

Влияние нейропептидов на репродуктивную функцию самок неинбредных крыс

¹Белякова Н.А., ²Бонитенко Е.Ю., ¹Носов А.В., ¹Генералова К.Р., ¹Лисицкий Д.С.

¹*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»*

192019, г. Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д.1

телефон/факс: (812) 365-06-80

e-mail: institute@toxicology.ru

²*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт медицины труда им. академика Н.Ф. Измерова»
105275, Москва, пр. Буденного, д. 31*

Резюме.

Цель исследования состояла в экспериментальном изучении влияния дельта-сон индуцирующего пептида либо фрагмента адренокортикотропного гормона на состояние репродуктивной функции самок неинбредных крыс.

В результате получены данные, свидетельствующие, что воздействие дельта-сон индуцирующего пептида либо фрагмента адренокортикотропного гормона на материнский организм приводит к ряду эффектов, проявляющихся в изменении двигательной активности животных и, возможно, полового поведения. Следствием этого является снижение способности самок к зачатию и вынашиванию потомства.

Следует заключить, что двухнедельное назначение исследуемых препаратов самкам в период, предшествующий зачатию, приводит к нарушению темпов физического развития эмбрионов, выражающемуся в отставании процессов остеогенеза в костях скелета.

Ключевые слова.

нейропептиды, дельта-сон индуцирующий пептид, фрагмента адренокортикотропного гормона, репродуктивная функция, эмбриогенез.

Influence of neuropeptides on reproductive function of non-inbred rats' females

¹Belyakova N.A., ²Bonitenko E.Y., ¹Nosov A.V., ¹Generalova K.R., ¹Lisitskiy D.S.

1Federal State Budgetary Institution of Science

“Institute of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency”

2Federal State Budget Scientific Institution

"Research Institute of Occupational Medicine them. Academician N.F. Medvedev »

Summary.

The research objective consisted in experimental studying of Delta sleep inducing peptide or fragment of adrenocorticotrophic hormone influence on a condition of non-inbred rats' females' reproductive function.

The data indicating that the effect of Delta sleep inducing peptide or fragment of adrenocorticotrophic hormone on the maternal organism leads to motor activity changes and, possibly, animals sexual behavior disorders are as a result obtained. Decrease in the ability of females to conceive and bear offspring is a consequence of it.

It should be concluded that the two-week prescription of the studied drugs to non-inbred rats' females in the period preceding conception leads to a disruption in the physical development of embryos, expressed in the lag of osteogenesis in the bones of the skeleton.

Keyword.

neuropeptides, delta sleep inducing peptide, fragment of adrenocorticotrophic hormone, reproductive function, embryogenesis.

Введение

Исследования по поиску средств коррекции функций центральной нервной системы при поражениях различной этиологии, продемонстрировали положительное влияние нейропептидов на течение заболеваний, а также определили их место в комплексной терапии патологии нервной системы [1,2]

Анализ результатов исследований, проводившихся в последние десятилетия, как в нашей стране, так и за рубежом, показал, что нейропептиды, обладают широким спектром физиологической активности, направленной на восстановление функциональной активности структур головного мозга, нарушенной при патологическом процессе [3,4]. Как правило, нейропептиды оказывают ноотропное, нейропротекторное, антиоксидантное, адаптогенное воздействие на организм, находящийся в патологическом состоянии. Но данных по влиянию регуляторных пептидов на здоровый организм и, в частности, на женскую репродуктивную функцию в доступной литературе нам обнаружить не удалось.

Согласно современным представлениям изучение воздействия фармакологических препаратов и субстанций на репродуктивную функцию организма является актуальной задачей и важной частью доклинических исследований безопасности лекарственных средств. Получаемые сведения позволяют выявить риск применения препаратов, как до беременности, так и на различных ее сроках.

Наиболее распространенными и легко выявляемыми проявлениями нарушения эмбрионального развития являются задержка физического развития плода, а также те или иные нарушения формирования скелета [5,6]. Для их оценки в детской, спортивной и военной антропометрии довольно широко пользуются методом индексов [7].

В представленном исследовании метод индексов использовали для оценки степени биологического развития эмбрионов крыс в антенатальном периоде онтогенеза. Кроме того общепринятым и достоверным критерием степени эмбрионального развития, как в антенатальном периоде, так и во все последующие периоды постнатального онтогенеза служит так называемый «костный возраст» (скелетная зрелость), основным показателем которого является стадия оссификации скелета, определяемая по числу обызвествленных костей и размерам эпифизарных центров окостенения, свойственных данному периоду развития [8]

Целью данного исследования стала оценка влияния дельта-сон индуцирующего пептида (ДСИП) и аналога фрагмента АКГГ4-10 (ФАКТГ) на репродуктивную функцию самок неинбредных крыс.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на самках белых нелинейных крыс массой 210–240 г. Во время двухнедельного карантина и в течение всего исследования животные содержались в отдельном помещении с альтернирующим световым режимом: 12 час – свет, 12 час – темнота. Температура воздуха поддерживалась в пределах 20 – 22 °С, относительная влажность – 60 – 70%. Был установлен режим вентиляции, обеспечивающий циркуляцию воздуха около 15 объемов помещения в час, концентрацию CO₂ < 0,15 объемных %, аммиака < 0,001 мг/л. Животные содержали на стандартном пищевом и свободном водном рационе.

Во время карантина проводили ежедневный осмотр каждого животного для оценки поведения и общего состояния, дважды в день осматривали в клетках для определения признаков заболеваний и гибели. Во время исследования наблюдение и оценку состояния животных проводили ежедневно (осмотр, регистрация среднего потребления воды и пищи), один раз в неделю взвешивали.

При рандомизации групп в качестве основного критерия использовали массу тела (отклонение значений массы тела в пределах группы не более 10%). Каждая экспериментальная группа состояла из 10 животных.

Исследуемые препараты вводили однократно интраназально в течение двух недель, ФАКТГ и ДСИП в виде 0,1% раствора дозу 300 мкг/кг. Животным контрольных групп вводили интраназально воду для инъекций в эквивалентном объеме.

После окончания введения препаратов к самкам на период в два эстральных цикла подсаживали интактных самцов в соотношении 1 : 3 (один самец на три самки). Днем начала гестации считали день, в который в вагинальном мазке самок были обнаружены сперматозоиды. Учитывали число самок, подсаженных к самцам, количество оплодотворенных и беременных самок, на основании указанных выше показателей рассчитывали индексы фертильности (ИФ) и беременности (ИБ) (таблица 1). Кроме того учитывали изменение массы тела беременных самок в динамике.

На 20-й день беременности самок подвергали эвтаназии и вскрывали. Определяли количество желтых тел, мест имплантации, количество живых и погибших плодов, а также регистрировали все случаи пре- и постимплантационной гибели. На основании полученных результатов рассчитывали индексы пред- (ИПредИГ) и постимплантационной гибели (ИПостИГ) (таблица 1).

Таблица 1

Индексы, характеризующие репродуктивную функцию самок
и формулы их расчета

№	Индексы	Формула расчета
1.	Фертильности	$\text{ИФ} = \frac{\text{Число оплодотворенных самок}}{\text{Число самок, подсаженных к самцам}} \times 100\%$
2.	Беременности	$\text{ИБ} = \frac{\text{Число беременных самок}}{\text{Число оплодотворенных самок}} \times 100\%.$

3.	Предимплантационной гибели	$И_{ПредИГ} = \frac{\text{Кол-во желтых тел} - \text{Кол-во мест имплантации}}{\text{Кол-во желтых тел}} \times 100\%.$
4.	Постимплантационной гибели	$И_{ПостИГ} = \frac{\text{Кол-во мест имплантации} - \text{Кол-во живых плодов}}{\text{Кол-во мест имплантации}} \times 100\%.$

Морфометрические характеристики эмбрионов (масса тела, краниокаудальный размер, длина передних и задних конечностей, окружность грудной клетки), а так же выявленные аномалии развития органов и тканей фиксировали в протоколе вскрытия.

Оценка развития эмбрионов проводилась на основании индексов физического развития, представленных в таблице 2 [1,2,3,4]. Единицы измерений, используемые в расчетах индексов, были адаптированы в соответствии с особенностями объекта исследования. За длину тела принимали краниокаудальный размер (общая длина тела плода без хвоста) выраженный в сантиметрах. Массу тела плодов для определения индексов Кетле I и II, Ливи и Рорера вычисляли в граммах, для всех остальных единиц измерения были килограммы. Окружность грудной клетки измеряли в сантиметрах.

Таблица 2

Индексы, характеризующие физическое развитие эмбрионов
и формулы их расчета

№ п/п	Индексы	Формула расчета
1.	Кетле I	$И = \frac{\text{Масса тела (г)}}{\text{краниокаудальный размер (см)}}$
2.	Кетле II	$И = \frac{\text{Масса тела (г)}}{\text{краниокаудальный размер (см)}^2}$
3.	Бонгарда	$И = \frac{\text{Масса тела (г)}}{\text{краниокаудальный размер (см)} * \text{обхват груди (см)}}$
4.	Вервека (модификация)	$И = \frac{\text{краниокаудальный размер (см)}}{2 \text{ масса тела (г)} + \text{обхват груди (см)}}$
5.	Пинье	$И = \frac{\text{Масса тела (г)}}{\text{краниокаудальный размер (см)} + \text{обхват груди (см)}}$
6.	Эрисмана	$И = \text{обхват груди (см)} - 0,5 * \text{краниокаудальный размер (см)}$
7.	Ливи	$И = \frac{\sqrt[3]{\text{масса тела (г)}}}{\text{краниокаудальный размер (см)} * 100}$
8.	Рорера	$И = \frac{\text{масса тела (г)} * 100}{(\text{краниокаудальный размер (см)})^3},$

Половину эмбрионов помещали в раствор Буэна для последующего морфометрического исследования по методу Wilson [5] в модификации А.П. Дыбана (1970) [6,7]. Остальные эмбрионы фиксировали в 96° этиловом спирте, обрабатывали 1% раствором КОН и промывали деионизированной водой, после чего окрашивали ализарином и обезвоживали в смеси глицерина с 96° этанолом для оценки состояния скелета по методике Доусона [8,9]

Степень развития скелета эмбрионов и оссификацию костной ткани оценивали согласно рекомендациям, представленным в Current Protocols in Toxicology, Chapter 13 Teratology (2006) [10]. Оссификацию оценивали по глубине окраски по отделам: кости черепа, грудного отдела, верхних и нижних конечностей, включая кости пояса конечностей. Частоту встречаемости задержки/снижения оссификации выражали в процентах. Оценивали следующие показатели: наличие/отсутствие оссификации костей грудины; количество оссифицированных позвонков хвоста, пястных костей и костей плюсны, проксимальных и дистальных фаланг каждой конечности. Кроме того оценивали количество сращенных, неправильно сочлененных, удвоенных, дефектных позвонков и ребер [6].

За единицу наблюдения при статистической обработке полученных результатов принимали одну самку или один помет. Статистическая обработка результатов производилась с использованием пакета программа Statistica 6,0 для Windows. Расчет средних величин регистрируемых показателей проводился общепринятыми статистическими методами. В случае нормального распределения показателей в экспериментальных группах и равенства дисперсий использовались методы параметрической статистики (сравнения показателей с использованием t-критерия Стьюдента для связанных и не связанных выборок). Для сравнения средних величин и установления статистической значимости различий с контролем при отсутствии признаков нормального распределения проводили статистическую обработку по непараметрическим тестам (Вилкоксона для связанных и Манна-Уитни для не связанных выборок).

Результаты и их обсуждение

В ходе двухнедельного интраназального введения препаратов особенности поведения и клинической картины у экспериментальных животных были схожи с контрольными. Однако следует отметить, что через 5–10 мин после введения препарата ФАКТГ, у подопытных животных наблюдалась повышенная двигательная активность, сохраняющаяся в течение часа. Применение ФАКТГ способствовало изменению паттерна поведения, особенно отчетливо проявляющегося у молодых животных. Применение ФАКТГ способствовало изменению паттерна поведения, особенно отчетливо проявляющегося у молодых животных [1,2,3,4]. Причем этот паттерн сохранялся в течение 2-х недель после прекращения введения препарата.

В свою очередь, после введения ДСИП, у животных отмечалось снижение двигательной активности по сравнению с контролем [5,6]. Данный феномен сохранялся на протяжении не менее 2-х недель после прекращения введения препарата.

В группе животных, получавшей ДСИП, было выявлено значимое снижение темпов прироста массы тела на 2-ой и 3-ей неделе беременности, в то время как у животных получавших ФАКТГ оно отмечалось только на 3-ей неделе (таблица 3).

Таблица 3

Влияние введения исследуемых препаратов
на динамику массы тела беременных крыс

Группа животных	Прирост массы тела (%) в период наблюдения		
	1-я неделя	2-я неделя	3-я неделя
Контроль	12,50±0,85	13,30±0,82	23,54±1,98
ДСИП	13,08±0,81	10,58±0,74*	16,04±2,08*
ФАКТГ	12,34±1,32	12,15±0,89	18,76±1,30*
Примечание: * – различие с контролем достоверно ($p < 0,05$)			

При изучении влияния интраназального введения препаратов на плодовитость крыс было установлено, что в группах получавших ДСИП и ФАКТГ индекс фертильности был снижен на 10 и 25 %, а индекс беременности на 18 и 9% соответственно (рисунок 1).

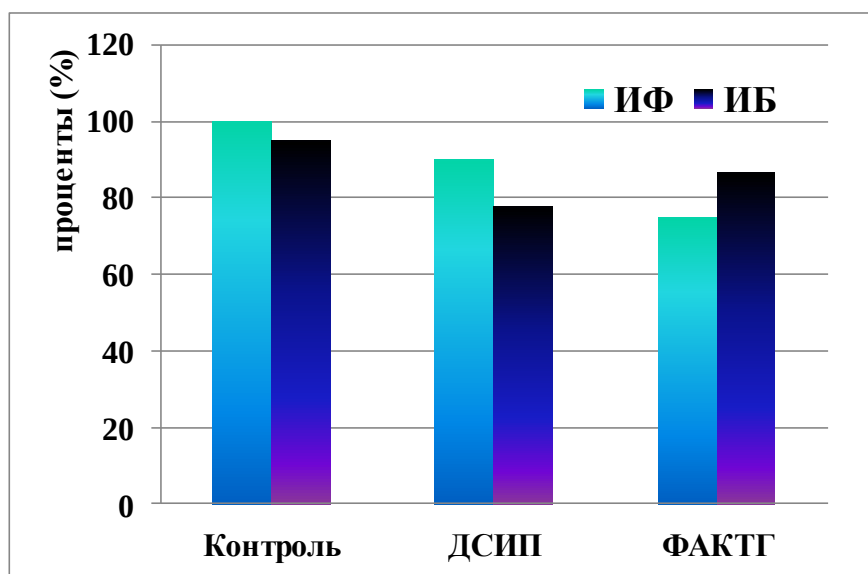


Рисунок 1 – Индексы фертильности и беременности у самок крыс после интраназального применения пептидных препаратов

Исследуемые препараты ДСИП и ФАКТГ не оказывали статистически значимого влияния на продолжительность беременности, количество желтых тел и мест имплантации. Эмбриональная гибель в предимплантационном периоде достоверно не различалась во всех экспериментальных группах (таблица 4).

Таблица 4

Результаты исследования влияния препаратов на репродуктивные показатели белых нелинейных крыс

Показатели	Группы		
	Контроль	ДСИП	ФАКТГ
Количество желтых тел, (М ± m)	13,57±0,59	12,70±0,81	12,86±1,03
Количество мест имплантации, (М ± m)	12,14±0,48	11,20±1,02	11,43±0,69
Количество живых плодов, (М ± m)	11,71±0,55	10,40±1,06	11,14±0,74
Индекс предимплантационной гибели	9,98±1,90	11,89±6,61	9,74±3,63
Индекс постимплантационной гибели, в %	3,70±1,80	8,12±2,62	2,81±1,90
Примечание: * – различие с контролем достоверно (p < 0,05)			

Обращало на себя внимание увеличение индекса постимплантационной гибели в 2,2 раза в группе, получавшей ДСИП в сравнении с контролем. У крыс всех экспериментальных групп уродств и видимых аномалий развития плодов зафиксировано не было.

При исследовании эмбрионов крыс было установлено, что морфометрические показатели, такие как масса тела, длина передних и задних конечностей не отличаются во всех экспериментальных группах. В то время как в группах получавших ДСИП и ФАКТГ

длина тела эмбриона была снижена на 8,8 и 12,3%, а окружность грудной клетки на 24,2 и 27,8% соответственно по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Для оценки физического состояния плодов крыс были рассчитаны индексы физического развития. Использование индексов преследовало целью определить влияние пептидных препаратов на физическое развитие эмбрионов.

Представленные в таблице 5 значения индекса Кетле I, характеризующего гармоничность развития тела эмбриона в группах, получавших пептидные препараты, не отличались от контроля. В свою очередь индексы Кетле II, Борнгарда и Пинье, были статистически значимо ($p < 0,05$) выше в опытных группах, что свидетельствовало о более крепком телосложении эмбрионов в контроле, о чем свидетельствовал и индекс Эрисмана, характеризующий степень развития грудной клетки ($p < 0,05$). В свою очередь, на основании полученных значений индекса Вервека можно говорить о том, что эмбрионы в группах получавших ДСИП и ФАКТГ развивались по долихоморфическому, в то время как в контрольной – по мезоморфическому типу. Об «астеническом телосложении» (узкосложенности) эмбрионов опытных групп свидетельствуют также и индексы Ливи и Рорера, являющиеся показателями физической организации (пропорций) тела. Анализируя полученные результаты, и исходя из того, что выносливость, работоспособность и сила, тем выше, чем больше плотность, массивность и чем меньше вытянутость формы тела, можно говорить, о том, что эмбрионы контрольной группы, в отличие от опытных, физически более крепкие.

Таким образом, морфометрические показатели плодов крыс, а именно использование метода индексов дает представление о соответствии гестационного возраста и может являться одним из критериев оценки уровня физического развития.

Анализ полученных нами результатов показал пропорциональное снижение морфометрических показателей тела в обеих опытных группах относительно этих же показателей у потомства крыс из контроля.

Таблица 5

Индексы физического развития плодов у самок крыс, получавших пептидные препараты до беременности

Группы животных	Индексы физического развития							
	Кетле I	Кетле II	Борнгарда	Вервека	Пинье	Эрисмана	Ливи	Ропера
Контроль	0,828±0,035	0,238±0,004	0,00030±0,00001	1,250±0,031	0,690±0,081	1,041±0,057	34,475±0,472	6,876±0,098
ДСИП	0,857±0,037	0,271±0,005*	0,00041±0,00002*	1,498±0,051*	1,052±0,103*	0,526±0,054*	37,558±0,754*	8,642±0,268*
ФАКТГ	0,817±0,010	0,269±0,005*	0,00040±0,0002*	1,527±0,047*	1,031±0,058*	0,486±0,058*	38,349±0,485*	8,903±0,287*
Примечание: * – различие с контролем достоверно ($p < 0,05$)								

При исследовании аномалий внутренних органов плодов крыс по методу Вильсона–Дыбана было установлено, что во всех группах имели место случаи полнокровия предсердий и желудочков сердца, однако различий по частоте встречаемости этих показателей между группами зарегистрировано не было. В свою очередь обращало на себя внимание, что частота кровоизлияний в грудную и брюшную полость в группе получавшей ФАКТГ составляла 16,3 и 9,3% по сравнению с контролем соответственно. В то время как в группе получавшей ДСИП различий с контролем по этим показателям зарегистрировано не было.

Важным компонентом в изучении влияния фармакологических препаратов на репродуктивную функцию самок является исследование формирования костной структуры плода, проводимое в конце эмбрионального развития, когда уже произошла закладка и завершается оксификация скелета у млекопитающих.

При исследовании эмбрионов крыс экспериментальных групп не было зафиксировано атипичного строения и расположения костей скелета, а так же внешних аномалий развития костей лицевого отдела. Кости черепа, грудины, верхних и нижних конечностей, имели темно-фиолетовую окраску, и были практически непрозрачными. Процесс обызвествления наблюдался практически во всех отделах позвоночника (шейный, грудной, поясничный, крестцовый), за исключением хвостового, окостенение большинства позвонков которого в период внутриутробного развития не происходит. У эмбрионов всех экспериментальных групп было зарегистрировано 7 шейных, 13 грудных, 6 поясничных и 5 крестцовых позвонков, а также 13 пар ребер.

При остеометрических исследованиях не было выявлено заметной асимметрии, выходящей за рамки анатомической нормы. У эмбрионов всех исследуемых групп длина закладок окостенения в диафизах длинных трубчатых костей, была практически одинаковой с обеих сторон. Данные о длине зачатков и количестве оксифицированных костей эмбрионов представлены в таблице 6.

Таблица 6

Влияние пептидных препаратов, применяемых до беременности крыс, на длину и количество точек оксификации костей у плодов

Изучаемые параметры		Группа животных		
		Контроль	ДСИП	ФАКТГ
Длина зачатков костей (мм)	локтевой	2,67±0,06	2,27±0,09*	2,39±0,04*
	плечевой	2,51±0,05	2,18±0,06*	2,20±0,05*
	бедренной	2,24±0,05	1,68±0,06*	1,77±0,04*
	большеберцовая	2,31±0,09	1,82±0,07*	1,93±0,07*
	малоберцовая	2,22±0,06	1,69±0,06*	1,71±0,04*
Количество	ребер	13	13	13

оссифицированных	позвонков хвоста	3,17±0,12	1,14±0,20*	1,17±0,21*
	пястных костей	3,67±0,07	2,81±0,12*	2,95±0,03*
	дистальных фаланг передней конечности	3,14±0,13	1,21±0,22*	1,24±0,22*
	костей предплюсны	3,98±0,02	3,14±0,10*	3,24±0,07*
	дистальных фаланг задней конечности	3,69±0,07	1,19±0,22*	1,37±0,25*
Примечание: * – различие с контролем достоверно ($p < 0,05$)				

При исследовании скелетов плодов в группе самок получавших ДСИП, было установлено, достоверное ($p < 0,05$) снижение длины закладок костей передних (локтевой и плечевой на 15,0 и 13,1%), а так же задних (бедренной, большеберцовой и малоберцовой на 25,0, 21,2 и 23,8% соответственно) конечностей по сравнению с контролем. Аналогичные изменения были выявлены и в группе получавшей ФАКТГ только чуть менее выраженные.

В свою очередь при изучении процесса формирования костной ткани было установлено достоверное ($p < 0,05$) снижение на 63% количества оссифицированных позвонков хвоста в обеих опытных группах. Так же наблюдалось достоверное снижение количества центров окостенения в хрящевых моделях пястных костей и предплюсны, в группе получавшей ДСИП на 23,4 и 21,0%; и в группе получавшей ФАКТГ на 19,6 и 18,5 % соответственно. Кроме того при исследовании количества точек окостенения в дистальных фалангах конечностей было установлено снижение оссификации более чем на 60 % в опытных группах. Следует так же отметить, что проксимальные фаланги как задних, так и передних конечностей не были оссифицированы у эмбрионов всех исследуемых групп.

Таким образом, выявлен ряд эффектов исследуемых нейропептидов, характеризующихся выраженным изменением спонтанной двигательной активности и паттерна поведения самок неинбредных крыс в период, предшествующий наступлению беременности. Итогом таких изменений, несмотря на их разнонаправленность по вектору – снижение активности при применении ДСИП и её увеличение при назначении ФАКТГ, стало изменение полового и пищевого поведения и как следствие снижение способности самок к зачатию и вынашиванию потомства. Более того, изменения паттерна поведения животных сказались и на характере нарушений эмбриогенеза у плодов, формировании их телосложения по астеническому или долихоморфному типу, а также увеличении частоты встречаемости травматических повреждений (гематом брюшной и грудной полостей) у плодов, выявляемых в пренатальном периоде.

Заключение

Представленные данные свидетельствуют о том, что воздействие ДСИП либо ФАКТГ на материнский организм приводит к ряду изменений нервной регуляции, проявляющихся в изменении поведения животных. Результатом этого является снижение способности самок к зачатию и вынашиванию потомства. Кроме того, следствием двухнедельного назначения исследуемых препаратов самкам является нарушение темпов физического развития эмбрионов, выражающееся в отставании процессов остеогенеза в костях скелета. Указанные изменения могут являться основанием для осторожного назначения этих препаратов в период, предшествующий беременности.

Литература

1. Глоба О.В., Кузенкова Л.М., Горюнова А.В., Маслова О.И. Ноотропные препараты – нейропептиды в лечении неврологических расстройств у детей // Современные проблемы науки и образования. – 2008. – № 4.; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=986> (дата обращения: 02.10.2018).
2. Strand F.L. Neuropeptides: general characteristics and neuropharmaceutical potential in treating CNS disorders//Progress in Drug Research. – 2003. – Vol. 61. – P. 1–37.
3. Левицкая Н.Г., Глазова Н.Ю., Себенцова Е.А., Андреева Л.А., Каменский А.А. Влияние модификации N-концевой области молекулы на выраженность ноотропного действия аналогов семакса // Российский симпозиум по химии и биологии пептидов. Тезисы стендовых сообщений. – М., 2003, – С. 79.
4. Каплан А.Я., Кошелев В.Б., Незавибатько В.Н., Ашмарин И.П. Повышение устойчивости организма к гипоксии с помощью нейропептидного лекарственного препарата семакс // Физиология человека, 1992, Т. 18, №5, С. 104-107.
5. Hood R.D. Handbook of developmental toxicology // Wilson. – 1997. – P. 209.
6. Peters P. Method in prenatal toxicology //G. Tr. Publ. -Stuttgart. – 1977. – P. 1537
7. Изаак С.И. Физическое развитие и биоэнергетика мышечной деятельности школьников / С.И. Изаак, Т.В. Панасюк, Р.В. Тамбовцева. – Москва - Орел: ОРАГС, 2005. - 224 с.
8. Ubelaker D. Human skeletal remains: excavation, analysis, interpretation / Douglas H. Ubelaker. – Chicago: Aldine Pub. Co., - Aldine manuals on archeology, 1978. – 116 p.
9. Бюллетени Центрального антропометрического бюро. Прилож. к журналу Соц. гигиена, 1928–1929.
- 10 Бунак В. В. Методика антропометрических исследований /В. В. Бунак. -М.:Госмедиздат, 1931. – 222 с.

- 11 Серебровская М. В. Антропометрический справочник врача-педиатра, педолога и педагога / М. В. Серебровская ; Государственный научный институт здоровья детей и подростков НКЗдрава в Москве. - М. : Жизнь и знание, 1928. - 54 с.
- 12 Ярхо А.И. О взаимоотношении роста, веса и окружности грудной клетки и их значении для оценки физического развития/ Ярхо А.И. // Русский антропологический ж., 1924, Т. 13, Вып. 3–4. - с. 85–102.
- 13 Wilson J.G. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals / Wilson J.G., Warkany J. //Teratology: Principles and Techniques. – Chicago: University of Chicago Press, 1965. – P. 262–277.
14. Дыбан А.П. Основные методические подходы к тестированию тератогенной активности химических веществ / А.П. Дыбан, В.С. Баранов, И.М. Акимова // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1970. – Т.59. – № 10. – С. 89–100.
15. Seegmiller R.E., Cook N., Goodwin K., Leishmah T. Assessment of gross fetal malformations: the modernized Wilson technique and skeletal staining // Methods Mol. Biol. – 2012. – Vol. 889. – P. 451-453.
16. Dawson A. B. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S //Stain Technol.- 1926.- Vol.1.-P.123–124.
- 17 Jensch R.P., Brent R.L. Rapid schedules for KOH-clearing and alizarin red S staining of fetal rat bone// Stain Technol. – 1966. – Vol.41. – P. 179–185.
18. Chapter 13 Teratology //Current Protocols in Toxicology. – JohnWiley & Sons, 2006. – 2900 p.
19. Иванова Д.М. Влияние гептапептида семакс и его аналогов на болевую чувствительность животных: возможные механизмы действия [Текст]: дис... канд. биол. наук: 03.00.13/ Иванова Дарья Михайловна. – М., 2006. – 172 с.
20. Себенцова Е. А. Нейротропные эффекты семакса в неонатальном периоде и на фоне повреждения дофаминергической системы мозга [Текст]: дис... канд. биол. наук: 03.00.13/ Себенцова Елена Андреевна. – М., 2005. – 161 с. 21. с.
21. Самотруева М.А. Влияние Семакса на психоэмоциональное состояние крыс в условиях информационного воздействия / Самотруева М.А., Ясенявская А.Л., Цибизова А.А., Сергалиева М.У., Войнова В.И.// Здоровье и образование в XXI веке. – 2016. – Т.18. – №2 – С. 705-708.
22. Ясенявская А.Л. Изучение психотропных эффектов семакса на различных моделях стресса /Ясенявская А.Л.Мурталиева В.Х.// Астраханский медицинский журнал. – 2017. – Т.12. – №1 – С. 72-81.

23. Войтенков В.Б. Влияние пептида дельта-сна на продолжительность жизни и развитие опухолей у мышей [Текст]: дис... канд. мед. наук: 14.00.53/ Войтенков Владислав Борисович. – С-Пб., 2009. – 151 с.
24. Рахманова Э.И. Антистрессорные эффекты структурных аналогов дельта-сон индуцирующего пептида у крыс разного возраста [Текст]: дис... канд. биол. наук: 03.00.04/ Рахманова Эльмина Икрамовна. – Махачкала, 2004. – 152