так и на поздних этапах беременности повышают риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, метаболических нарушений, психических расстройств, таких как шизофрения (Zhang et al., 2013; Bale, 2015). Чувствительными являются также ранний постнатальный и адолесцентный периоды. На этих этапах развития различные влияния среды могут вызывать устойчивые положительные или отрицательные изменения в организме (McEwen, 2000; Gonzalez-Liencres et al., 2013; Zhang et al., 2013).

Среди ранних воздействий широко исследованы яркие эффекты неонатального хэндлинга, который, как принято считать, обогащает раннюю социальную среду развивающегося организма. Они касаются поведения, гормонального стресс-ответа и связанной с ним тревожности и исследованы у разных животных (Levine, 1967; Liu et al., 1997; Kosten et al., 2006). Во многих исследованиях показано, что неонатальный хэндлинг снижает стресс-ответ, тревожность, эмоциональную реактивность у животных во взрослом состоянии (Levine, 1967; Liu et al., 1997). Молекулярным механизмом снижения глюкокортикоидного стресс-ответа в первую очередь считаются повышение количества рецептора глюкокортикоидов (ГР, NR3C1) в гиппокампе и снижение количества кортикотропин-рилизинг гормона (КРГ, CRH) в гипоталамусе (Liu et al., 1997).

Эффекты хэндлинга схожи с изменениями, наблюдаемыми у отловленных из природы крыс, после длительной селекции на отсутствие агрессивно-оборонительной реакции на человека («ручные» крысы) (Plyusnina, Oskina, 1997; Plyusnina et al., 2009; Гербек и др., 2010; Herbeck et al., 2010). То есть у этих животных одновременно со снижением стресс-ответа происходило и снижение агрессии по отношению к человеку. И. Оськина и И. Плюснина обнаружили, что неонатальный хэндлинг крыс, селекционируемых в противоположном направлении, на усиление агрессивно-оборонительной реакции по отношению к человеку («агрессивные», 44-е поколение), существенно снижает агрессию по отношению к человеку. Ранние воздействия также снижали стресс-ответ и повышали количество ГР в гиппокампе (Оськина, Плюснина, 1997). Необходимо также отметить, что эффекты неонатального хэндлинга отчасти обусловлены изменением материнского поведения после воздействия (Liu et al., 1997; Zhang et al., 2013). В то же время показано, что ручные и агрессивные крысы также различаются по материнскому поведению (Плюснина и др., 2013; Plyusnina et al., 2013).

Перечисленные результаты говорят в пользу того, что отбор по поведению у данных линий крыс являлся одновременно отбором на стресс-реактивность (Беляев, Бородин, 1982), а также могут указывать на схожесть некоторых механизмов, лежащих в основе эффектов хэндлинга и отбора на ручное поведение. Однако у ручных и агрессивных крыс современных (70-х) поколений отбора практически полностью отсутствуют различия в уровне глюкокортикоидного стресс-ответа в основном за счет снижения уровня стресс-индуцированной концентрации глюкокортикоидов в крови агрессивных крыс. В то же время ручное и агрессивное поведение по отношению к человеку у животных этих линий остается на прежнем уровне (Прасолова и др., 2014). Действительно, связь стресса и агрессии не является очевидной и у разных линий животных может выступать в различных сочетаниях (Gariépy et al., 2002; Veenema et al., 2007). Хэндлинг у ряда линий животных также не вызывает каких-либо изменений в стресс-ответе (Liu et al., 1997; Steimer et al., 1998; Gariépy et al., 2002), а на агрессию производит усиливающий эффект (Gariépy et al., 2002; Todeschin et al., 2009). Так, у мышей линий NC100 (высокоагрессивные) и NC900 (низкоагрессивные) ранние воздействия приводят к повышению уровня межсамцовой агрессии, однако снижение кортикостерона обнаружено только у высокоагрессивной линии. При этом базальный и стресс-индуцированный уровни этого гормона у обеих линий не различались (Gariépy et al., 2002).

Таким образом, в данной работе поставлена цель выяснить, сохраняются ли эффекты неонатального хэндлинга, наблюдаемые на 44-м поколении селекции по реакции на человека, у агрессивных крыс 75-го поколения и влияет ли снижение стресс-ответа на современном этапе селекции на эти эффекты. Для достижения поставленной цели у взрослых ручных и агрессивных крыс, подвергнутых неонатальному хэндлингу, и контрольных животных исследовали поведение по отношению к человеку и показатели, связанные со стресс-ответом и изменяющиеся под действием факторов ранней среды. В их число вошли тревожность, концентрация кортикостерона и адренокортикотропного гормона (АКТГ) в плазме крови, мРНК КРГ в гипоталамусе и ГР в гиппокампе. Кроме того, исследовано материнское поведение крыс, пометы которых участвовали в эксперименте, как возможный фактор, влияющий на эффекты неонатального хэндлинга.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

Эксперименты проводили в соответствии с международными европейскими биоэтическими стандартами (86/609-ЕЕС) и российскими этическими стандартами по содержанию и обращению с лабораторными животными.

Работу проводили на двух аутбредных линиях серых крыс (*Rattus norvegicus*), полученных в ИЦиГ СО РАН путем длительной селекции на усиление («агрессивные») и отсутствие («ручные») агрессивно-оборонительного поведения по отношению к человеку (75-е поколение) (Plyusnina, Oskina, 1997). В опыт было взято по 16 ручных и агрессивных самок с первыми пометами по 6–8 детенышей. Крыс содержали на стандартном питании в условиях естественного светового дня при свободном доступе к воде и пище. Из самок с пометами были сформированы четыре группы: первые две группы подвергали неонатальному хэндлингу; третья (агрессивные) и четвертая (ручные) группы являлись контрольными.

Процедура неонатального хэндлинга и исследование поведения животных

В возрасте 4 мес. самок и самцов ссаживали попарно. На 20-й день самцов отсаживали, а самок рассаживали в клетки для изучения влияния хэндлинга на материнское поведение. Хэндлинг проводили ежедневно в одно и то же время первые 12 дней жизни крысят по методике, описанной ранее (Francis et al., 2002; Veenema, 2012). Мать отсаживали от помета в другую клетку, затем крысят по одному рукой в перчатке переносили в открытые пластмассовые контейнеры на опилки и оставляли на 15 мин, после чего детенышей, а затем и мать возвращали в клетку. Животных из контрольной группы содержали в это время вместе с матерями и не подвергали никаким манипуляциям.

Автоматическую видеорегистрацию поведения самок проводили со 2-го по 12-й дни кормления крысят через каждые 3 мин в течение часа, пять раз в сутки согласно протоколу, описанному ранее (Плюснина и др., 2013; Plyusnina et al., 2013). Суммарное число наблюдений составляло 100 в сутки для каждой самки. Регистрировали следующие показатели материнского поведения: нахождение самки в гнезде (доля от суммарного времени наблюдения, %), кормление крысят и его типы, вылизывание и умывание крысят. Различали три типа кормления: «аркообразный» – спина самки выгнута дугой, самка стоит на вытянутых лапах; «платообразный» – самка практически лежит на крысятах, вытянув лапы; пассивный – самка лежит на боку или на спине. Оценивали частоту (%) проявления типов кормления от суммарного времени нахождения самки в гнезде.

В возрасте 1 мес. крысят отсаживали от матерей. В возрасте 2 мес. у всех самцов оценивали поведение по отношению к человеку при введении руки в перчатке в открытую дверцу клетки (тест на перчатку) по балльной шкале: от –4 (высокоагрессивное) до +4 (эмоционально положительное). Отрицательные значения указывают на наличие оборонительной агрессии по отношению к человеку, а положительные – на ее отсутствие. Подробно методика теста изложена в статьях (Plyusnina, Oskina, 1997; Plyusnina et al., 2009). В этом же возрасте животных рассаживали по половому признаку и содержали по четыре особи в клетке.

Через неделю по 12 самцов из каждой группы использовали для изучения эффектов хэндлинга на поведение крыс в тесте «светло-темная камера» и еще через неделю – в стартл-тесте. Тревожность крыс оценивали в тестах согласно стандартным протоколам (Konoshenko, Plyusnina, 2012). Крысу помещали в светло-темную камеру. Темная часть была сделана из непрозрачного винипласта, а светлую часть камеры, сделанную из прозрачного оргстекла, дополнительно освещали. Крысу помещали в светлый отсек камеры и в течение 5 мин производили видеонаблюдение. Оценивали латентный период захода в темную часть камеры и суммарное время, проведенное в ней, число заходов в темный отсек, выглядываний из него, вытянутых поз (задняя часть туловища крысы находится в темном отсеке, а передняя – в светлом), заглядываний из светлой части камеры в темную, вертикальных стоек и аутогруминга в светлой части камеры, время горизонтальной локомоции и застываний в светлой части камеры.

Стартл-тест проводили с помощью аппарата для измерения амплитуды реакции вздрагивания (TSE Equipment), представляющего собой звуконепроницаемый бокс с чувствительной платформой, на которую помещали рестрикционную клетку. Длительность адаптационного периода составляла 3 мин (белый шум, 65 дБ). Затем проводили измерение базальной активности (30 с), за которым следовали 10 звуковых стимулов (белый шум: 40 мс, 115 дБ). Длительность интервалов между стимулами – 15 с (белый шум, 65 дБ). Активность животных измеряли в течение 150 мс от начала стимула. Амплитуду реакции вздрагивания вычисляли как максимальное давление на платформу, деленное на вес тела. Дополнительно вычисляли среднюю амплитуду вздрагивания для первых и вторых пяти акустических стимулов.

В возрасте 3 мес. по пять самцов каждой опытной группы подвергали быстрой декапитации (< 1 мин), после чего извлекали головной мозг, из которого брали образцы гиппокампа и гипоталамуса.

Исследование влияния неонатального хэндлинга на стресс-реактивность у ручных и агрессивных крыс

Рестрикционный стресс вызывали ограничением возможности передвижения, для чего трехмесячных самцов крыс помещали на 30 мин в сетчатые трубки диаметром 5 см. После всех манипуляций животных возвращали в клетки. Пробы крови брали до стресса, после его окончания, а также через 1, 2 и 4 ч после стресса. Измерение уровня кортикостерона в плазме крови крыс, подвергавшихся и неподвергавшихся неонатальному хэндлингу, проводили методом конкурентного белкового связывания (Murphy, 1967) в модификации Тинникова и Бажан (1984). Содержание адренокортикотропина (АКТГ) в плазме крови опытных и контрольных самцов крыс измеряли иммуноферментным методом с помощью ACTH ELISA Kit (Biomerica, США) согласно инструкции производителя.

Анализ количества мРНК рецептора глюкокортикоидов в гиппокампе и кортикотропин-рилизинг гормона в гипоталамусе крыс

Для анализа количества мРНК в образцах мозга использовали метод ПЦР в реальном времени, совмещенной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Выделение суммарной РНК из образцов гиппокампа и гипоталамуса (по пять крыс в каждой группе) проводили с использованием набора TRI Reagent (MRC, США), после чего удаляли примеси геномной ДНК с помощью дезоксирибонуклеазы I без РНКаз (Thermo Fisher Scientific). Процедуры выполняли согласно протоколам фирм-изготовителей. Синтез кДНК проводили, используя обратную транскриптазу ReverdAid (Thermo Fisher Scientific), при концентрации РНК 0,05 мкг/мкл согласно протоколу производителя транскриптазы. Для анализа экспрессии гена КРГ кДНК синтезировали при помощи праймеров polyT(15), а для оценки экспрессии гена ГР – используя специфические праймеры к мРНК ГР (5′-GCTGGATGGAGGAGAGCTTA-3′) и мРНК циклофилина А (5′-CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC-3′; Peinnequin et al., 2004). Все праймеры синтезированы фирмой Biosset, Россия. ПЦР в реальном времени проводили на приборе ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, США). Реакционная смесь объемом 25 мкл включала: смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green и ROX (Синтол, Россия), 0,25 мкл продукта ОТ-реакции и праймеры для кДНК ГР (F: 5′-AGGGGAGGGGGAGC GTAATGG-3′; R: 5′-CCTCTGCTGCTTGGAATCTGC-3′), КРГ (F: 5′-AAAATGTGGATCCAAGGAGGA-3′; R: 5′-TAGCCACCCCTCAAGAATGAA-3′) или циклофилина А (F: 5′-GTGTTCTTCGACATCACGGCT-3′; R: 5′-CTGTCTTTGGAACTTTGTCTGCA-3′) (Marini et al., 2006). Каждую реакцию проводили в трех технических повторах. Специфичность продукта оценивали путем анализа кривой плавления и электрофоретического разделения продукта в агарозном геле. С помощью программы REST 2009 (QIAGEN) определяли относительную экспрессию генов ГР и КРГ в разных группах, анализируя данные порогового цикла для каждого гена, нормализованные по пороговому циклу внутреннего контроля циклофилина А, и проводили попарные сравнения между группами. При этом учитывали эффективность реакции для каждой пары праймеров, рассчитанную с помощью серии разведений.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных по материнскому поведению, в тесте «на перчатку», в тесте «светло-темная камера» проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа, при котором в качестве факторов были генотип и процедура хэндлинга, с последующим сравнением групповых средних по критерию Fisher LSD. Средние значения амплитуды реакции вздрагивания в стартл-тесте для первых и вторых пяти стимулов, а также динамики стрессорных уровней кортикостерона и АКТГ были обработаны с помощью анализа ANOVA для повторных измерений (с генотипом и процедурой хэндлинга в качестве факторов), с последующим сравнением групповых средних по критерию Fisher LSD. Результаты на графиках представлены в виде значений среднего ± ошибка среднего. Статистическую достоверность различий между группами по результатам ПЦР оценивали с помощью рандомизированного критерия с двухточечным перераспределением с использованием программы REST 2009 (QIAGEN).

Результаты

Исследование поведения матерей, потомков которых подвергали неонатальному хэндлингу

В настоящей работе исследовали материнское поведение при хэндлинге и в контрольных группах у линий ручных и агрессивных крыс. Нахождение самки в гнезде, «аркообразный» тип кормления и взаимодействие матери с потомством (вылизывание) рассматриваются как индекс активной материнской заботы (Liu et al., 1997). «Аркообразный» тип кормления является самым эффективным, а пассивный – наименее эффективным для продукции молока и обеспечения наиболее высокой жизнеспособности крысят.

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа показали достоверное влияние фактора генотипа на частоту нахождения в гнезде ($F_{1,2017} = 18{,}06$; $p < 0{,}001$), суммарную частоту кормления ($F_{1,2017} = 6{,}11$; $p = 0{,}01$), частоту аркообразного ($F_{1,1757} = 26{,}03$; $p < 0{,}001$) и пассивного ($F_{1,1757} = 33{,}99$; $p < 0{,}001$) типов кормления, а также процент груминга и вылизывания крысят ($F_{1,2017} = 4{,}94$; $p < 0{,}05$). Было выявлено также достоверное влияние фактора хэндлинга на частоту нахождения самки в гнезде ($F_{1,2017} = 4{,}01$; $p < 0{,}05$), частоту платообразного ($F_{1,1757} = 12{,}96$; $p < 0{,}001$) и пассивного ($F_{1,1757} = 9{,}02$; $p < 0{,}01$) типов кормления. Было продемонстрировано взаимодействие факторов генотипа и хэндлинга для частоты нахождения в гнезде ($F_{1,2017} = 13{,}89$; $p < 0{,}001$), суммарной частоты кормления ($F_{1,2017} = 4{,}49$; $p < 0{,}05$), частоты аркообразного ($F_{1,1757} = 12{,}13$; $p < 0{,}001$) и пассивного ($F_{1,1757} = 18{,}95$; $p < 0{,}001$) типов кормления.

Частота нахождения в гнезде была достоверно меньше у ручных самок по сравнению с агрессивными, при этом процедура хэндлинга вызывала увеличение данного показателя у ручных крыс до уровня агрессивных (рис. 1). Частота кормления самкой детенышей была достоверно меньше у контрольной группы ручных крыс по сравнению с контрольными агрессивными животными. Не было обнаружено достоверного изменения данного параметра под воздействием хэндлинга у самок обоих генотипов. Частота аркообразного типа кормления была достоверно меньше у ручных самок по сравнению с агрессивными в контрольных группах (рис. 2). При этом хэндлинг вызвал достоверное уменьшение частоты аркообразного кормления у агрессивных самок и увеличение данного показателя у ручных. Частота платообразного типа кормления не различалась у крыс разных генотипов (рис. 2). В то же время хэндлинг вызвал достоверное увеличение частоты платообразного типа кормления у самок крыс обоих генотипов. Частота пассивного типа кормления была достоверно больше у ручных самок по сравнению с агрессивными, при этом процедура хэндлинга вызывала снижение данного показателя у ручных крыс до уровня агрессивных (рис. 2).

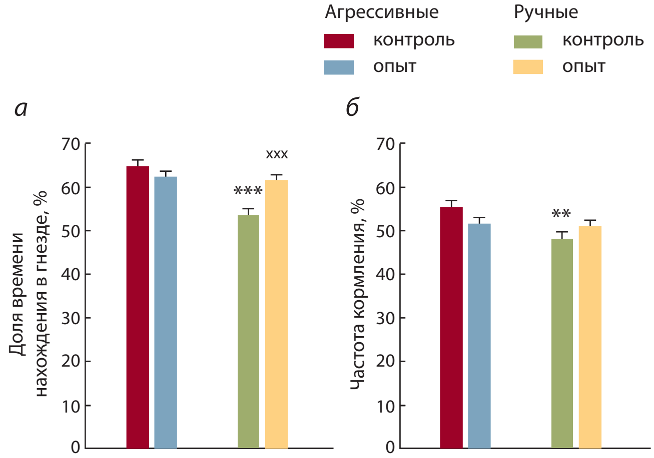

Рис. 1. Влияние хэндлинга детенышей на показатели материнского поведения: частоту нахождения в гнезде (*а*) и частоту кормления (*б*) у самок агрессивных и ручных крыс.

Опыт – самки, чьи детеныши подвергались неонатальному хэндлингу, контроль – группы самок без каких-либо воздействий. $^{**}p < 0{,}01$; $^{***}p < 0{,}001$ по сравнению с агрессивной контрольной группой; $^{xxx}p < 0{,}001$ у опытной группы по сравнению с контрольной этого же генотипа.

Исследование влияния ранних воздействий на поведение во взрослом состоянии у ручных и агрессивных крыс

Тест «на перчатку». Оборонительная агрессия была ярко выражена у агрессивных крыс контрольной группы и полностью отсутствовала у ручных животных, что соответствует более ранним исследованиям (Оськина, Плюснина, 1997; Plyusnina, Oskina, 1997). Двухфакторный дисперсионный анализ выявил достоверное влияние факторов генотипа ($F_{1,93} = 61{,}49$; $p < 0{,}001$), хэндлинга ($F_{1,93} = 6{,}34$; $p < 0{,}05$), а также взаимодействие данных факторов ($F_{1,93} = 5{,}70$; $p < 0{,}05$) на балльную оценку поведения крыс в тесте «на перчатку». Балльная оценка поведения агрессивных крыс была отрицательной (–3,05 ± 0,07) (рис. 3) и достоверно отличалась от положительной балльной оценки ручных крыс (+3,45 ± 0,05; $p < 0{,}001$). Процедура хэндлинга вызвала достоверное изменение балльной оценки агрессивных самцов (–2,66 ± 0,09; $p < 0{,}001$), но не повлияла на поведение ручных крыс в данном тесте (+3,31 ± 0,00; $p > 0{,}05$) (рис. 3).

Стартл-тест. На рис. 4 изображены амплитуды вздрагивания ручных и агрессивных самцов крыс в ответ на предъявление первых и вторых пяти акустических стимулов. Двухфакторный дисперсионный анализ данных для повторных измерений показал достоверное влияние фактора номера акустического стимула ($F_{1,44} = 79{,}05$; $p < 0{,}001$), а также фактора генотипа ($F_{1,44} = 8{,}80$; $p < 0{,}001$) на амплитуду реакции вздрагивания. Кроме того, было продемонстрировано взаимодействие факторов хэндлинга и номера стимула ($F_{1,44} = 10{,}38$; $p < 0{,}01$), а также факторов хэндлинга, номера стимула и генотипа ($F_{1,44} = 4{,}84$; $p < 0{,}01$).

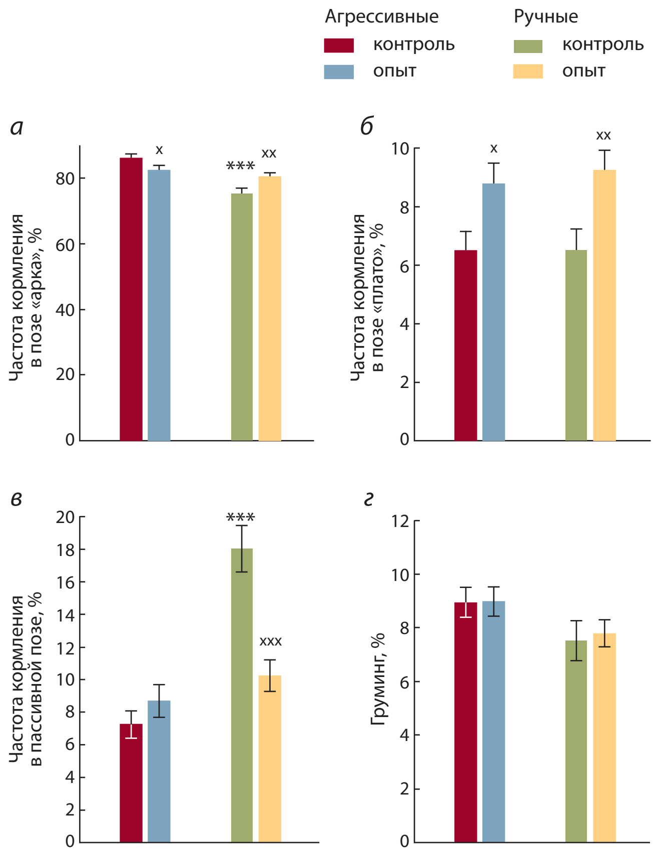

Рис. 2. Влияние хэндлинга детенышей на частоту различных типов кормления: аркообразного (*а*), платообразного (*б*), пассивного (*в*), а также груминга и вылизывания крысят (*г*) (доля от суммарного времени нахождения самок в гнезде, %) у агрессивных и ручных крыс.

$^{***}p < 0{,}001$ по сравнению с агрессивной контрольной группой; $^{x}p < 0{,}05$; $^{xx}p < 0{,}01$; $^{xxx}p < 0{,}001$ у опытной группы по сравнению с контрольной этого же генотипа.

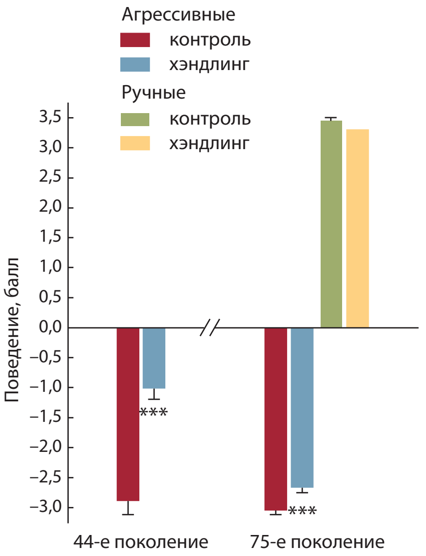

Рис. 3. Влияние неонатального хэндлинга на поведение зрелых агрессивных и ручных крыс.

Здесь, в рис. 4–7 и таблице: опытные – взрослые самцы крыс после неонатального хэндлинга; контрольные – не подвергавшиеся неонатальному хэндлингу. $^{***}p < 0{,}001$ по сравнению с контрольной группой соответствующего типа поведения.

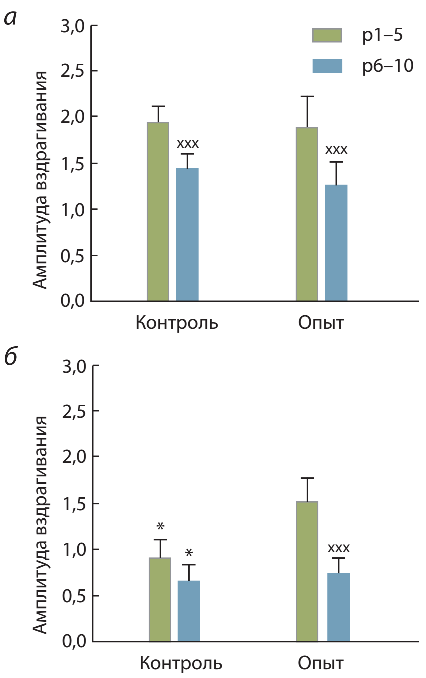

Рис. 4. Влияние неонатального хэндлинга на амплитуду вздрагивания в стартл-тесте в ответ на первые пять и последующие пять акустических стимулов у самцов агрессивных (*а*) и ручных (*б*) крыс.

p1–5 – реакция на первые пять стимулов; p6–10 – реакция на пять последующих стимулов; $^{*}p < 0{,}05$ по сравнению с агрессивной контрольной группой; $^{xxx}p < 0{,}001$ по сравнению с предыдущими пятью стимулами.

Средняя амплитуда вздрагивания в ответ на первые пять и последующие пять стимулов была достоверно меньше у ручных самцов контрольной группы по сравнению с агрессивными контрольными животными (рис. 4).

Достоверного изменения амплитуды вздрагивания под влиянием хэндлинга у агрессивных и ручных самцов обнаружено не было. Однако средняя амплитуда вздрагивания в ответ на первые пять стимулов была на уровне тенденции больше у опытной группы ручных крыс, чем у контрольной. Достоверных различий амплитуды вздрагивания между опытными группами крыс разного генотипа обнаружено не было.

Тест «светло-темная камера». Результаты дисперсионного анализа выявили достоверное влияние фактора генотипа на латентный период захода в темный отсек ($F_{1,44} = 5{,}87$; $p < 0{,}05$), время, проведенное в светлом отсеке ($F_{1,44} = 7{,}01$; $p < 0{,}01$), суммарное время застываний в светлом отсеке ($F_{1,44} = 9{,}41$; $p < 0{,}01$) и число высовываний носа из темного в светлый отсек ($F_{1,44} = 8{,}03$; $p < 0{,}01$). Достоверного влияния фактора генотипа на другие показатели поведения в данном тесте, в том числе и на время, проведенное в светлом отсеке после выхода из темного, обнаружено не было. Суммарное время застываний было достоверно больше у контрольных агрессивных самцов по сравнению с контрольными ручными животными (рис. 5). Латентный период захода в темный отсек и время, проведенное в светлом отсеке, были на грани достоверности больше у агрессивных самцов, чем у ручных в контрольных группах животных (рис. 5). Классически данные параметры рассматриваются как показатель низкой тревожности, однако у агрессивных самцов они связаны с застыванием в светлом отсеке, а значит, указывают на большую тревожность, тем более что число высовываний носа из темного в светлый отсек было на уровне тенденции меньше у агрессивных контрольных крыс, чем у ручных ($p = 0{,}07$) (рис. 5).

Достоверных изменений поведенческих параметров крыс обоих генотипов в тесте «светло-темная камера» под влиянием процедуры хэндлинга обнаружено не было.

Исследование влияния неонатального хэндлинга на стресс-реактивность у ручных и агрессивных крыс

Двухфакторный дисперсионный анализ показал достоверное влияние факторов генотипа ($F_{5,38} = 3{,}64$; $p < 0{,}01$) и хэндлинга ($F_{5,38} = 5{,}50$; $p < 0{,}001$) на динамику уровня кортикостерона. У обеих поведенческих групп как в контроле, так и опыте наблюдали достоверное повышение уровня кортикостерона в крови сразу и через час после окончания стрессорного воздействия по сравнению с базальным уровнем ($p < 0{,}001$) (рис. 6). Последующее сравнение групповых средних по критерию Fisher LSD показало достоверные различия между группами через 2 ч после окончания стресса. Концентрация кортикостерона в крови контрольных животных независимо от поведения уже возвращалась к базальным значениям, тогда как в экспериментальных группах это наблюдалось только через 4 ч. Уровень кортикостерона в плазме крови контрольных агрессивных животных был достоверно выше по сравнению с контрольными ручными через 2 и 4 ч после стресса ($p < 0{,}05$ и $p < 0{,}01$ соответственно) (рис. 6). В экспериментальных группах, отличающихся по поведению, различий в уровне гормона не обнаружено. Достоверные различия между контрольными и подвергавшимися хэндлингу крысами были выявлены только у ручных животных через 2 ч после стресса ($p < 0{,}05$) (рис. 6). У агрессивных животных значимого влияния экспериментального воздействия на уровень кортикостерона не обнаружено.

Кроме того, была изучена динамика изменения содержания АКТГ в плазме крови крыс. Двухфакторный дисперсионный анализ не показал достоверного влияния факторов генотипа на динамику изменения уровня гормона. Стрессорное воздействие достоверно увеличивало концентрацию АКТГ в крови всех исследованных групп животных ($p < 0{,}05$ – ручные контрольные; $p < 0{,}01$ – ручные опытные и $p < 0{,}001$ – обе группы агрессивных крыс) (рис. 7). Однако уже через 2 ч после окончания стресса у всех групп животных данный показатель достоверно не отличался от базального. Достоверных различий

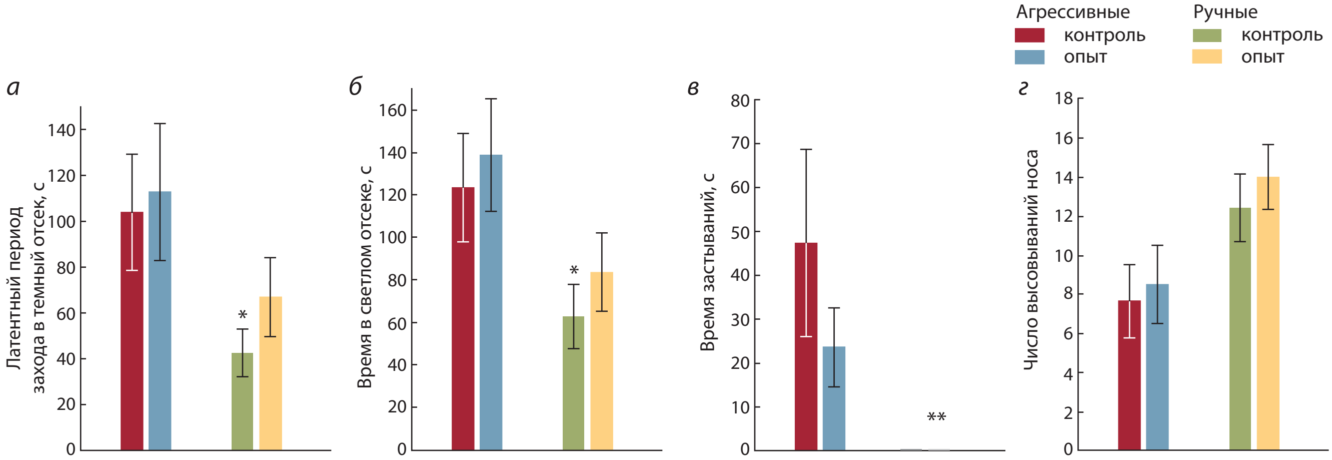

Рис. 5. Поведение агрессивных и ручных крыс в тесте «светло-темная камера»: латентный период захода в темный отсек (*а*); время, проведенное в светлом отсеке (*б*); суммарное время застываний в светлом отсеке (*в*); число высовываний носа из темного в светлый отсек (*г*).
$^{*}p < 0{,}05$; $^{**}p < 0{,}01$ по сравнению с агрессивной контрольной группой.

в уровне АКТГ между поведенческими, а также между контрольными и экспериментальными группами при попарном сравнении обнаружено не было.

Исследование количества мРНК рецептора глюкокортикоидов в гиппокампе и кортикотропин-рилизинг гормона в гипоталамусе ручных и агрессивных крыс в норме и после неонатального хэндлинга

Анализ результатов ОТ-ПЦР в реальном времени не выявил достоверных различий в количестве мРНК ГР в гиппокампе между ручными и агрессивными крысами (таблица). В то же время было обнаружено небольшое, но достоверное уменьшение экспрессии КРГ в гипоталамусе ручных крыс относительно агрессивных ($p < 0{,}01$).

Неонатальный хэндлинг достоверно не повлиял на количество мРНК ГР в гиппокампе ручных крыс ($p < 0{,}05$) (таблица), однако немного, но достоверно снизил этот показатель у агрессивных ($p = 0{,}03$), причем количество мРНК ГР в гиппокампе агрессивных опытных крыс было достоверно ниже также по сравнению с ручными контрольными ($p = 0{,}03$) и опытными ($p < 0{,}001$) животными.

На количество мРНК КРГ в гипоталамусе ранние воздействия не оказали достоверного влияния (таблица): группа агрессивных опытных животных достоверно не отличалась

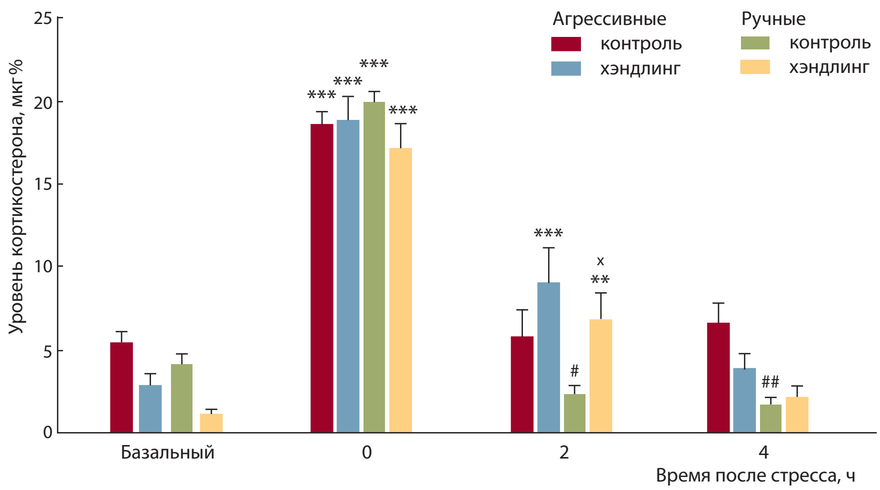

Рис. 6. Влияние неонатального хэндлинга на динамику уровня кортикостерона в крови у ручных и агрессивных взрослых крыс после рестрикционного стресса.
$^{**}p < 0{,}01$; $^{***}p < 0{,}001$ по сравнению с базальным уровнем; $^{x}p < 0{,}05$ по сравнению с контролем; $^{\#}p < 0{,}05$; $^{\#\#}p < 0{,}01$ по сравнению с агрессивными крысами.

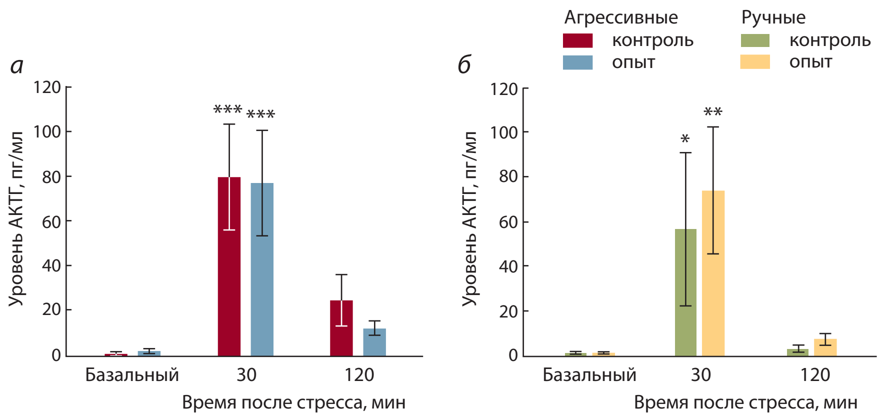

Рис. 7. Влияние неонатального хэндлинга на динамику уровня АКТГ в крови у агрессивных (*а*) и ручных (*б*) взрослых крыс после рестрикционного стресса
$^{*}p < 0{,}05$; $^{**}p < 0{,}01$; $^{***}p < 0{,}001$ по сравнению с базальным уровнем.

Влияние неонатального хэндлинга на количество мРНК рецептора глюкокортикоидов (ГР) в гиппокампе и кортикотропин-рилизинг гормона (КГР) в гипоталамусе ручных и агрессивных крыс

Группы животных	Соотношение экспрессии	Стандартная ошибка	95 %-й доверительный интервал	p	Результат
Рецептор клюкокортикоидов в гиппокампе					
Ручные контроль / агрессивные контроль	1,106	0,759–1,677	0,331–2,175	> 0,05	–
Ручные опыт / ручные контроль	1,106	0,759–1,677	0,331–2,175	> 0,05	–
Агрессивные опыт / агрессивные контроль	0,812	0,565–1,164	0,406–1,481	< 0,05	↓
Агрессивные опыт / ручные контроль	0,765	0,507–1,209	0,213–1,541	< 0,05	↓
Агрессивные опыт / ручные опыт	0,692	0,487–1,021	0,341–1,353	< 0,001	↓
Кортикотропин-рилизинг гормон в гипоталамусе					
Ручные контроль / агрессивные контроль	0,742	0,455–1,261	0,314–1,702	< 0,05	↓
Агрессивные опыт / агрессивные контроль	1,114	0,680–1,926	0,474–2,396	> 0,05	–
Агрессивные опыт / ручные контроль	0,666	0,446–0,984	0,327–1,376	≤ 0,001	↓
Ручные опыт / ручные контроль	1,261	0,715–2,244	0,550–4,578	> 0,05	–
Ручные опыт / агрессивный контроль	0,979	0,497–1,699	0,344–4,257	> 0,05	–

Попарное сравнение экспрессии гена ГР (КГР) у крыс исследуемых групп. «↓» – достоверное снижение экспрессии у первой группы в строке относительно второй.

от агрессивных контрольных ($p > 0{,}05$) и даже несколько больше, чем агрессивные контрольные животные, отличалась от ручных контрольных ($p = 0{,}001$); группа опытных ручных крыс достоверно не отличалась от контрольных ручных животных, однако в отличие от последних подвергнутые неонатальному хэндлингу крысы достоверно не отличались и от агрессивного контроля.

Обсуждение

Полученные в данной работе результаты показали, что длительный отбор крыс значительно ослабляет эффект неонатального хэндлинга на поведение по отношению к человеку у агрессивных крыс 75-го поколения по сравнению с животными 44-го поколения отбора (рис. 3; Оськина, Плюснина, 1997). Результаты измерений уровня кортикостерона в крови взрослых крыс сразу после стресса подтвердили, что агрессивные крысы современных поколений не отличаются от ручных по этому показателю, что соответствует проводимым недавно исследованиям (Прасолова и др., 2014) и противоположно результатам, полученным на предыдущих этапах отбора (Дыгало и др., 1985; Plyusnina, Oskina, 1997; Оськина и др., 2008). При этом неонатальный хэндлинг не изменял уровень кортикостерона, измеренный сразу после стресса, у исследуемых крыс в отличие от животных 44-го поколения (Оськина, Плюснина, 1997). Одним из основных механизмов действия неонатального хэндлинга на уровень стресс-ответа является, по-видимому, снижение количества ГР в гиппокампе (Liu et al., 1997). Поэтому ослабление эффекта воздействий может быть связано с исчезновением различий в экспрессии гена ГР у ручных и агрессивных крыс 75-го поколения по сравнению с данными предыдущих исследований (Оськина, Плюснина, 1997; Оськина и др., 2008; Гербек и др., 2010; Herbeck et al., 2010), что по ряду признаков (Прасолова и др., 2014) указывает именно на повышение экспрессии гена у агрессивных животных. Это может быть связано с усилением глюкокортикоидной обратной связи у агрессивных крыс на современном этапе отбора. Отсутствие эффектов хэндлинга на стресс-реактивность было показано и на некоторых других линиях крыс и мышей (Liu et al., 1997; Steimer et al., 1998; Gariépy et al., 2002). Однако только в некоторых (Liu et al., 1997) отсутствие эффекта, по-видимому, было связано со сниженным уровнем кортикостерона и повышенным количеством мРНК ГР.

Несмотря на распространенное мнение о хэндлинге как о благоприятном воздействии, которое обогащает раннюю социальную среду развивающегося организма, он имеет и стрессогенную составляющую, которая может вызывать неблагоприятные эффекты, например, на социальное поведение (Macri et al., 2004; Tang et al., 2006). В нашем эксперименте небольшое влияние хэндлинга на стресс-ответ также было обнаружено как у ручных, так и агрессивных крыс. Оно заключалось не в снижении, а, наоборот, в более длительном сохранении стресс-индуцированного уровня глюкокортикоидов после стресса. Подобные изменения в стресс-ответе могут быть связаны с уменьшением количества ГР в гиппокампе или других структурах мозга, задействованных в глюкокортикоидной обратной связи. Небольшое, но достоверное повышение мРНК ГР обнаружено в гиппокампе у агрессивных крыс, подвергнутых неонатальному хэндлингу. У ручных крыс хотя и не было достоверных различий по этому показателю между опытной и контрольной группами, но не было обнаружено различий и с агрессивными крысами, подвергнутыми хэндлингу, и наблюдался значительный разброс данных внутри опытной ручной группы. Похожий эффект воздействия наблюдался и на экспрессию гена КРГ, различия в которой, так же как и в уровне кортикостерона через 2 ч после стресса, исчезали и у ручных, и у агрессивных крыс. Таким образом, неонатальный хэндлинг мог подействовать на количество мРНК ГР и КРГ у обеих поведенческих групп, но был установлен только у агрессивных из-за небольшого эффекта.

Что касается тревожности, то она повышалась у ручных крыс под действием хэндлинга на уровне тенденции, что показала амплитуда вздрагивания в ответ на первые пять стимулов в стартл-тесте. Кроме того, этот показатель после ранних воздействий не отличался у ручных животных от агрессивных, что может быть связано с исчезновением различий в экспрессии гена КРГ, так как именно этот нейропептид, по-видимому, играет существенную роль во взаимосвязи стресс-ответа и тревожности (Blank, Spiess, 2010).

Несмотря на то что у ручных матерей было отмечено усиление материнского поведения после воздействия на их потомство, едва ли этот фактор имеет вклад в изменение стресс-ответа. Хотя и ручные, и агрессивные крысы имели однонаправленные изменения уровня кортикостерона вследствие неонатального хэндлинга, однако у агрессивных крыс в отличие от ручных было отмечено даже некоторое ослабление материнского поведения. Кроме того, из литературных источников известно, что усиление материнского поведения может, наоборот, снижать стресс-ответ у их потомков (Liu et al., 1997; Weaver et al., 2004). Разная реакция ручных и агрессивных матерей на воздействия, по-видимому, связана с изначальными различиями в поведении линий – усиленной материнской заботой агрессивных крыс по сравнению с ручными (Плюснина и др., 2013; Plyusnina et al., 2013).

Проведенные исследования по перекрестному вскармливанию ручных и агрессивных крыс также не показали изменений в оборонительной агрессии, а стресс-реактивность обеих линий несколько повысилась (Plyusnina et al., 2009). Исходя из этого небольшие изменения стресс-ответа, экспрессии генов ГР и КРГ во взрослом состоянии могут быть связаны со стрессогенной составляющей манипуляций, как это видно из исследований по перекрестному вскармливанию (Plyusnina et al., 2009).

Таким образом, к современным поколениям содержания в неволе агрессивные крысы под действием естественного и искусственного отбора, по-видимому, перестали воспринимать человека и условия вивария как стрессогенные. Поэтому агрессия по отношению к человеку, вероятно, в меньшей степени обусловлена страхом и стрессом и в большей степени – генотипом, чем на предыдущих этапах отбора, и мало зависит от хэндлинга и изменяющегося при этом материнского поведения. Сохраняющееся у крыс 75-го поколения небольшое снижение агрессии после неонатального хэндлинга можно объяснить некоторым снижением реакции страха вследствие регулярного проведения экспериментальной процедуры в неонатальный период.

Благодарности
Исследование выполнено в рамках государственного задания по проекту № 0324-2015-0004.

Ю.Э.Г., О.А.А., М.Ю.К. и С.Г.Ш. внесли равный вклад в данную работу.

Конфликт интересов
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы
Беляев Д.К., Бородин П.М. Влияние стресса на наследственную изменчивость и его роль в эволюции. Эволюционная генетика. Л.: ЛГУ, 1982:35-59.

Гербек Ю.Э., Оськина И.Н., Гулевич Р.Г., Плюснина И.З. Влияние материнской метилобогащенной диеты на экспрессию гена рецептора глюкокортикоидов в гиппокампе у крыс, селектируемых по поведению. Цитол. генет. 2010;44(2):45-52.

Дыгало Н.Н., Шишкина Г.Т., Бородин П.М., Науменко Е.В. Роль нейрохимических систем головного мозга в изменении реактивности гипофизарно-надпочечникового комплекса серой крысы при селекции на поведение. Журн. эвол. биохим. и физиол. 1985;21(4):342-347.

Оськина И.Н., Гербек Ю.Э., Шихевич С.Г., Плюснина И.З., Гулевич Р.Г. Изменения в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системе при отборе животных на доместикационное поведение. Информационный вестник ВОГиС. 2008;12(1/2):39-48.

Оськина И.Н., Плюснина И.З. Гипофизарно-надпочечниковая система диких серых крыс при отборе на доместикационное поведение и неонатальном хэндлинге. Материалы науч. конф. «Эндокринные механизмы регуляции функций в норме и патологии». Новосибирск, 1997:114-115.

Плюснина И.З., Таранцев И.Г., Булушев Е.Д., Коношенко М.Ю., Кожемякина Р.В., Гербек Ю.Э., Оськина И.Н. Анализ материнского поведения ручных и агрессивных серых крыс. ЖВНД. 2013;63(3):375-383.

Прасолова Л.А., Гербек Ю.Э., Гулевич Р.Г., Шихевич С.Г., Коношенко М.Ю., Кожемякина Р.В., Оськина И.Н., Плюснина И.З. Эффекты длительного отбора по поведению на стресс-ответ и активность половой системы самцов серых крыс (*Rattus norvegicus*). Генетика. 2014;50(8):959-966.

Тинников А.А., Бажан Н.М. Определение глюкокортикоидов в плазме крови и инкубатах надпочечников методом конкурентного связывания гормонов белками без предварительной экстракции. Лаб. дело. 1984;12:709-713.

Bagot R.C., Meaney M.J. Epigenetics and the biological basis of gene × environment interactions. J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry. 2010;49(8):752-771. DOI 10.1016/j.jaac.2010.06.001

Bale T.L. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. Nat. Rev. Neurosci. 2015;16:332-344. DOI 10.1038/nrn3818

Blank T., Spiess J. Corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF-related peptides – a linkage between stress and anxiety. Stress- From Molecules to Behavior: A Comprehensive Analysis of the Neurobiology of Stress Responses. 2009. Weinheim: Wiley-VCH, 2010: 151-165.

Francis D.D., Diorio J., Plotsky P.M., Meaney M.J. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. J. Neurosci. 2002;22(18):7840-7843.

Gariépy J.-L., Rodriguiz R.M., Jones B.C. Handling, genetic and housing effects on the mouse stress system, dopamine function, and behavior. Pharmacol. Biochem. Behav. 2002;73(1):7-17. DOI 10.1016/S0091-3057(02)00789-X

Herbeck Y.E., Os'kina I.N., Gulevich R.G., Plyusnina I.Z. Effects of maternal methyl-supplement diet on hippocampal glucocorticoid receptor mRNA expression in rats selected for behavior. Cytol. Genet. 2010;44(2):108-113. DOI 10.3103/S0095452710020064

Gonzalez-Liencres C., Shamay-Tsoory S.G., Brüne M. Towards a neuroscience of empathy: ontogeny, phylogeny, brain mechanisms, context and psychopathology. Neurosci. Biobehav. Rev. 2013;37(8): 1537-1548. DOI 10.1016/j.neubiorev.2013.05.001

Konoshenko M.Y., Plyusnina I.Z. Behavioral effects of bidirectional selection for behavior towards human in virgin and lactate Norway rats. Behav. Processes. 2012;90(2):180-188. DOI 10.1016/j.beproc.2012.01.007

Kosten T.A., Lee H.J., Kim J.J. Early life stress impairs fear conditioning in adult male and female rats. Brain Res. 2006;1087:142-150. DOI 10.1016/j.brainres.2006.03.009

Levine S. Maternal and environmental influences on the adrenocortical response to stress in weanling rats. Science. 1967;156:258-260.

Liu D., Diorio J., Tannenbaum B., Caldji C., Francis D., Freedman A., Sharma S., Pearson D., Plotsky P.M., Meaney M.J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. Science. 1997;277(5332):1659-1662.

Macri S., Mason G.J., Wu H. Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. Eur. J. Neurosci. 2004;20(4):1017-24. DOI 10.1111/j.1460-9568.2004.03541.x

Marini F., Pozzato C., Andreetta V., Jansson B., Arban R., Domenici E., Carboni L. Single exposure to social defeat increases corticotropin-releasing factor and glucocorticoid receptor mRNA expression in rat hippocampus. Brain Res. 2006;1067:25-35. DOI 10.1016/j.brainres.2005.10.002

McEwen B.S. Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. Neuropsychopharmacology. 2000;22(2):108-124.

Murphy B.E. Some studies of the protein binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein-binding radioassay. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1967;27:973-990.

Peinnequin A., Mouret C., Birot O., Alonso A., Mathieu J., Clarençon D., Agay D., Chancerelle Y., Multon E. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. BMC Immunology. 2004;5:3. DOI 10.1186/1471-2172-5-3

Plyusnina I., Oskina I. Behavioral and adrenocortical responses to open-field test in rats selected for reduced aggressiveness toward humans. Physiol. Behav. 1997;61(3):381-385.

Plyusnina I.Z., Oskina I.N., Tibeikina M.A., Popova N.K. Cross-fostering effects on weight, exploratory activity, acoustic startle reflex and corticosterone stress response in Norway gray rats selected for elimination and for enhancement of aggressiveness towards human. Behav. Genet. 2009;39(2):202-212. DOI 10.1007/s10519-008-9248-6

Plyusnina I.Z., Tarantsev I.G., Bulushev E.D., Konoshenko M.Y., Kozhemyakina R.V., Gerbek Y.E., Os'kina I.N. Analysis of maternal behavior in tame and aggressive gray rats. Neurosci. Behav. Physiol. 2014;44(8):856-862. DOI 10.1007/s11055-014-9993-3

Steimer T., Escorihuela R.M., Fernández-teruel A., Driscoll A.P. Long-term behavioural and neuroendocrine changes in Roman high-(RHA/Verh) and low-(RLA-Verh) avoidance rats following neonatal handling. Int. J. Dev. Neurosci. 1998;16(3-4):165-174. DOI 10.1016/S0736-5748(98)00032-X

Tang A.C., Akers K.G., Reeb B.C., Romeo R.D., McEwen B.S. Programming social, cognitive, and neuroendocrine development by early exposure to novelty. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006;103:15716-15721.

Tang A.C., Reeb-Sutherland B.C., Romeo R.D., McEwen B.S. On the causes of early life experience effects: evaluating the role of mom. Front. Neuroendocrinol. 2014;35(2):245-51. DOI 10.1016/j.yfrne.2013.11.002

Todeschin A.S., Winkelmann-Duarte E.C., Jacob M.H., Aranda B.C., Jacobs S., Fernandes M.C., Ribeiro M.F., Sanvitto G.L., Lucion A.B. Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. Horm. Behav. 2009;56(1):93-100. DOI 10.1016/j.yhbeh.2009.03.006

Veenema A.H. Toward understanding how early-life social experiences alter oxytocin- and vasopressin-regulated social behaviors. Horm. Behav. 2012;61(3):304-312. DOI 10.1016/j.yhbeh.2011.12.002

Veenema A.H., Torner L., Blume A., Beiderbeck D.I., Neumann I.D. Low inborn anxiety correlates with high intermale aggression: link to ACTH response and neuronal activation of the hypothalamic paraventricular nucleus. Horm. Behav. 2007;51(1):11-19. DOI 10.1016/j.yhbeh.2006.07.004

Weaver I.C., Cervoni N., Champagne F.A., D'Alessio A.C., Sharma S., Seckl J.R., Dymov S., Szyf M., Meaney M.J. Epigenetic programming by maternal behavior. Nat. Neurosci. 2004;7(8):847-854. DOI 10.1038/nn1276

Zhang T.Y., Labonté B., Wen X.L., Turecki G., Meaney M.J. Epigenetic mechanisms for the early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression in rodents and humans. Neuropsychopharmacology. 2013;38:111-123. DOI 10.1038/npp.2012.149