

На правах рукописи

Васильев Дмитрий Сергеевич

**ФОРМИРОВАНИЕ КОНЕЧНОГО МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ НАРУШЕНИЯ
ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ, ВЫЗВАННОГО ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИЕЙ**

03.00.13 – физиология

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

Автореферат диссертации на соискание
ученой степени кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2007

Работа выполнена в лаборатории сравнительной физиологии и патологии ЦНС (заведующий – доктор биологических наук И.А. Журавин) Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

Научный руководитель:

Доктор биологических наук,
ЖУРАВИН Игорь Александрович

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук,
профессор, чл.-корр. РАМН,
ОТЕЛЛИН Владимир Александрович

Доктор биологических наук, доцент,
КРАСНОЩЕКОВА Елена Ивановна

Ведущее учреждение:

Институт высшей нервной деятельности
и нейрофизиологии РАН (Москва)

Защита состоится 10 апреля 2007 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.127.01 при Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, по адресу: 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

Автореферат разослан__ марта 2007г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

М.Н. Маслова

1. Общая характеристика работы.

Актуальность проблемы.

Известно, что основные этапы формирования головного мозга млекопитающих происходят в период эмбриогенеза, и воздействие внешних факторов в определённые периоды пренатального развития может приводить к нарушению структурнофункциональной организации мозга и, как результат, вызывать изменение поведенческих реакций в дальнейшем онтогенезе [Dobbing, 1968; Nyakas et al, 1996; Berger-Sweeney, Hohman, 1997; Кассиль и др., 2000; Журавин, 2002; Отеллин и др., 2002; Хожай и др., 2002]. Действительно, у животных, перенесших пренатальное воздействие, выявлено отставание в физиологическом развитии и формировании двигательных реакций, снижение способности к обучению [Nyakas et al, 1996; Дубровская и др., 2002]. Наиболее вероятной причиной таких сдвигов в поведении животных может являться изменение морфофункциональной организации центральной нервной системы, вызываемое нарушением процессов пролиферации и миграции нейробластов тех отделов мозга, которые закладываются во время действия патологического фактора [Rakic, 1982; Журавин и др., 2003, 2005]. Выяснение этих механизмов необходимо для понимания принципов развития нервной системы и может иметь важное прикладное значение для диагностики нарушений пренатального развития мозга, лечения заболеваний у человека, связанных с нейродегенеративными процессами и гибелью нервных клеток [Пальчик, Шабалов, 2001]. Деструктивные воздействия в период эмбриогенеза также повышают риск когнитивных нарушений в постнатальный период [Журавин и др., 2003; Nalivaeva et al, 2004], вплоть до развития социально опасных заболеваний, например, болезни Альцгеймера у человека.

Одним из основополагающих свойств нервной системы, обеспечивающих адекватный поведенческий ответ организма на изменяющиеся условия среды, является её пластичность. Она имеет прямое отношение к обучению и запоминанию у животных. Синаптическая пластичность считается важным условием адаптивных изменений мозга, а также компенсации нарушения функционирования нейронных сетей при нейродегенеративных процессах, вызванных наследственными нарушениями, либо патологическими воздействиями [Segal, 2005]. В настоящее время представление о ведущей роли нейродегенеративных процессов в изменении двигательной активности, когнитивных функций и памяти сменяется концепцией преобладающего значения нарушений формирования нейронных сетей и межклеточных контактов, а также

изменения пластичности нервной ткани в качестве причины этих функциональных нарушений. Таким образом, исследование механизмов пластичности мозга является приоритетным в нейробиологии [Arendt, 2003; Попов и др., 2003]. Однако комплексные исследования формирования отделов головного мозга в онтогенезе при нормальном и изменённом онтогенетическом развитии, в которых анализировались изменения клеточного состава, нарушения формирования нейронных сетей, а также изменения пластичности нервной ткани, проводились редко, и проблема патогенеза развития головного мозга остаётся недостаточно изученной.

Известно, что при патогенезе развития в наибольшей степени страдают отделы конечного мозга, вносящие наиболее существенный вклад в осуществление когнитивных функций. В связи с этим, в настоящей работе приводятся результаты исследования нарушения эмбрионального развития (модель пренатальной гипоксии) новой коры и стриатума, которым принадлежит ведущая роль в осуществлении организации движения и реализации процесса обучения [Толкунов, 1978; Goldman-Rakic, Selemon, 1990; Sharovalova, 1993], а также гиппокамп, являющегося структурной основой способности к запоминанию [Broadbent et al, 2004; Moses et al, 2005].

Цель и задачи исследования.

Цель настоящей работы состояла в изучении особенностей морфофункционального формирования кортикальных отделов конечного мозга (сенсомоторная кора, гиппокамп), в сравнении с развитием стриатума, на разных этапах постнатального онтогенеза крыс после нормального и нарушенного эмбрионального развития.

Для достижения поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

1. изучить двигательную активность и пространственную память взрослых животных, перенесших пренатальную гипоксию, с целью выявления отставленных во времени нарушений поведения;
2. оценить функциональное состояние нервной ткани (в частности, её пластичности) путём сравнительного анализа плотности расположения синаптоподин-позитивных дендритных шипиков в постнатальном онтогенезе контрольных животных и крыс, перенесших пренатальное гипоксическое воздействие, при помощи иммуногистохимического выявления белка шипикового аппарата синаптоподина;
3. провести исследование количественных характеристик клеточного состава и структуры нервной ткани сенсомоторной коры, гиппокампа и дорсолатерального

- стриатума в постнатальном онтогенезе крыс, перенесших пренатальное гипоксическое воздействие в сравнении с контрольными животными;
4. изучить нейродегенеративные процессы в нервной ткани сенсомоторной коры, гиппокампа и стриатума в постнатальном онтогенезе крыс, перенесших пренатальное гипоксическое воздействие;
 5. выполнить иммуногистохимическое исследование экспрессии апоптоз-ассоциированных белков Р53 и каспазы-3 в нервной ткани сенсомоторной коры, гиппокампа и стриатума в постнатальном онтогенезе крыс, перенесших гипоксическое воздействие, в сравнении с контрольными животными, с целью определения механизма гибели клеток.

Научная новизна результатов исследования.

Исследование показало, что воздействие, совпадающее во времени с периодом интенсивной пролиферации и миграции клеточного материала формирующегося отдела мозга, вызывает наиболее выраженные изменения состава и структуры нервной ткани в постнатальном онтогенезе.

Впервые было проведено иммуногистохимическое исследование экспрессии актин-ассоциированного белка шипикового аппарата синаптоподина в нервной ткани животных, перенесших пренатальную гипоксию. Это исследование позволило описать изменения плотности расположения синаптоподин-позитивных шипиков в нейропиле исследованных отделов мозга в раннем онтогенезе крыс при нормальном и нарушенном формировании нервной ткани в эмбриогенезе. Снижение количества синаптоподин-позитивных шипиков в сенсомоторной коре и гиппокампе взрослых животных, перенесших гипоксию, сопровождалось нарушением пространственной памяти.

Автором были впервые привлечены специальные математические методы (кластерный анализ, анализ по методу К-средних) с целью создания размерной классификации клеток нервной ткани, окрашенной по Нисслю. Это первое применение данного метода с целью создания классификации клеток нервной ткани.

Используя комплексный методический подход к изучаемой проблеме (светооптический, гистохимический, морфометрический анализ), автор подробно описывает динамику изменений клеточного состава и плотности расположения клеток разных типов в исследуемых отделах конечного мозга в ходе постнатального онтогенеза. На данной модели пренатального нарушения развития головного мозга были впервые

показаны полиморфизм, различная степень выраженности и гетерохронность наблюдаемых изменений, охватывающих разные клеточные популяции в изучаемых отделах конечного мозга, а также их зависимость от срока проведения гипоксического воздействия.

Было обнаружено, что изменения плотности расположения клеток нервной ткани животных, перенесших пренатальное гипоксическое воздействие, не всегда совпадают с периодами усиления нейродегенеративных процессов. Возможно, это указывает на основную роль нарушения миграции и дифференцировки нейробластов в сокращении нейронной популяции в нервной ткани таких животных в раннем постнатальном онтогенезе.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Количественные и нейродегенеративные изменения в разных отделах конечного мозга животных, перенесших пренатальную гипоксию в определённый момент развития, различны. Проявления последствий деструктивного воздействия максимальны в случае совпадения времени воздействия с критическим периодом развития отдела головного мозга, в частности, с периодом интенсивной пролиферации и миграции нейробластов.
2. Снижение количества и процент гибели клеток относящихся к разным клеточным популяциям у животных, перенесших пренатальное воздействие, неодинаковы.
3. Основным механизмом гибели нейронов в исследуемых отделах конечного мозга животных, перенесших пренатальную гипоксию, является механизм каспаз-зависимого апоптоза.
4. Причины отсроченной гибели и нейродегенерации нейронов в постнатальном онтогенезе животных, перенесших пренатальное воздействие, связаны с нарушениями формирования нейронных сетей и клеточной организации нервной ткани в эмбриогенезе и раннем постнатальном онтогенезе, а не с гибелью клеток в результате гипоксии-реоксигенации.
5. Нейродегенеративные процессы в постнатальном онтогенезе крыс, перенесших пренатальное воздействие, сопровождаются снижением плотности расположения синаптоподин-позитивных дендритных шипиков в нейропиле исследуемых отделов конечного мозга, что может указывать на изменение пластичности нервной ткани. Эти процессы могут являться причиной нарушения памяти у взрослых животных, перенесших пренатальное воздействие.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Полученные данные о количественных различиях состава и структуры нервной ткани отделов конечного мозга контрольных и экспериментальных животных имеют существенное значение для понимания механизмов формирования нервной ткани отделов конечного мозга как в ходе нормального онтогенеза, так и при нарушении эмбрионального развития.

Результаты исследования вносят определённый вклад в представление о том, что изменение citoархитектоники и клеточного состава нервной ткани у животных, перенесших пренатальное воздействие, сопровождается изменением синаптической пластичности.

Полученные данные дополняют наши знания о возможных механизмах нарушения памяти и способности к обучению у животных после пренатального воздействия.

Материалы диссертации могут быть использованы в курсах лекций по онтогенетической нейроморфологии и нейрофизиологии. Кроме того, полученные данные могут быть использованы при разработке методов диагностики нарушений пренатального развития головного мозга и лечения пренатальной патологии.

Апробация работы.

Материалы диссертации были доложены на конференции ИВТН-2004 ("Информационно-вычислительные технологии в решении фундаментальных и прикладных научных задач", Москва, 2004); XIX Конгрессе Физиологического общества им. И.П.Павлова (Екатеринбург, 2004); конференции «Фундаментальные науки – медицине» (Москва, 2004, 2005, 2006); Всероссийской конференции молодых исследователей «Физиология и Медицина», (С.-Петербург, 2005); IX Санкт-Петербургской Ассамблее молодых учёных и специалистов (С.-Петербург, 2005); на конференции «Нейрохимия: Фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2005), Четвертой Российской конференции «Гипоксия: Механизмы, адаптация, коррекция» (Москва, 2005); на I съезде физиологов СНГ, (Сочи, Дагомыс, 2005); на Международном симпозиуме, посвященном 80-летию организации Института физиологии им. И.М. Павлова РАН «Механизмы адаптивного поведения», (С.-Петербург, Колтуши, 2005); на XIII международном совещании по эволюционной физиологии, (С.-Петербург, 2006); V Международной конференции по функциональной нейроморфологии «Колосовские чтения - 2006» (С.-Петербург, 2006); 11-th meeting of Czech and Slovak Neurochemical Society «Molecular basis of neurological and psychiatric disorders», (Martin, Slovak Republic,

2006); Second FENS/IBRO International summer school “Development and Plasticity of the Human Cerebral Cortex”, (Zadar, Zagreb, Croatia, 2005); а также на заседании Отдела эволюции центральной нервной системы ИЭФБ РАН.

Работы поддержаны грантами: РФФИ 02-04-49385; 06-04-48414; программами Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине” и СПбНЦ РАН; а также Персональным грантом для молодых учёных и специалистов Северо-Запада (М04-2.6К-217).

Структура диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методик, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения и основных выводов. Работа изложена на 157 страницах текста, включая 49 рисунков, 5 таблиц и 253 литературных источника.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 18 работ: 3 статьи, 15 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

2. Материалы и методы.

Исследование проводили на крысах-самцах линии Вистар с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Модель пренатальной нормобарической гипоксии. На 13.5-й (период интенсивной пролиферации и миграции нейробластов в сенсомоторной коре и стриатуме) и на 18.5-й (нейрогенез в гиппокампе) дни беременности часть самок (38 животных) подвергали воздействию гипоксии при концентрации кислорода 7% в течение трех часов. Концентрация углекислого газа не превышала 0,1%. Животных контрольной группы (18 самок) держали в камере при тех же условиях, но при нормальной концентрации O₂. Исследование нервной ткани проводили на потомстве контрольных и экспериментальных самок.

Светооптический метод Ниссля. Извлечение мозга у контрольных (36) крыс, и крыс, перенесших гипоксию на E13.5 (43) и на E18.5 (30) производили на 5, 10, 20, 30, 60 и 90-е сутки постнатального развития. В течение месяца нервную ткань фиксировали методом погружения в раствор 10%-го нейтрального формалина на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,4). Фронтальные срезы толщиной 30 мкм изготавливали на санном замораживающем микротоме МС-2 с термоохлаждающим столиком. Срезы окрашивали по

модифицированному методу Ниссля [Журавин и др., 2001].

На светооптическом микроскопе NU-2 (Carl Zeiss, Йена, Германия) было проведено исследование структуры нервной ткани у контрольных и экспериментальных животных. Была изучена нервная ткань сенсомоторной коры на уровне Bregma 0.20 mm по Paxinos, Watson, [1998], дорсолатеральной части стриатума на уровне Bregma 0.20 mm и поля CA1 гиппокампа на уровне Bregma -3.30 mm. Ввод микроизображений срезов мозга в компьютер проводили при помощи аналоговой цветной камеры МТН-413 (АОЗТ Альфа Телеком, СПб, Россия).

Иммуногистохимические методы. Иммуногистохимическое исследование экспрессии проапоптотических белков P53 и каспаза-3, а также белка шипикового аппарата синаптоподина проводили на 651-м срезе от 31 контрольного животного, 672-х срезах от 32 крыс, перенесших гипоксию на E13.5, и 651-м срезе от 31 крысы после гипоксии на E18.5.

Материал фиксировали методом погружения в раствор 10%-го нейтрального формалина на 0,1М фосфатном буфере (pH 7.4) в течение 5-и суток. Фронтальные срезы толщиной 7мкм изготавливали на криостате Leica CM 1510S (Leica Microsystems, Германия).

Для выявления иммунопозитивных клеток использовались моноклональные антитела к P53 (Abcam, разведение 1:400), выработанные в мыши, моноклональные антитела к каспазе-3 (Abcam, разведение 1:500), выработанные в кролике.

Визуализация первичных антител, выработанных в мышах, осуществлялась с помощью FITC-конъюгированных моноклональных вторичных антител против IgG мыши (SIGMA, разведение 1:200), выработанных в козе. Визуализация первичных антител, выработанных в кролике, осуществлялась с помощью моноклональных FITC-конъюгированных вторичных антител против IgG кролика (SIGMA, разведение 1:300), выработанных в козе.

При иммуногистохимическом исследовании актин-ассоциированного белка шипикового аппарата синаптоподина (Deller et al., 2003) использовали моноклональные антитела к этому белку (SIGMA, разведение 1:1000), выработанные в кролике. Визуализация осуществлялась с помощью соответствующих Су3-конъюгированных моноклональных вторичных антител (SIGMA, разведение 1:500).

Проникновение антител сквозь цитоплазматическую мембрану было облегчено с помощью 0,2% раствора Triton X-100 (SIGMA). Срезы инкубировали с первичными моноклональными антителами при комнатной температуре в течение 12 часов, затем в

течение 1-2 часов с соответствующими вторичными антителами и заключали в Mowiol (Leica Microsystems), препятствующий ослаблению флюоресценции.

Окрашенные препараты исследовали на флуоресцентном микроскопе Leica DMR, оборудованном конфокальным сканером Leica TCS SL (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение флюорохромов было вызвано светом Ar/He лазера при длине волны 488нм. Флюоресценцию FITC наблюдали в диапазоне длины волны 496-537нм, флюоресценцию Cy3 – в диапазоне 602-678нм. Для нахождения колокализации проапоптотических белков P53 и каспаза-3 использовались FITC-конъюгированные вторичные антитела против IgG мыши и Cy3-конъюгированные вторичные антитела против IgG кролика. Регистрация изображения осуществлялась двумя независимыми каналами конфокального микроскопа.

Компьютерная морфометрия. Количественные характеристики структуры нервной ткани сенсомоторной коры, дорсального гиппокампа и дорсолатерального стриатума, окрашенной по Нисслию, исследовали с использованием программы анализа изображений “ВидеоТест-Мастер-Морфология” (ООО “ВидеоТест”, СПб, Россия).

В ходе морфометрического анализа проанализировано 712 срезов от 36 контрольных крыс, 866 срезов от 43 животных, подвергшихся гипоксии на E13.5 и 619 срезов от 30 животных, подвергшихся гипоксии на E18.5. Сравнение препаратов нервной ткани сенсомоторной коры, поля CA1 гиппокампа и дорсолатерального стриатума контрольных и экспериментальных животных на 5, 10, 20, 30, 60 и 90-е сутки после рождения проводили по количеству клеток на участке ткани площадью 0,264 мм².

Статистическую обработку данных проводили средствами Statistica for Windows 6.0 (StatSoft Inc). Среднее количество клеток в кадре площадью 0,264 мм² у контрольных и экспериментальных животных сравнивали: контроль – гипоксия на E13.5; контроль – гипоксия на E18.5. Поскольку сравниваемые выборки удовлетворяли условиям нормальности распределения (использован критерий Колмогорова-Смирнова) и равенства генеральных дисперсий, при установлении значимости различий данных, полученных от контрольных и экспериментальных животных, использовали t-критерий Стьюдента. При сравнительном анализе среднего количества нейронов, находящихся в состоянии хроматолиза в области площадью 0,264 мм², проверку значимости различий выборок контрольных и экспериментальных животных проводили при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни. Дегенерирующими считались клетки с выраженным лизисом цитоплазматических органоидов, у которых не окрашивалось более 30% площади профильного поля тела клетки. При сравнении количества иммунопозитивных клеток в

участке нервной ткани площадью $0,057\text{мм}^2$ у контрольных и экспериментальных животных позитивными считались те клетки, яркость свечения которых отличалась от фона на 50%. Характер распределения в выборке исключал возможность применения t-критерия Стьюдента, поэтому использовался непараметрический критерий Манна-Уитни.

Создание размерной классификации клеток при помощи кластерного анализа.

Классификация клеток нервной ткани, окрашенной по Нисслю, необходимая для проведения количественного сравнительного анализа, потребовала привлечения специальных математических методов. При помощи пакета статистических программ "Statistica for Windows 6.0" (StatSoft.inc) был проведён кластерный анализ количественных характеристик клеток в нервной ткани контрольных животных. При создании классификации клеток использовались два критерия: площадь профильного поля тела клетки и его удлиненность (соотношение наиболее длинной и короткой оси профильного поля тела клетки, выраженное в условных единицах). При проведении кластерного анализа был использован метод Варда, а в качестве меры дистанции между кластерами выбран квадрат евклидова расстояния [Ward, 1963]. Дополнительно был проведён анализ по методу К-средних [Hartigan, 1978], позволяющий найти статистически достоверные границы этих классов. На основании результатов кластерного анализа 8000 клеток сенсомоторной коры, 2500 клеток дорсального гиппокампа, 7500 клеток дорсолатерального стриатума были разработаны классификации клеток для контрольных крыс на 5, 10, 20, 30, 60 и 90-е сутки постнатального развития, которые были использованы при проведении морфометрического анализа.

Локомоция в "открытом поле". Двигательную активность взрослых животных оценивали по количеству пересеченных квадратов в открытом поле размером 100x100 см со стенками высотой 40 см. Пол камеры образован толстой пластиной плексигласа, расчерченной с нижней стороны на 25 квадратов (20x20 см). После тестирования каждого животного пол камеры протирали 50% раствором этилового спирта. Локомоторную активность животного оценивали по количеству квадратов, пересечённых в течение 10 минут. Результаты сравнивали по критерию Манна-Уитни: контроль - гипоксия на E13.5; контроль - гипоксия на E18.5. Каждая группа животных состояла из 17 крыс.

Исследование поведения животных в двухуровневом восьмилучевом лабиринте. Эксперименты выполнялись летом, ежедневно при нормальном дневном освещении, при температуре 20-22⁰С. Исследование было проведено на 15 взрослых контрольных животных, 17 крысах, перенесших гипоксию на E13.5, и 15 крысах,

перенесших гипоксию на E18.5. Перед началом эксперимента каждое животное подвергалось пищевой депривации в течение 3 суток; масса животного поддерживалась на уровне 85% от изначального веса. Общий принцип конструкции установки и проведения эксперимента соответствовал модифицированной методике, описанной у Буреша и соавторов [1991]. Крыса выполняла 8 посещений кормушек, располагавшихся в конце каждого луча лабиринта. Повторное посещение луча лабиринта считали ошибочным. Для оценки способности к ориентации вычисляли процент правильных посещений. Всего было проведено 22 эксперимента. Результаты, полученные на животных контрольной и экспериментальных групп сравнивали: контроль – гипоксия на E13.5; контроль – гипоксия на E18.5, используя непараметрический критерий Манна-Уитни.

3. Результаты исследования и их обсуждение.

Исследование поведения животных в открытом поле. Взрослые крысы, перенесшие пренатальную гипоксию, имели такой же вес (на E13.5 – $245,38 \pm 3,44$ г, на E18.5 – $248,24 \pm 9,37$ г), что и контрольные животные ($242,50 \pm 6,28$ г). Локомоторная активность в открытом поле у крыс, перенесших гипоксию на E13.5 ($27,56 \pm 4,19$) и E18.5 ($29,52 \pm 2,81$), не отличалась ($p < 0,05$) от активности контрольных животных ($28,20 \pm 4,63$), что свидетельствует об отсутствии влияния пренатальной гипоксии на двигательную активность взрослых животных.

Полученные данные о том, что у взрослых крыс из контрольной группы и крыс, перенесших пренатальную гипоксию (на E13.5 и E18.5), отсутствовали различия по массе тела и локомоторной активности, согласуются с результатами комплексного исследования физиологического развития и поведения животных, подвергнутых пренатальной гипоксии проведённого Н.М. Дубровской [Дубровская и др., 2002; Журавин и др., 2003]. У таких животных происходит нарушение двигательной активности, манипуляторной деятельности и некоторых позно-тонических рефлексов в течение первого месяца постнатального онтогенеза. К третьему месяцу различия между контрольными и экспериментальными животными не выявляются [Дубровская и др., 2002; Журавин и др., 2003, 2005].

Исследование поведения животных в двухуровневом восьмилучевом лабиринте. Было показано, что количество ошибочных побегов у крыс, перенесших гипоксию на E13.5 ($18,5 \pm 1,19\%$), как и в случае гипоксии на E18.5 ($18,1 \pm 1,27\%$), было выше ($p < 0,001$) чем у контрольных животных ($11,8 \pm 1,17\%$). Статистически значимого

различия между группами крыс, перенесших гипоксию в разные сроки эмбриогенеза, обнаружено не было (рис. 1). Таким образом, количество ошибок у взрослых крыс, перенесших пренатальную гипоксию, выше, чем у контрольных животных. Принимая во внимание отсутствие различий в двигательной активности взрослых животных в открытом поле, можно предположить, что различие между взрослыми контрольными и экспериментальными крысами, выявленное при помощи теста в восьмилучевом лабиринте, свидетельствует о нарушении пространственной памяти. Причиной подобных нарушений может быть изменение морфофункциональной организации нервной ткани головного мозга, прежде всего таких его отделов, как кора больших полушарий и гиппокамп.

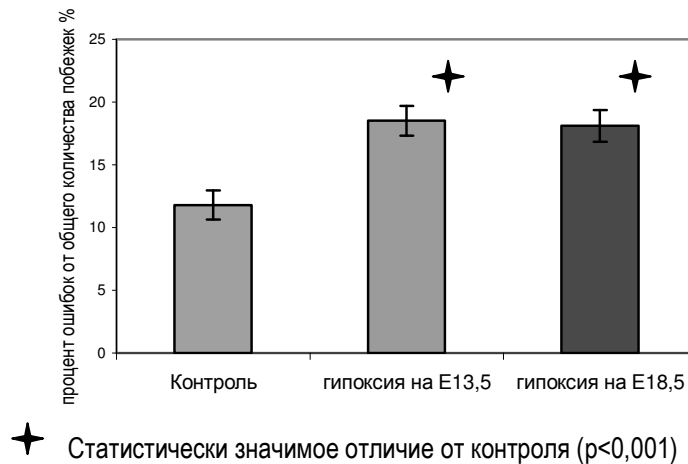
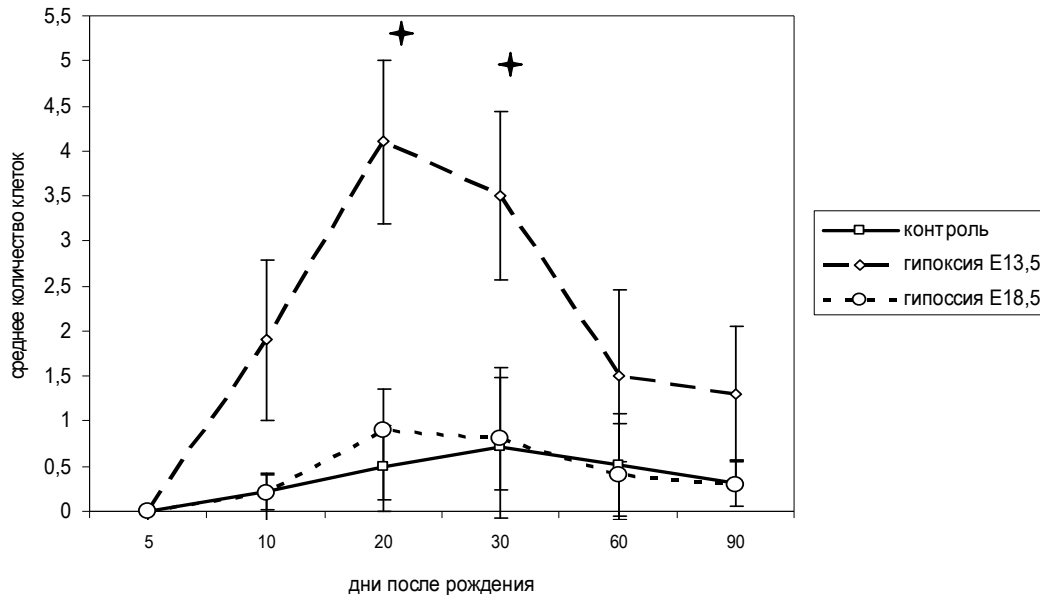


Рис. 1 Процент ошибочных повторных посещений рукавов лабиринта у контрольных крыс возрастом 1 год и крыс, перенесших пренатальную гипоксию на E13.5 и E18.5.

Нейродегенеративные процессы в нервной ткани сенсомоторной коры, гиппокампа и стриатума. На протяжении первого месяца постнатального онтогенеза в сенсомоторной коре крыс, перенесших гипоксию на E13.5, наблюдалось увеличение количества клеток, дегенерировавших по типу хроматолиза, в сравнении с контролем. Такие клетки характеризовались набуханием тел и отростков, появлением неокрашенных областей цитоплазмы. Большую часть таких клеток составляли крупные пирамидные нейроны V слоя и малые пирамидные нейроны II-III слоёв. Максимальные изменения наблюдались на 20-е сутки, тогда как к концу второго месяца постнатального онтогенеза

различия между контрольными и экспериментальными животными не выявлены. У крыс, перенесших гипоксию на E18.5, статистически значимых изменений выявить не удалось (рис. 2).



✦ - статистически значимые различия ($p < 0,05$)

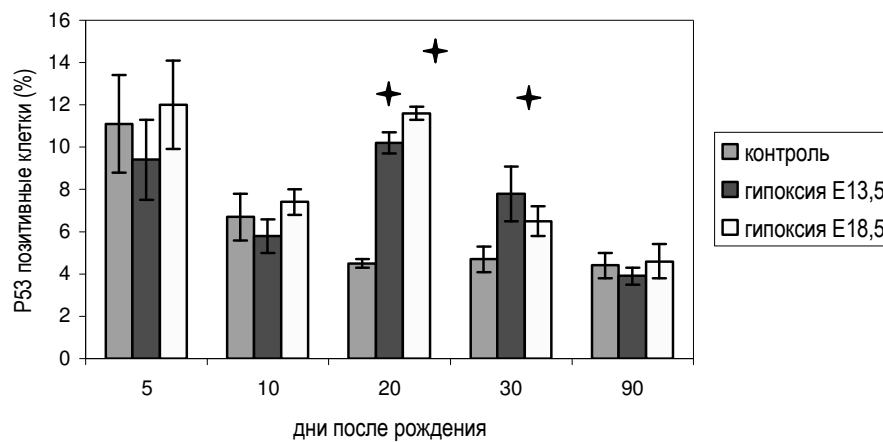
Рис. 2 Среднее количество дегенерирующих клеток на участке, площадью $0,264\text{мм}^2$ нервной ткани сенсомоторной коры контрольных животных и крыс, перенесших гипоксию на E13.5 и E18.5.

У животных, перенесших гипоксию на E13.5, дегенеративные изменения в нервной ткани поля CA1 гиппокампа были выражены в меньшей степени, чем в сенсомоторной коре. Статистически значимого увеличения количества клеток, дегенерирующих по типу хроматолиза, выявить не удалось. Дегенеративным изменениям были подвержены преимущественно большие пирамидные нейроны слоя *stratum pyramidale*.

На протяжении первого месяца постнатального онтогенеза в нервной ткани дорсолатерального стриатума крыс, перенесших гипоксию на E13.5, в сравнении с контролем наблюдалось увеличение количества клеток, дегенерировавших по типу хроматолиза. Большую часть таких клеток составляли крупные нейроны. Максимальные изменения происходили на 20-е сутки, к концу второго месяца постнатального онтогенеза различия между контрольными и экспериментальными животными не наблюдались. У

крыс, перенесших гипоксию на E18.5, изменений выявить не удалось. Гипоксическое воздействие на E13.5 совпадает с периодом интенсивной пролиферации и миграции клеток в коре и стриатуме мозга крыс, что может быть причиной изменения клеточного состава и структуры нервной ткани в этих отделах в раннем постнатальном онтогенезе. К E18.5 интенсивность пролиферации и миграции нейробластов в коре и стриатуме снижается, поэтому гипоксия в этот период не влечёт за собой значительных изменений структурной организации нервной ткани в постнатальном онтогенезе.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии апоптоз-ассоциированных белков в нервной ткани. Нейродегенерация, наблюдаемая в сенсомоторной коре, в поле CA1 аммонова рога и в дорсолатеральном стриатуме животных, подвергнутых действию пренатальной гипоксии, сопровождалась повышением количества клеток, экспрессирующих проапоптотические белки P53 и каспаза-3. Максимальное количество дегенерирующих нейронов и клеток, экспрессирующих проапоптотические белки, в исследованных отделах мозга у крыс после гипоксии на E13.5 наблюдалось на 20-30-е сутки после рождения (рис. 3).



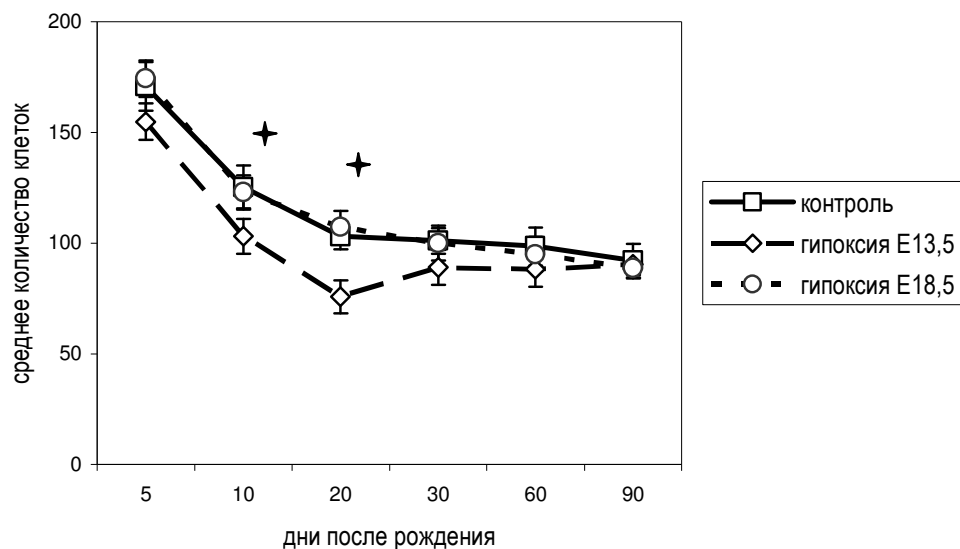
✦ - статистически значимые различия ($p < 0,05$)

Рис. 3 Процентное соотношение P53 позитивных клеток и общего количества клеток в нервной ткани поля CA1 аммонова рога мозга контрольных животных и крыс, перенесших гипоксию на E13.5 и E18.5

В гиппокампе подобные изменения наблюдались и у крыс, перенесших гипоксию на E18,5. Полученные данные указывают на то, что основным механизмом наблюдавшейся гибели клеток являлся каспаз-зависимый апоптоз.

Крупные пирамидные нейроны сенсомоторной коры и аммонова рога, а также гигантские (длинноаксонные) мультиполярные нейроны стриатума составляли большую часть клеток, дегенерирующих по типу хроматолиза, и клеток, экспрессирующих белки Р53 и каспаза-3. Таким образом, разные клеточные популяции оказались в разной степени подвержены действию пренатальной гипоксии.

Изменения клеточного состава и общей плотности расположения клеток у животных, перенесших пренатальное гипоксическое воздействие. С помощью кластерного анализа в сенсомоторной коре контрольных животных было выявлено четыре класса клеток, соответствующих малым (глиальные) и крупным непиримидным, а также малым и большим пирамидным. На протяжении первого месяца постнатального онтогенеза у крыс, перенесших гипоксию на E13.5, наблюдалось снижение общей плотности расположения клеток в сенсомоторной коре (рис. 4), происходило уменьшение количества больших пирамидных нейронов (V слой), а также больших непиримидных и малых пирамидных нейронов (II-III слои) в сравнении с контролем (табл.1).



✦ - статистически значимые различия ($p < 0,05$)

Рис. 4 Среднее количество клеток на участке, площадью $0,264\text{мм}^2$ нервной ткани сенсомоторной коры контрольных животных и крыс, перенесших гипоксию на E13.5 и E18.5.

классы клеток	Возраст животных (сутки постнатального онтогенеза)									
	5		10		20		30	60	90	
	границы классов мкм ²	%	границы классов мкм ²	%	границы классов мкм ²	%	%	%	%	
Малые непиримидные	<30	3,6	<30	-1,7	<30	0,5	-9,1	-2,3	-11,1	
Большие непиримидные	30-64	-3,1	30-60	4,3	30-68	18,2 *	15,7 *	7,3	6,2	
Малые пирамидные	30-85	0,8	30-85	7,2	30-85	15,9 *	10,4 *	5,9	4,2	
Большие пирамидные	>85	5,5	>85	32,5*	>85	27,4*	9,3	-0,6	2,1	
все клетки		14,9		27,4*		40,8*	7,1	5,3	2,1	

Таблица 1. Уменьшение (%) среднего количества клеток различных классов на участке нервной ткани, площадью 0,264мм² сенсомоторной коры мозга крыс, перенесших гипоксию на E13.5, в сравнении с контрольными животными.

* - статистически значимые различия между контрольными и экспериментальными животными ($p < 0,05$)

Максимальные изменения у крыс, перенесших гипоксию на E13.5 происходили на 20-е сутки постнатального онтогенеза. К концу второго месяца различия между контрольными и экспериментальными животными выявлены не были. У крыс, перенесших гипоксию на E18.5, подобные изменения выявить не удалось.

На 20-е сутки постнатального онтогенеза у крыс, перенесших гипоксию на E13.5 и E18.5, наблюдалось снижение плотности расположения клеток в поле CA1 аммонова рога, а также снижение количества больших пирамидных нейронов в слое stratum pyramidale по сравнению с контролем.

С помощью кластерного анализа в нервной ткани дорсолатерального стриатума было выделено 4 класса клеток: глиальные элементы, два класса нейронов среднего размера и крупные нейроны. Морфометрическое исследование показало, что гипоксическое воздействие на E13.5 привело к изменению количественного соотношения клеток разных классов в нервной ткани дорсолатерального стриатума. В раннем онтогенезе происходили дегенерация и уменьшение количества крупных (длинноаксонных) нейронов, тогда как начиная с 20-х суток после рождения, подобные изменения затрагивали преимущественно нейроны средних размеров (табл.2).

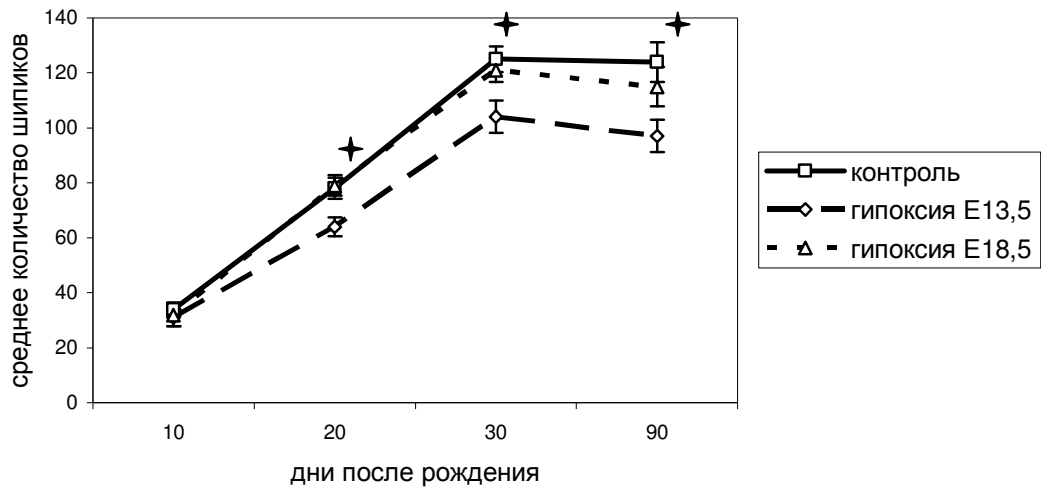
классы клеток	Возраст животных (сутки постнатального онтогенеза)								
	5		10		20		30	60	90
	границы классов мкм ²	%	границы классов мкм ²	%	границы классов мкм ²	%	%	%	%
Мелкие клетки	<30	6,4	<30	6,1	<30	0,9	2,1	3,2	11,5
Средние малые	30-55	9,2	30-65	5,5	30-68	13,9 *	9,5	6,8	29,0 *
Средние большие	55-80	34,2 *	65-90	12,7	68-95	15,2 *	15,0 *	5,5	0,4
Крупные	>80	42,3 *	>90	14,2 *	>95	6,5	6,4	0,3	-0,1
все клетки		17,9 *		5,9 *		8,5*	5,7	5,2	13,0 *

Таблица 2. Уменьшение (%) среднего количества клеток различных классов на участке нервной ткани, площадью 0,264мм² дорсолатерального стриатума мозга крыс, перенесших гипоксию на E13.5, в сравнении с контрольными животными.

* - статистически значимые различия между контрольными и экспериментальными животными ($p < 0,05$)

Во всех исследованных отделах конечного мозга к концу второго месяца постнатального онтогенеза наблюдалось уменьшение количества клеток, подвергавшихся нейродегенерации и апоптотической гибели. Различия в плотности расположения клеток у животных, перенесших гипоксию на E13.5, наблюдаемые на более ранних сроках, к 60-м суткам также не были выявлены.

Иммуногистохимическое исследование актин-ассоциированного белка шипикового аппарата синаптоподина позволило оценить среднюю плотность расположения синаптоподин-позитивных дендритных шипиков в нейропиле различных слоёв сенсомоторной коры у контрольных и экспериментальных животных. Начиная с 20-х суток постнатального онтогенеза, у животных, перенесших гипоксию на E13.5, было обнаружено статистически значимое снижение средней плотности расположения синаптоподин-позитивных дендритных шипиков в I-ом (молекулярном) слое сенсомоторной коры в сравнении с контролем. Различие это сохранялось на 30-е и 90-е сутки (рис. 5).



✦ - статистически значимые различия ($p < 0,05$).

Рис. 5 Среднее количество синаптоподин-позитивных шипиков в области площадью $0,057\text{мм}^2$ нейропиля I-го слоя сенсомоторной коры мозга контрольных животных и крыс перенесших гипоксию на E13.5 и E18.5.

Начиная с 30 суток постнатального онтогенеза, у животных, перенесших гипоксию на E13.5 и E18.5, было отмечено статистически значимое снижение плотности расположения дендритных шипиков в слое stratum radiatum-moleculare гиппокампа в сравнении с контролем. Различие между контрольными животными и крысами, перенесшими гипоксию, увеличивалось от 30-х к 90-м суткам, максимальное различие наблюдалось у взрослых животных. Статистически значимых различий в количестве синаптоподин-позитивных шипиков в нейропиле стриатума между контрольными и экспериментальными животными выявить не удалось.

Полученные данные о снижении количества синаптоподин-позитивных шипиков в сенсомоторной коре и дорсальном гиппокампе крыс, перенесших гипоксию на E13.5, согласуются с данными, полученными В.А. Акулиным и соавторами [Акулинин и др., 2002], которые описывали снижение плотности расположения шипиков на апикальных дендритах пирамидных нейронов гиппокампа у животных, перенесших ишемию. Авторы связывали уменьшение количества шипиков с наблюдавшейся ими дегенерацией дендритов таких нейронов. Однако другие исследователи [Arendt, 2003] объясняют это явление ретракцией шипиков и снижением пластичности. В последнее время актин-

ассоциированный белок шипикового аппарата синаптоподин связывают с обеспечением пластичности за счёт перестройки цитоскелета шипика [Deller et al, 2003; Asanuma et al, 2005]. Можно предположить, что снижение числа шипиков, в которых локализован этот белок, указывает на изменение пластичности нервной ткани. Причинами уменьшения количества синаптоподин-позитивных шипиков в постнатальном онтогенезе животных, перенесших гипоксию, могут являться как нарушение формирования нервной ткани в эмбриогенезе, так и изменение клеточного состава и нейродегенерация в раннем постнатальном онтогенезе.

4. Заключение.

Результаты изучения поведения взрослых крыс в радиальном восьмилучевом лабиринте показали нарушение пространственной памяти у животных, перенесших пренатальное воздействие в сравнении с контролем, вне зависимости от срока проведения этого воздействия.

Полученные данные подтверждают предположение о том, что проявления последствий деструктивного воздействия максимальны в случае совпадения времени воздействия с периодом интенсивной пролиферации и миграции нейробластов. Так, у крыс, перенесших пренатальное воздействие на E13.5, происходит массовая нейродегенерация и гибель нейронов сенсомоторной коры и стриатума. Гипоксия на E18.5 не вызывала нейродегенерацию и массовую апоптотическую гибель нейронов в этих отделах.

Разные клеточные популяции оказались в разной степени подвержены действию пренатальной гипоксии. Крупные пирамидные нейроны сенсомоторной коры и аммонова рога и крупные мультиполярные нейроны стриатума составляли большую часть клеток, дегенерирующих по типу хроматолиза и клеток, экспрессирующих белки P53 и каспаза-3. Таким образом, снижение количества и гибель клеток у животных, перенесших пренатальное воздействие, могут быть объяснены нарушением образования и миграции определённых групп нейробластов в период проведения воздействия.

Полученные данные свидетельствуют о том, что основным механизмом наблюдаемой гибели нейронов в сенсомоторной коре, поле CA1 гиппокампа и дорсолатеральном стриатуме животных, перенесших гипоксию на E13.5, является каспаз-зависимый апоптоз.

Иммуногистохимическое исследование распределения актин-ассоциированного

белка шипикового аппарата синаптоподина показало статистически значимое снижение плотности расположения синаптоподин-позитивных шипиков в нейропиле I-го слоя сенсомоторной коры и слоя stratum radiatum-moleculare гиппокампа у животных, перенесших гипоксию на E13.5 в сравнении с контролем. Это указывает на нарушение формирования нейрональных сетей и возможно, на изменение пластичности нервной ткани.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что причиной изменения поведения у животных, перенесших пренатальное воздействие, является нарушение формирования нервной ткани сенсомоторной коры, стриатума и гиппокампа в ходе пренатального – раннего постнатального онтогенеза. Снижение способности к запоминанию у животных может быть обусловлено изменением структуры нейронных сетей в кортикальных отделах конечного мозга.

Выводы.

1. В нервной ткани сенсомоторной коры, поля CA1 гиппокампа и дорсолатерального стриатума животных, перенесших гипоксию на E13.5, происходит увеличение количества нейронов, дегенерирующих по типу хроматолиза в сравнении с контролем, на протяжении первого месяца постнатального онтогенеза. Максимальное количество таких клеток наблюдается на 20 – 30-е сутки после рождения
2. Наблюдаемая нейродегенерация в исследуемых отделах мозга животных, перенесших гипоксию на E13.5, сопровождается увеличением количества клеток, с повышенной экспрессией проапоптотических белков P53 и каспаза-3. Это, по-видимому, указывает на гибель дегенерирующих нейронов по механизму каспаз-зависимого апоптоза.
3. В течение первого месяца постнатального онтогенеза у животных, перенесших гипоксию на E13.5, происходит снижение общей плотности расположения клеток в нервной ткани сенсомоторной коры, поля CA1 гиппокампа и дорсолатерального стриатума. Максимальное снижение плотности расположения клеток наблюдается на 20 – 30-е сутки после рождения, что связано с гибелью клеток в этот период. Снижение общей плотности расположения клеток у крыс, перенесших гипоксию на E13.5, сопровождается уменьшением количества крупных пирамидных нейронов сенсомоторной коры и дорсального гиппокампа, а также крупных нейронов в

дорсолатеральном стриатуме.

4. Разные клеточные популяции развивающегося мозга в разной степени подвержены воздействию пренатальной гипоксии. Выделенные с помощью кластерного анализа крупные пирамидные нейроны сенсомоторной коры, а также крупные мультиполярные нейроны в дорсолатеральном стриатуме, интенсивная пролиферация и миграция которых происходят на E13.5, составляют основную часть клеток, дегенерирующих по типу хроматолиза, а также клеток с повышенной экспрессией проапоптотических белков.
5. У животных, перенесших гипоксию на E13.5, дегенеративные изменения и интенсивная апоптотическая гибель нейронов в сенсомоторной коре и стриатуме были выражены сильнее, чем в дорсальном гиппокампе. У крыс, перенесших гипоксию на E18.5, не выявлено изменение состава и структуры нервной ткани в исследуемых отделах конечного мозга. Это подтверждает гипотезу о зависимости последствий пренатального воздействия на формирование отдела головного мозга от времени проведения данного воздействия.
6. К концу второго месяца постнатального онтогенеза различия в общей плотности расположения клеток, а также в количестве дегенерирующих нейронов и клеток с повышенной экспрессией проапоптотических белков, между контрольными животными и крысами, перенесшими гипоксию на E13.5, не выявлены.
7. Иммуногистохимическое исследование актин-ассоциированного белка шипикового аппарата синаптоподина показало статистически значимое снижение плотности расположения синаптоподин-позитивных шипиков в нейропиле I-го слоя сенсомоторной коры и слоя *stratum radiatum-moleculare* гиппокампа у животных, перенесших гипоксию на E13.5 (а также E18.5 в случае гиппокампа), в сравнении с контролем. Эти различия сохраняются и у взрослых животных. Уменьшение количества синаптоподин-позитивных шипиков может указывать на снижение пластичности нервной ткани мозга крыс, перенесших пренатальное воздействие.
8. Исследование поведения в радиальном лабиринте взрослых крыс, перенесших пренатальное гипоксическое воздействие, выявило у них нарушение пространственной памяти, в сравнении с контролем.
9. Изменения клеточного состава, плотности расположения клеток, увеличение количества дегенерирующих и гибнущих по механизму апоптоза нейронов в нервной ткани исследуемых отделов конечного мозга, а также предполагаемое снижение

пластичности неокортекса и гиппокампа свидетельствуют о комплексных, специфических для каждого отдела нарушениях формирования нервной ткани сенсомоторной коры, стриатума и гиппокампа в постнатальном онтогенезе крыс, перенесших пренатальное воздействие. Это может являться причиной снижения способности к запоминанию у взрослых животных.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации.

1. Журавин И.А., **Васильев Д.С.**, Туманова Н.Л., Белостоцкая Г.Б., Попов А.А. Морфометрический и кластерный анализ клеточного состава базальных ганглиев мозга крыс в раннем онтогенезе // Сборник материалов конференции ИВТН-2004 "Информационно-вычислительные технологии в решении фундаментальных и прикладных научных задач". Москва. 2004. С. 46.
2. **Васильев Д.С.**, Туманова Н.Л., Озирская Е.В., Журавин И.А. Пренатальная гипоксия нарушает формирование нервной ткани базальных ганглиев мозга в онтогенезе крысы // Российский физиол. журн. им. И.М.Сеченова. Екатеринбург. 2004. Т. 90. № 8. С. 159-160.
3. Журавин И.А., Наливаева Н.Н., Плеснева С.А., Туманова Н.Л., **Васильев Д.С.**, Дубровская Н.М., Кочкина Е.Г., Баллюзек М.Ф., Самус Н.Л., Анисимов В.П., Fisk L., Turner A.J. Исследования действия острой и хронической гипоксии на процессы старения мозга и развитие болезни Альцгеймера // Материалы конференции «Фундаментальные науки – медицине», Москва. 2004. С. 13-15.
4. **Васильев Д.С.** Структурные изменения нервной ткани базальных ганглиев мозга в раннем онтогенезе крыс после пренатальной гипоксии // Вестник молодых ученых. Серия: Науки о жизни. 2004. С. 26-31.
5. **Васильев Д.С.** Роль условий эмбрионального развития в формировании базальных ганглиев мозга в онтогенезе крыс. // Девятая Санкт-Петербургская Ассамблея молодых учёных и специалистов. Аннотации работ по грантам Санкт-Петербургского конкурса 2004 года для молодых учёных и специалистов. СПб., 2004. С. 29-30.
6. Журавин И.А., Туманова Н.Л., Озирская Е.В., **Васильев Д.С.**, Дубровская Н.М. Формирование структурной и ультраструктурной организации стриатума в раннем постнатальном онтогенезе крыс при изменении условий их эмбрионального развития // Морфология. 2005. Т. 127. №2. С.31-36.
7. Журавин И.А., Наливаева Н.Н., Плеснева С.А., Дубровская Н.М., **Васильев Д.С.**, Туманова Н.Л., Turner A.J. Формирование клеточных механизмов обучения и памяти в онтогенезе млекопитающих зависит от условий эмбрионального развития // Нейрохимия: Фундаментальные и прикладные аспекты. Москва. 2005. С. 14.
8. Журавин И.А., **Васильев Д.С.**, Дубровская Н.М., Кочкина Е.Г., Наливаева Н.Н., Плеснева С.А., Туманова Н.Л., Turner A.J. Гипоксия в период эмбриогенеза приводит к нейродегенеративным процессам и нарушению когнитивных функций мозга // Четвертая Российская конференция «Гипоксия: Механизмы, адаптация, коррекция», Москва. 2005. С. 45.

9. Журавин И.А., **Васильев Д.С.**, Дубровская Н.М., Кочкина Е.Г., Наливаева Н.Н., Плеснева С.А., Туманова Н.Л., Turner A.J. Гипоксия в период эмбриогенеза нарушает формирование структуры нервной ткани, метаболизм предшественника амилоидного пептида и когнитивные функции мозга в постнатальном онтогенезе // Научные труды I съезда физиологов СНГ. Сочи, Дагомыс. 2005. Т.1. С. 165.
10. **Васильев Д.С.** Нейродегенерация в ткани мозга крыс после пренатальной гипоксии. // Всероссийская конференция молодых исследователей «Физиология и Медицина», Санкт-Петербург. 2005. С. 29-30.
11. **Vasilyev D.S.** Early postnatal changes in the tissue structure of rat forebrain after prenatal hypoxia // Second FENS/IBRO Internat. summer school "Development and Plasticity of the Human Cerebral Cortex". 2005. P. 55.
12. Журавин И.А., Наливаева Н.Н., Плеснева С.А., Туманова Н.Л., **Васильев Д.С.**, Дубровская Н.М., Кочкина Е.Г., Баллюзек М.Ф., Самус Н.Л., Анисимов В.П., Fisk L., Turner A.J. Исследования действия острой и хронической гипоксии на развитие деменции и болезни Альцгеймера – новый взгляд на метаболизм амилоидного пептида, методы диагностики и лечения // Материалы конференции «Фундаментальные науки – медицине», Москва. 2005. С. 14-16.
13. Журавин И.А., **Васильев Д.С.**, Дубровская Н.М., Кочкина Е.Г., Наливаева Н.Н., Плеснева С.А., Туманова Н.Л., Turner A.J. Гипоксия в период эмбриогенеза нарушает формирование когнитивных функций мозга в онтогенезе млекопитающих // Международный симпозиум, посвященный 80-летию организации Института физиологии им. И.М. Павлова РАН: «Механизмы адаптивного поведения». Санкт-Петербург. - Колтуши 2005. С. 32-33.
14. Туманова Н.Л., **Васильев Д.С.**, Журавин И.А. Исследование нейродегенеративных процессов в кортикальных структурах мозга крыс после пренатальной гипоксии // Тезисы докладов XIII Международного совещания по эволюционной физиологии. 2006. С. 215-216.
15. Журавин И.А., Туманова Н.Л., **Васильев Д.С.**, Дубровская Н.М. Нейродегенеративные процессы в мозге крыс, перенесших пренатальную гипоксию // V Международная конференция по функциональной нейроморфологии «Колосовские чтения - 2006». Т. 129. №2. С. 39-40.
16. Журавин И.А., Туманова Н.Л., Озирская Е.В., **Васильев Д.С.**, Дубровская Н.М. Формирование структурной и ультраструктурной организации стриатума в постнатальном онтогенезе крыс при изменении условий их эмбрионального развития // Журнал эволюц. биох. физиол. 2007. Т.43. №2. С. 85-93.
17. Zhuravin I.A., **Vasilyev D.S.**, Dubrovskaya N.M., Kochkina E.G., Plesneva S.A., Tumanova N.L., Turner A.J., Nalivaeva N.N. Prenatal hypoxia affects metabolism of amyloid precursor protein and formation of cognitive functions in postnatal ontogenesis of rats // Program and abstracts 11 th meeting «Molecular basis of neurological and psychiatric disorders». Martin. Slovak Republic. 2006, P. 111.
18. Журавин И.А., Наливаева Н.Н., Плеснева С.А., Туманова Н.Л., **Васильев Д.С.**, Дубровская Н.М., Кочкина Е.Г., Баллюзек М.Ф., Самус Н.Л., Fisk L., Turner A.J. Исследование действия гипоксии на развитие нейродегенеративных процессов в мозге, повышающих риск возникновения деменции и болезни Альцгеймера – новый взгляд на метаболизм амилоидного пептида и поиск методов ранней диагностики // Материалы конференции «Фундаментальные науки – медицине». М. 2006. С. 17-19