

На правах рукописи

Дубровская Надежда Михайловна

**РАЗВИТИЕ ДВИГАТЕЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ В ОНТОГЕНЕЗЕ КРЫС,
ПЕРЕНЕСШИХ ГИПОКСИЮ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ЭМБРИОГЕНЕЗА**

03.00.13 – физиология

Автореферат диссертации на соискание
учёной 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 биологических наук,
академик РАО, профессор,
БАТУЕВ Александр Сергеевич

Доктор медицинских наук, профессор,
ТОЛКУНОВ Борис Федорович

Ведущее учреждение:

Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН

Защита состоится 29 мая 2007 года в 13 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__ апреля 2007г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

М.Н.Маслова

1. Общая характеристика работы

Актуальность проблемы.

Несмотря на обширный литературный материал (Tilney, 1933; Altman, Sudarshan, 1975; Kostovic et al., 1995; Massion, 1998; Muir, 2000; и др.), посвященный развитию двигательного поведения человека и животных, вопрос о роли наиболее важных возрастных периодов в формировании и развитии центральных механизмов двигательной активности остается весьма актуальным. Значение таких периодов для индивидуального развития организмов в целом было изучено и описано П.Г.Светловым (1978). Он отмечал наиболее частую гибель зародышей после действия неблагоприятных факторов в период, предшествующий имплантации зародыша в стенку матки, а также возникновение различных патологий при воздействиях во время формирования зачатков органов. Дж. Доббингом (Dobbing, 1968) была высказана гипотеза о существовании повышенной чувствительности мозга к действию неблагоприятных факторов в периоды его наиболее интенсивного роста. В литературе описаны критические периоды влияния внешних факторов на мозг, как в пренатальном, так и в постнатальном онтогенезе (Dickerson et al., 1967; Дмитриева, 1971; Dobbing, Sands, 1973; Кассиль и др., 2000; Отеллин и др., 2007). Однако механизмы возникновения патологии развития, без знания которых невозможна разработка профилактики и коррекции соматических и ментальных нарушений, пока еще недостаточно изучены.

В медицинской практике отклонения в развитии нервной системы детей наиболее часто сопряжены с недостатком кислорода во время внутриутробного развития. Пренатальная гипоксия может быть вызвана нарушением плодно-плацентарного потока, заболеваниями беременной женщины или плода, а также внешними условиями, зависящими от состояния окружающей среды (Nyakas et al., 1996). Гипоксические повреждения эмбрионального мозга могут приводить к гибели или увеличивать риск возникновения психических и нейродегенеративных заболеваний с возрастом (Пальчик, Шабалов, 2001; Cannon et al., 2002).

Механизмы действия гипоксии на клетки организма изучены достаточно хорошо. В результате гипоксического воздействия изменяется нормальный баланс нейромедиаторов (глутамата, дофамина, серотонина, ацетилхолина и др.) и продуктов их обмена в особо чувствительных структурах мозга (Nyakas et al., 1996; Trotti et al., 1998; Lipton 1999; Самойлов, 1999) или нарушаются структурно-функциональные свойства клеточных мембран, что само по себе может приводить к гибели клеток (Наливаева и др., 1998; Самойлов, 1999; Mishra, Delivoria-Papadopoulou, 1999; Boutilier, St-Pierre, 2000). Кроме того, гипоксия изменяет работу

генетического аппарата клетки (Gleadle, Ratcliffe, 1998) и может инициировать транскрипцию специфических генов, ответственных за программируемую гибель клетки (Mishra, Delivoria-Papadopoulos, 1999; Mu et al., 1999). При этом патологические изменения в ЦНС зависят от длительности гипоксического воздействия и от этапа онтогенетического развития ЦНС, на котором это воздействие применялось (Кассиль и др., 2000; Журавин, 2000, 2002).

В нашем исследовании были выбраны два срока воздействия острой гипоксии на самок крыс во время беременности: 13,5-й день, относящийся к предплодному (эмбриональному) периоду, когда в головном мозге активно протекают основные гистогенетические процессы (деление клеток и их миграция), и 18,5-й день, относящийся к плодному (постимплантационному) периоду, когда уровень пролиферации клеток в мозге снижается и ускоряются процессы их созревания и дифференцировки (Волохов, 1968; Резников, 1974).

Центральные механизмы регуляции двигательной активности животных в значительной степени определяются функциональными свойствами сенсомоторных структур мозга, к которым относятся кора больших полушарий и стриатум (Иоффе, 1975; 1991; Батуев, Таиров, 1978; Толкунов 1978, 2002; Шаповалова, 1993). Именно эти структуры страдают в первую очередь при недостатке кислорода в крови как развивающихся, так и взрослых животных (Самойлов, 1985; Burke, Vaimbridge, 1993; Nyakas et al., 1996; Jansen, Low, 1996; Schwab et al., 1997; Piantadosi et al., 1997; Журавин и др., 2000-2004). В проведенном в нашей лаборатории комплексном исследовании с применением поведенческих, морфологических и биохимических методов было обнаружено, что пренатальная гипоксия приводит к значительным деструктивным изменениям нервной ткани сенсомоторной коры и стриатума, а также к изменению функциональных свойств холинергической системы этих структур в онтогенезе крыс. Эти морфо-функциональные нарушения развития ЦНС могут являться ключевым звеном в формировании поведенческих реакций, обучения и памяти в процессе взросления животных и человека, а также приводить к развитию различных нейродегенеративных заболеваний. О степени этих нарушений можно судить на основании изучения особенностей развития поведенческих реакций у животных.

Таким образом, представляется важным исследовать последствия нарушений нормального эмбриогенеза в развитии двигательного поведения крыс на разных этапах онтогенеза.

Цели и задачи исследования.

Целью настоящей работы является изучение особенностей развития врожденных и приобретенных движений на разных этапах онтогенеза крыс в условиях их нормального и нарушенного в результате действия гипоксии эмбриогенеза.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать развитие двигательных и позно-тонических реакций крыс линии Вистар в первый месяц постнатального онтогенеза.

2. Охарактеризовать процессы обучения инструментальному рефлексу и формирования разных видов памяти у молодых (3-4-недельных) и взрослых (3-4-месячных) контрольных самцов крыс.

3. Выявить особенности развития двигательного поведения в первый месяц постнатального развития у животных, перенесших пренатальную гипоксию на 13,5-е (E13,5) или 18,5-е сутки (E18,5) эмбриогенеза.

4. Выявить особенности формирования разных видов памяти у молодых (3-4-недельных) и взрослых (3-4-месячных) самцов крыс, перенесших гипоксию на разных этапах эмбриогенеза (E13,5 и E18,5).

5. Изучить влияние инъекций агониста (карбахола) и антагониста (скополамина) холинергической системы в сенсомоторную кору и различные области неостриатума мозга на локомоцию и выполнение инструментального рефлекса взрослыми животными.

6. Провести анализ влияния инъекций ингибиторов α -секретазы (фермента, вовлеченного в непатогенный процессинг предшественника β -амилоидного пептида) и нейропептидаз (неприлизина и эндотелин-конвертирующего фермента, обладающих амилоид-деградирующими свойствами) на кратковременную память у крыс.

Научная новизна.

На применявшейся в нашей работе модели пренатального нарушения развития головного мозга (трехчасовая нормобарическая гипоксическая гипоксия при 7% O₂) показано, что наиболее значительные изменения в физиологическом развитии и формировании двигательного поведения в раннем постнатальном онтогенезе возникают в результате гипоксического воздействия на E13,5, но не на E18,5.

Впервые показано, что гипоксия на E13,5 или на E18,5 приводит к обратимым изменениям врожденных форм двигательного поведения и необратимому нарушению механизмов кратковременной и долговременной памяти.

На оригинальной модели выработки инструментального рефлекса впервые обнаружено, что холинергическая система сенсомоторной коры участвует в разнонаправленной регуляции врожденной двигательной активности (локомоция) и выполнения инструментальных движений разной степени сложности (быстрых врожденных и выученных медленных).

Показано, что холинергическая система стриатума участвует в регуляции медленных манипуляторных движений, имеющих дополнительные тактильную и тоническую компоненты.

Впервые в экспериментах с интракортикальным (*i.c.*) введением батимастата, ингибитора α -секретазы, показана важная роль этого фермента в процессах запоминания экспериментальной задачи у взрослых крыс, а также у молодых животных при развитии нейронных сетей неокортекса, необходимых для формирования памяти на более поздних сроках развития.

В экспериментах с *i.c.* введением фосфорамидона выявлено участие в процессах запоминания у взрослых крыс таких амилоид-деградирующих ферментов, как нейропептидазы неприлизин и эндотелин-конвертирующий фермент.

Впервые выявлена взаимосвязь между снижением активности α -секретазы и амилоид-деградирующих ферментов, наблюдаемое после пренатальной гипоксии или *i.c.* введения ингибиторов этих ферментов, и нарушением процесса запоминания.

Положения, выносимые на защиту:

1. Пренатальная гипоксия приводит к задержке физиологического развития и становления двигательного поведения в первый месяц постнатального развития. Обнаруженные различия в выполнении движений животными контрольной и экспериментальных групп нивелируются по мере их взросления, тогда как нарушения обучения и памяти, обнаруженные в раннем онтогенезе, сохраняются у взрослых животных.

2. 13,5-е сутки эмбрионального развития, соответствуя периоду, когда в мозге преобладают процессы пролиферации и миграции, являются значимыми как для физиологического развития и становления в раннем онтогенезе врожденных форм двигательного поведения животных, так и для нормального развития когнитивных процессов мозга.

3. 18,5-е сутки эмбрионального развития, соответствуя периоду, когда в мозге преобладают процессы созревания и дифференцировки, являются важными для развития когнитивных процессов и менее значимыми для развития врожденных форм двигательного поведения.

4. Холинергическая система сенсомоторной коры участвует в регуляции как врожденных, так и выученных движений (быстрых и медленных), а в стриатуме она регулирует преимущественно медленные инструментальные движения, имеющие дополнительные тактильную и тоническую компоненты.

5. Пренатальная гипоксия может повышать риск возникновения когнитивных нарушений в результате снижения активности фермента α -секретазы предшественника амилоидного пептида и нейропептидаз - неприлизина и эндотелин-конвертирующего фермента.

Теоретическая и практическая значимость.

Результаты работы свидетельствуют о том, что на более поздних сроках эмбрионального развития уменьшается восприимчивость организма к повреждающему влиянию гипоксии. Подтверждается предположение, что воздействие патогенного фактора в период преимущественной генерации и миграции нейробластов формирующихся структур головного мозга приводит к более существенным нарушениям двигательных реакций, зависящих от их нормального развития. Полученные данные важны для понимания процессов формирования мозга и могут найти свое применение в медицинской практике, поскольку пренатальная гипоксия является одним из главных патогенных факторов, нарушающих развитие у детей.

Выявленные в работе нарушения физиологического развития, двигательного поведения и когнитивных функций, вызываемые гипоксическим воздействием в определенные периоды эмбриогенеза, позволяют обосновать и найти новые подходы к разработке методов диагностики и профилактики болезней, связанных с пренатальной патологией.

Обнаруженное нарушение когнитивных функций после пренатальной гипоксии должно учитываться в дошкольных и школьных учреждениях при обучении и работе с детьми.

Результаты исследования и вытекающие из них выводы дополняют существующие представления о механизмах формирования процессов обучения и памяти и могут быть использованы в лекциях по нейробиологии развития и психофизиологии в биологических и медицинских ВУЗах.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на: XI-XIII Международных совещаниях и школах по эволюционной физиологии. С.-Петербург, 1996, 2001 и 2006; XXXIII международном конгрессе физиологических наук. С.-Петербург, 1997; Meeting of the British Royal Physiological Society. Bristol, 1997; XVII и XVIII съездах Всероссийского физиологического общества им. И.П.Павлова. Ростов-на-Дону, 1998 и Екатеринбург, 2001; конференции «Механизмы адаптивного поведения». С.-Петербург, 1999; XXX Всероссийском совещании по проблемам высшей нервной деятельности, посвященном 150-летию И.П.Павлова.

С.-Петербург, 2000; International Workshop: “Basal Ganglia and Thalamus in Health and Movement Disorders.” Moscow, 2000; XIV International Congress of Neuropathology «Brain Pathology», Birmingham, 2000; IV и V международных конференциях по функциональной нейроморфологии. С.-Петербург, 2002 и 2006; International Symposium Neuron Differentiation and Plasticity – Regulation by Intercellular Signals. 2003; на конференции «Биологические аспекты экологии человека». Архангельск, 2004; конференции «Нейрохимия: Фундаментальные и прикладные аспекты». Москва, 2005; Четвертой Российской конференции «Гипоксия: Механизмы, адаптация, коррекция». Москва, 2005; I съезде физиологов СНГ. Сочи, 2005; Международном симпозиуме «Механизмы адаптивного поведения». Санкт-Петербург, 2005; 11th meeting of Czech and Slovak Neurochemical Society, «Molecular basis of neurological and psychiatric disorders». Martin, 2006.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методики исследования, изложения экспериментальных данных, обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы, содержащего 359 источников. Работа, изложенная на 179 страницах машинописного текста, включает 49 рисунков и 3 таблицы.

Работа поддержана грантами: Российского фонда фундаментальных исследований (1996-1998, 1999-2001, 2002-2004 и 2006 гг.), Российской академии наук для научных проектов молодых ученых РАН по фундаментальным и прикладным исследованиям (2000-2002 гг.), Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (2002-2006 гг.), Санкт-Петербургского научного центра РАН (2005-2006 гг.), а также персональными грантами Физиологического общества Великобритании (1995-1998 гг.) и правительства С.-Петербурга для студентов, аспирантов и молодых ученых (1997 и 1998 гг.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 73 работы: 17 статей и 56 тезисов.

2. Материалы и методы

Работа проведена на 515 крысах линии Вистар с момента рождения до 30 суток и на 402 взрослых крысах-самцах (в возрасте 3-4 месяца) линии Вистар.

Для получения потомства, перенесшего пренатальное гипоксическое воздействие, беременных самок (на 13,5-е или 18,5-е сутки беременности) сажали на 3 часа в специальную камеру с пониженной концентрацией O₂ до 7,0%. Животных контрольной группы содержали в камере при нормальной концентрации O₂.

Было исследовано потомство контрольных самок и самок, перенесших гипоксию на 13,5-е (группа ГЕ13,5) или 18,5-е (группа ГЕ18,5) сутки беременности. В течение 1 месяца с момента

рождения проводили ежедневную регистрацию веса тела животных, а также регистрацию основных этапов развития: время отделения наружного уха от кожи головы и открытия глаз. Для оценки двигательной активности молодых животных контрольной и экспериментальных групп использовали современные методики тестирования позно-тонических реакций (поворот со спины на живот, отрицательный геотропизм, реакция постановки конечности на опору, способность удерживаться на поворачивающейся сетке, горизонтальной проволоке и поворачивающемся стержне) и локомоции.

Для тестирования кратковременной памяти взрослых животных использовали радиальный 8-лучевой лабиринт. Крысу сажали на середину центральной платформы, к стенке которой крепились пронумерованные лучи, и позволяли выполнить 8 посещений кормушек, располагавшихся в конце каждого луча. Повторное посещение луча считали ошибочным и для оценки способности к ориентации вычисляли процент правильных посещений. После каждого животного центральную платформу протирали 50% раствором этилового спирта

При обучении молодых (3-4-недельных) и взрослых (3-4-месячных) животных инструментальным пищедобывающим движениям были использованы две схемы обучения:

1. Часть животных обучали только нажимать передней лапой на поршень без длительного давления. У этих крыс подкреплялись все 64 движения при заданном времени давления, равном нулю ($T=0$).
2. Часть животных обучали замедлять движения и давить на поршень более заданного времени, равного 50мс ($T>50$ мс). Критерием уровня обучения крысы в этой группе являлось статистически достоверное изменение среднего времени давления в течение более чем семи циклов тренировки.

Обученным инструментальному рефлексу животным билатерально вводили карбахол (Sigma, USA) в дозах 0,03 мкг (2×10^{-10} М), 0,3 мкг (2×10^{-9} М), 3 мкг (2×10^{-8} М) или скополамин (Sigma, USA) в дозах 0,3 мкг ($8,8 \times 10^{-10}$ М), 3 мкг ($8,8 \times 10^{-9}$ М) в 1 мкл физиологического раствора в сенсомоторную кору (AP=-1,5; L=2,5-3,5; H=0 мм), дорзальный (AP=-1,5; L=3,5; H=3,5 мм) или вентральный стриатум (AP=-2,0; L=1,5; H=6,0 мм) по атласу и терминологии Fifkova, Marsalla (1967). Каждую вторую из последующих инъекций проводили на 0,5 мм глубже предыдущей. Одно животное получало не более 8 инъекций. Процедура введения веществ в мозг животных занимала около 3 минут, после чего через 60, 120, 180 минут, а также в последующие сутки, проводилось по одному циклу тестирования. Контроль места введения осуществлялся по трекам на срезах мозга после окончания опытов.

В другой серии экспериментов исследовали воздействие *i.c.* (AP=-1,5; L=2,5-3,5; H=0 мм) инъекций $5,2 \times 10^{-3}$ мкг (10^{-5} М) или $5,2 \times 10^{-2}$ мкг (10^{-4} М) батимастата (SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Harlow, UK), а также 0,59 мкг (10^{-3} М) или 5,9 мкг (10^{-2} М) фосфорамидона (Sigma, USA) в 1 мкл физиологического раствора на поведение взрослых крыс в радиальном лабиринте. В контрольных опытах животным вводили такой же объем физиологического раствора. Часть работы была проведена на крысятах-самцах линии Вистар, которым под рауш-наркозом двукратно (на 5-е и 7-е сутки после рождения) были произведены билатеральные инъекции батимастата ($2,6 \times 10^{-2}$ мкг (10^{-4} М) в 0,5 мкл физиологического раствора), фосфорамидона (2,9 мкг (10^{-2} М) в 0,5 мкл физиологического раствора) или физиологического раствора непосредственно через незатвердевшую кость черепа в теменную область коры мозга. По истечении 6 месяцев после этой процедуры животных тестировали в радиальном 8-лучевом лабиринте.

Обработку полученных результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel 7.0 для Windows 98 и программы SigmaStat 3.0. Данные анализировали с помощью описательной статистики, которая оценивала среднее арифметическое значение и ошибку среднего арифметического. Проверку гипотезы о равенстве средних в случаях с нормальным распределением осуществляли при помощи критерия Стьюдента. В других случаях использовали непараметрический критерий Манна-Уитни-Вилкоксона. Оценку качественных признаков проводили по критерию Фишера. Различия считали статистически достоверными при 5% уровне значимости.

3. Результаты исследования и их обсуждение

3.1. Влияние пренатальной гипоксии на развитие двигательного поведения в онтогенезе крыс.

3.1.1. Физиологическое развитие животных, перенесших пренатальную гипоксию.

Пренатальная гипоксия на E13,5 приводит к снижению веса тела, отставанию физиологического развития животных (время отделения наружного уха и открытия глаз) на 1-2 дня и нарушению процесса развития нормальных двигательных реакций во всех использованных тестах в первый месяц постнатального онтогенеза (см. таблица). В группе GE18,5, в отличие от группы GE13,5, не наблюдалось статистически достоверного отставания от контроля по времени отделения наружного уха и времени открытия глаз (см. таблица). Однако на протяжении всего первого месяца тестирования вес тела крысят из группы GE18,5 был существенно ниже по сравнению с контролем.

Таблица. Характеристики физиологического развития у крыс контрольной и экспериментальных групп.

Группы	Вес тела новорожденных, г	Прибавление веса за сутки, г	Время, сут	
			отделения ушей	открытия глаз
Контрольная	5,34±0,07	2,50±0,50	2,29±0,18	15,64±0,41
ГЕ13,5	4,79±0,08**	1,50±0,20	3,14±0,40*	17,32±0,20**
ГЕ18,5	5,00±0,16*	2,05±0,52	2,90±0,24	16,04±0,35

* - достоверные отличия от контроля при $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

Обнаруженное в нашей работе снижение веса животных, перенесших пренатальную гипоксию, вполне согласуется с известными фактами ограничения внутриутробного роста и нарушения нормального развития эмбрионов в результате кислородной недостаточности (Nyakas et al., 1996; Wiktor et al., 2004). В связи с тем, что рост плодов изначально регулируется инсулином и инсулиноподобным фактором роста-1 (Ashton et al., 1985), можно предположить, что изменения в активности одного или обоих этих факторов способствуют развитию ростовой недостаточности эмбрионов и новорожденных, перенесших пренатальную гипоксию в наших экспериментах. Это предположение подтверждается данными об изменении уровня содержания инсулиноподобного фактора роста-1 и связанных с ним протеинов в крови пуповины перенесших перинатальную асфиксию детей или пренатальную гипоксию крыс, что коррелирует со снижением веса новорожденных (Huang et al., 2004; Dinleyici et al., 2006).

3.1.2. Двигательные и позно-тонические реакции в первый месяц постнатального развития крыс, перенесших пренатальную гипоксию.

Сопоставление развития некоторых позно-тонических реакций и локомоции у контрольных и экспериментальных животных представлено на рис. 1. Однако наблюдаемые в группе ГЕ13,5 задержки развития двигательного поведения не являются полностью необратимыми и могут со временем компенсироваться. В течение 1-го месяца компенсируются реакция отрицательного геотропизма, ротация тела со спины на живот, способность удерживаться на вращающемся бревне, а к 4-м месяцам – вес тела, способность удерживаться на горизонтальной проволоке и локомоция.

По ряду тестов животные из группы ГЕ18,5 не отличались от контроля: поворот со спины на живот, отрицательный геотропизм, постановка конечности на опору, локомоция (рис. 2). Выявленные отличия в тестах, выполнение которых требует помимо координации движений развития определенного усилия мышц (способность удерживаться на горизонтальной проволоке, вращающейся сетке и на вращающемся деревянном стержне) (рис. 2), были менее

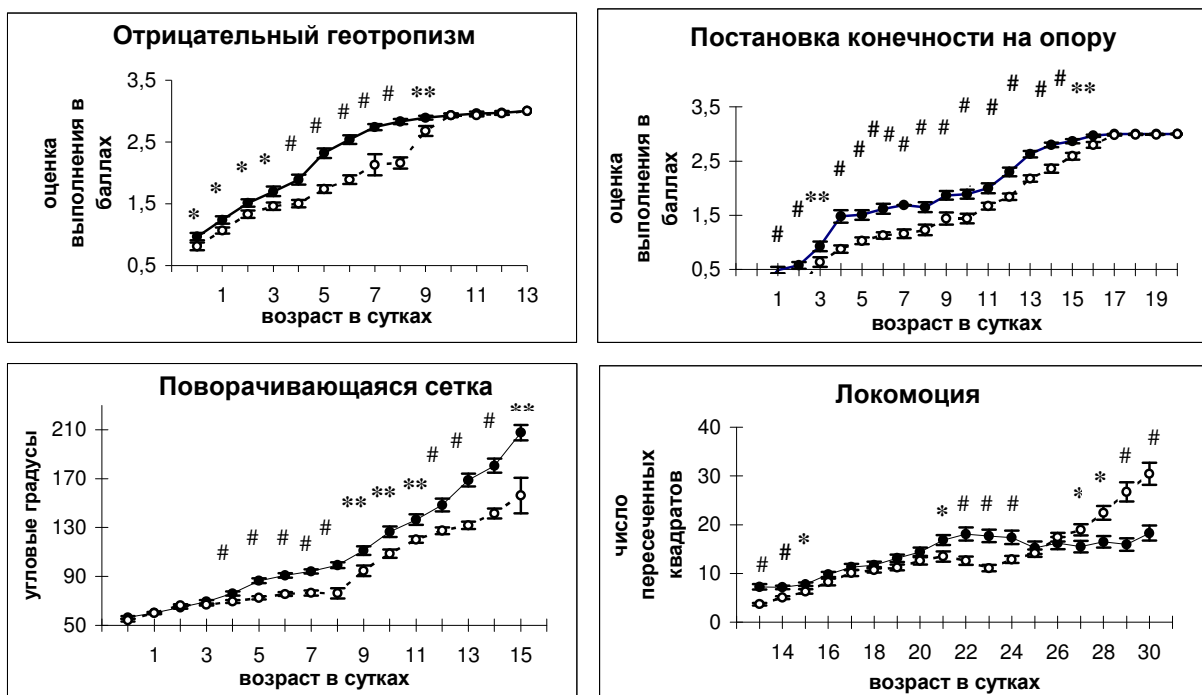


Рис. 1. Развитие двигательного поведения в первый месяц постнатального развития животных контрольной (черные точки) и ГЕ13,5 (белые точки) групп.

Для каждого возраста (0, 1, 2, 3 и т.д. суток) представлены усредненные значения выполнения рефлекса \pm ошибка среднего. * - достоверные различия при $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; # - $p < 0,001$.

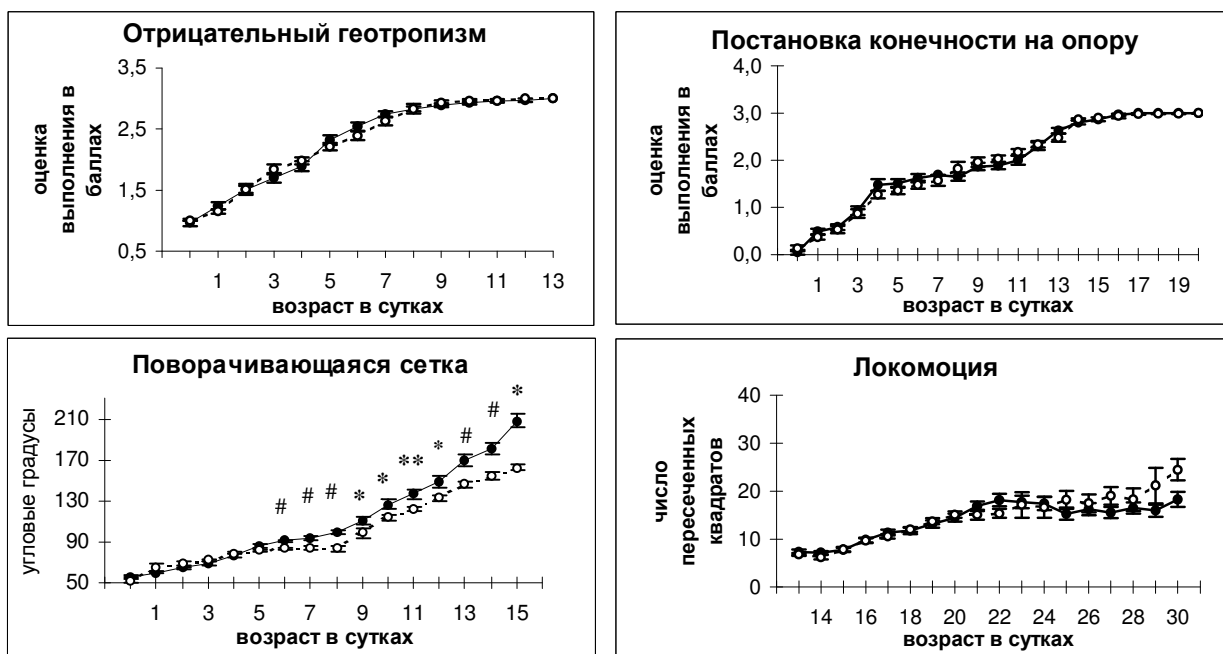


Рис. 2. Развитие двигательного поведения в первый месяц постнатального развития животных контрольной (черные точки) и ГЕ18,5 (белые точки) групп.

Для каждого возраста (0, 1, 2, 3 и т.д. суток) представлены усредненные значения выполнения рефлекса \pm ошибка среднего. * - достоверные различия при $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; # - $p < 0,001$.

значительными по сравнению с группой GE13,5. К 4-м месяцам в группе GE18,5 исчезали различия с контролем по весу тела и способности удерживаться на горизонтальной проволоке.

Таким образом, пренатальное гипоксическое воздействие приводит к отставанию физиологического развития и становления двигательного поведения в раннем постнатальном онтогенезе. Наиболее значительные изменения в течение первого месяца постнатального развития возникают в результате гипоксического воздействия на E13,5, когда в мозге преобладают процессы пролиферации и миграции клеток, но не на E18,5, когда начинается активный процесс дифференцировки нервных клеток. У животных, перенесших пренатальную гипоксию, в процессе взросления нивелируется и полностью исчезает (к 4-месячному возрасту) изначально наблюдавшееся отставание в развитии врожденных двигательных реакции.

Для более полной характеристики поведенческого репертуара, помимо врожденных, исследовали приобретенные формы поведения, такие как пищедобывающие движения, требующие только нажатия (молодые крысы) или длительного давления (взрослые крысы) на поршень одной из передних конечностей, а также способность сохранять инструментальные движения после длительного перерыва, характеризующую долговременную память животных, и способность ориентироваться в радиальном 8-лучевом лабиринте, характеризующую кратковременную память животных.

3.1.3. Выученные пищедобывающие движения у молодых (3-4-недельных) и взрослых (3-4-месячных) крыс, перенесших пренатальную гипоксию на разных сроках эмбриогенеза.

Несмотря на то, что животные из группы GE18,5, в отличие от животных группы GE13,5, демонстрировали большую способность обучаться новым движениям, по окончании обучения они, подобно животным из группы GE13,5, не достигали такого же уровня выполнения приобретенного навыка, как контрольные животные. Среднее время давления на поршень у взрослых животных в результате первичного обучения увеличивалось на $26,49 \pm 6,90\%$ в группе GE13,5 и $30,90 \pm 4,47\%$ в группе GE18,5, что статистически было меньше ($p < 0,05$) изменений, достигнутых в ходе обучения контрольной группы ($50,32 \pm 6,46\%$).

Для тестирования долговременной памяти исследовали сохранность выработанного инструментального рефлекса через длительный промежуток времени (5-недельный перерыв). Животные контрольной группы после перерыва сохраняли навык выполнения инструментальных движений с длительным давлением на поршень, т.е. у них среднее время давления до и после перерыва не отличалось и значительно ($p < 0,001$) превышало среднее время

давления, регистрируемое перед началом обучения. У животных, перенесших пренатальную гипоксию, после перерыва наблюдалось снижение среднего времени давления, достигавшее начального уровня, который регистрировался перед началом обучения (рис. 3).

Дальнейшее обучение животных, проведенное после перерыва, показало, что контрольные животные были способны увеличивать ($p < 0,05$) время давления на поршень по сравнению с уровнем, достигнутым на первом этапе обучения (до перерыва). У животных, перенесших пренатальную гипоксию, повторное обучение (после перерыва) способствовало увеличению среднего времени давления до уровня, достигнутого в результате первоначального обучения, в группе ГЕ18,5 или превышению этого уровня в группе ГЕ13,5. Таким образом, обучение животных, перенесших гипоксическое воздействие в пренатальный период, после перерыва начинается как бы заново, в то время как в контрольной группе повторное обучение начинается от уровня, достигнутого в результате первичного обучения.

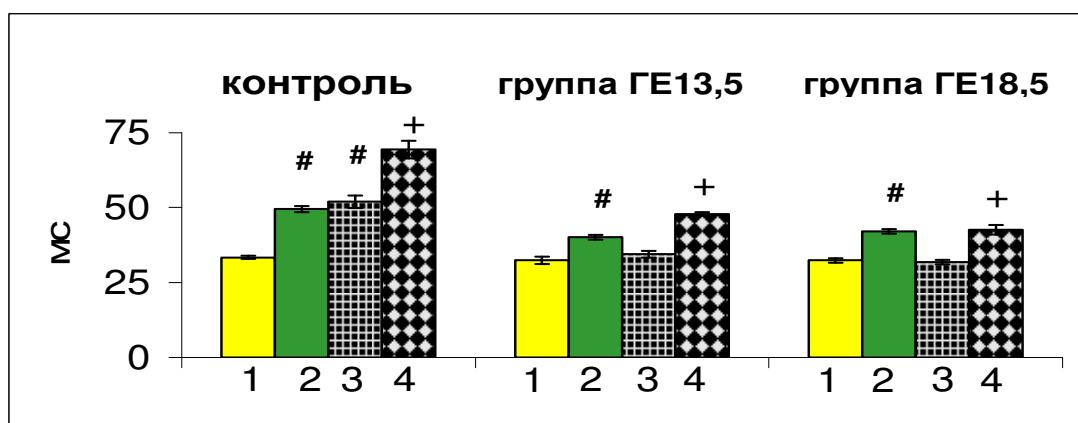


Рис. 3. Обучение и запоминание пищедобывающего движения передней конечности с давлением на поршень у крыс контрольной, ГЕ13,5 и ГЕ18,5 групп.

По вертикали: среднее значение (\pm ошибка среднего) времени давления (мс) на поршень-препятствие. 1 – до обучения; 2 – после обучения; 3 – после пятинедельного перерыва; 4 – обучение после перерыва. # - различия между средними значениями до обучения и после обучения (столбцы 1 и 2) или до обучения и после перерыва (столбцы 1 и 3) при $p < 0,001$; + - отличие среднего времени давления сразу после перерыва и после повторного обучения (столбцы 3 и 4) при $p < 0,05$.

3.1.4. Кратковременная память в радиальном лабиринте у взрослых (4-месячных) крыс, перенесших пренатальную гипоксию на разных сроках эмбриогенеза.

Исследование кратковременной памяти проводили в восьмилучевом лабиринте. Было обнаружено, что на фоне отсутствия изменений по среднему времени нахождения крысы внутри рукава (составлявшем $19,92 \pm 1,81$ секунд в контроле и $17,97 \pm 3,97$ или $18,64 \pm 1,67$ секунд в

группах GE18,5 или GE13,5, соответственно) процент правильных посещений кормушек по сравнению с контролем ($97,57 \pm 0,84\%$) достоверно снижался у животных из групп GE18,5 ($p < 0,001$) до $91,29 \pm 1,34\%$ или GE13,5 ($p < 0,01$) до $89,69 \pm 0,99\%$, что может свидетельствовать о нарушении процессов кратковременной памяти.

Результаты нашего исследования, касающиеся нарушения развития моторики и когнитивных функций у крыс после пренатальной гипоксии, совпадают с данными, полученными в морфологическом исследовании. Эти данные свидетельствуют об отставании созревания нервных клеток, увеличении процессов нейродегенерации и снижении общей плотности расположения клеток в сенсомоторной коре и стриатуме на протяжении первого месяца постнатальной жизни крыс, перенесших пренатальную гипоксию на E13,5 (Журавин, 2002-2006; Васильев, 2007). Примечательно, что подобные различия между контрольными и экспериментальными животными, достигавшие максимальных значений на 20-30-е сутки, исчезали к концу второго месяца постнатального онтогенеза. На более поздних сроках наблюдалось снижение плотности шипиков в сенсомоторной коре и гиппокампе (Васильев, 2007).

Морфологические изменения коррелировали со снижением в этих же структурах мозга активности растворимой формы АХЭ (Nalivaeva et al., 1995; Лавренова и др., 2003; Кочкина, 2007), растворимого предшественника амилоидного пептида (sAPP; Наливаева, 2006) и со снижением содержания ганглиозидов (Nalivaeva et al., 1995). Все эти вещества играют важную роль в процессах пролиферации нервных клеток и развитии нервной ткани (Appleyard, 1992, 1994; Sharma et al., 2001; Caille et al., 2004; Conti, Cattaneo, 2005), а также в пластических перестройках нервных сетей, связанных с процессами обучения и памяти (Кругликов, 1981; Dunbar et al., 1986; Fibiger, 1991; Егорушкина и др., 1992; Журавин и др., 1993; Aigner, 1995; Roeser et al., 1997). Недостаток этих веществ может приводить к изменению формирования нервной системы в раннем онтогенезе и нарушению нормальных процессов запоминания у взрослых экспериментальных животных. Это предположение подтверждается результатами следующей серии экспериментов.

3.2. Участие холинергических систем сенсомоторной коры и стриатума в регуляции двигательного поведения крыс.

Холинергическая иннервация в центральной нервной системе играет важную роль в осуществлении разных форм поведения человека и животных, при этом особенно отмечается ее

связь с когнитивными функциями (Perry et al., 1999; Pereu, Giovannini, 2007). Нарушения холинергической передачи в мозге у человека вызывают такие тяжелые неврологические заболевания, как болезни Паркинсона, Альцгеймера, шизофрению и др. (Cummins, Back, 1998; Surter Bruno, 1999). Пренатальная гипоксия сопровождается модификацией холинергической системы основных структур переднего мозга, участвующих в реализации и координации движений, - сенсомоторной коре и неостриатуме (Nalivaeva et al., 1995; Лавренова и др., 2003; Кочкина, 2007). Поэтому представлялось важным исследовать участие холинергической системы этих структур в регуляции двигательного поведения крыс.

Было обнаружено, что в результате инъекций агониста холинергической системы карбахола в сенсомоторную кору взрослых самцов крыс замедляются оба типа исследованных инструментальных движений: как простое добывающее, так и с дополнительным тактильным компонентом - длительным давлением на препятствие. Это замедление сказывается на возрастании количества медленных (более 50 мс) движений (рис. 4). После инъекций антагониста холинергической системы скополамина оба типа добывающих движений передней конечностью выполняются крысами в среднем за более короткое время, что приводит к снижению количества медленных движений (рис. 4). Локомоторная активность после введения карбахола в сенсомоторную кору возрастает.

Введение карбахола в дорзальный стриатум не выявляет каких-либо достоверных ($p < 0,05$) изменений в количестве медленных движений по сравнению с контрольными значениями до введения вещества (рис. 4, слева), однако наблюдается тенденция к исчезновению новых медленных движений. Инъекции карбахола в вентральный стриатум сопровождаются возрастанием количества медленных движений (рис. 4, слева). Введение скополамина как в дорзальный, так и в вентральный стриатум приводит к тому, что животные не могут в течение продолжительного времени выполнять длительное давление, что вызывает снижение количества медленных движений. У животных, обучившихся нажимать на поршень без давления, после введения исследуемых веществ в вентральный или дорзальный стриатум характеристики движения не изменяются (рис. 4, справа). Не обнаружено влияние холинергической системы вентрального или дорзального стриатума на локомоторную активность крыс в «открытом поле».

Таким образом, обнаружено, что холинергическая система сенсомоторной коры разнонаправлено регулирует врожденную двигательную активность (локомоция) и выполнение инструментальных движений передней конечности разной степени сложности (обычных быстрых и выученных медленных). Напротив, холинергическая система стриатума участвует

только в выполнении медленных, имеющих дополнительные тактильную и тоническую компоненты, пищедобывающих движений. При этом дорзальный стриатум регулирует, в основном, процесс обучения выполнению новых медленных движений, а вентральный стриатум вовлечен в выполнение медленных хорошо выученных движений.

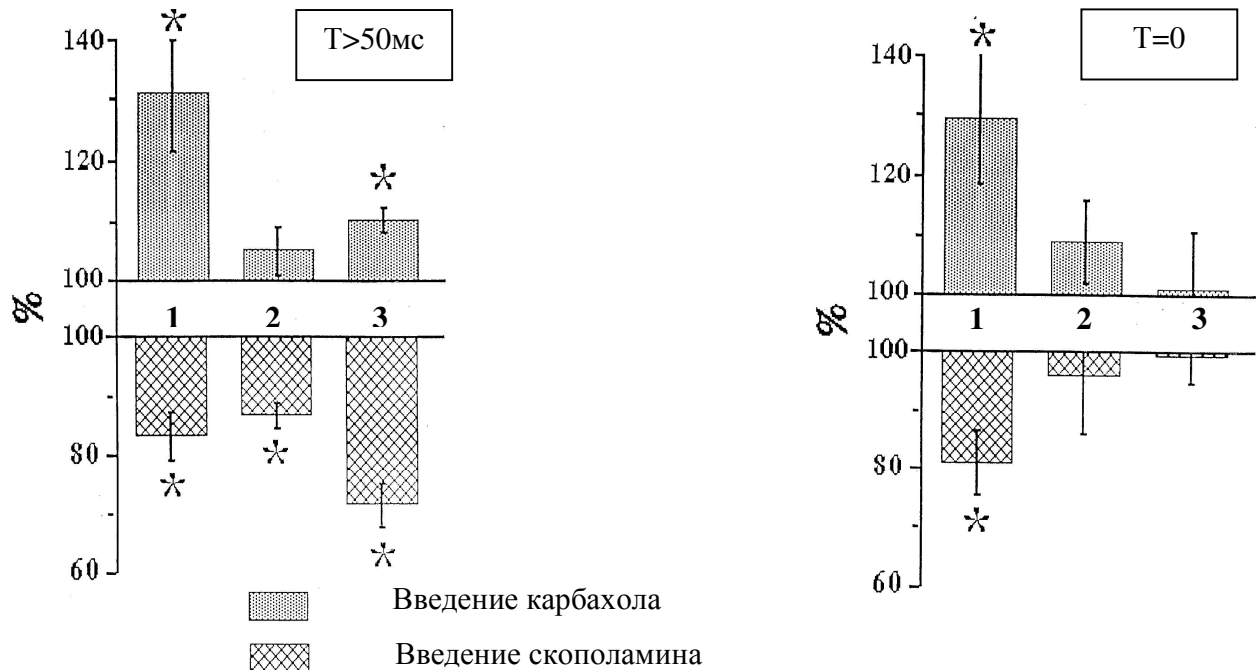


Рис. 4. Изменение процента медленных (>50 мс) движений после введения карбахола (темные столбика) и скополамина (заштрихованные столбики) в сенсомоторную кору (1), дорзальный (2) или вентральный (3) стриатум крыс, обученных давить более заданного времени (слева) или нажимать (справа) на поршень.

Ордината - среднее значение (\pm ошибка среднего). За 100% принято число медленных движений при тестировании крыс непосредственно перед инъекцией. * - отличия от фона (перед инъекцией) при $p < 0,05$.

3.3. Эффекты введения ингибиторов металлопротеаз (α -секретазы, неприлизина и эндотелин-конвертирующего фермента) в сенсомоторную кору на поведение взрослых крыс.

В последнее время в литературных источниках появляется все больше свидетельств о том, что гипоксия/ишемия может приводить к генетическим и молекулярным изменениям, характерным для болезни Альцгеймера (Jendorska et al., 1995; Blass, 2001; Peers et al., 2004). В частности, наблюдаются нарушения Ca^{2+} гомеостаза, дисфункция митохондрий, продукция активных форм кислорода (Bazan et al., 2002), нарушение структуры ДНК, накопление

фосфорилированных тау протеинов (Wen et al., 2004) и иммунореактивных продуктов амилоидного пептида (A β ; Chen et al., 2003). Показано, что гипоксия изменяет метаболизм предшественника амилоидного пептида (APP), влияет на уровень экспрессии амилоид-деградирующих ферментов - неприлизина (НЕП) и эндотелин-конвертирующего фермента (ЭКФ), а также приводит к снижению активности α -секретазы, участвующей в непатогенном процессинге APP, и увеличению активности β -секретазы, задействованной в амилоидогенный процессинг APP, в коре и гиппокампе (Nalivaeva et al., 2003; Wen et al., 2004; Наливаева, 2006).

В наших экспериментах мы исследовали воздействие инъекций батимастата, ингибитора α -секретазы, и фосфорамидона, ингибитора НЕП и ЭКФ, на поведение животных в радиальном лабиринте, который обычно используется для тестирования функции гиппокампа и коры головного мозга, а также связанной с этими структурами кратковременной (пространственной) памяти у животных (Buresova & Bures, 1982, 1985; Markovska et al., 1983; Kaye et al., 1984) и человека (Owen et al., 1995, 1996; Bohbot et al., 2002). Болезнь Альцгеймера является результатом патологических изменений в коре мозга и гиппокампе. У пациентов даже на ранних стадиях заболевания нарушается пространственная рабочая память, которую обычно исследуют в модельных экспериментах на животных (Dudkin et al., 2005; Hashimoto et al., 2005; Lovasic et al., 2005; Dong et al., 2005). Известно, что у грызунов аминокислотная последовательность APP на участке, соответствующем A β , отличается от человеческой по трем аминокислотам. Такое отличие препятствует образованию типичных A β агрегатов в мозге этих животных (Vaughan & Peters, 1981; Shivers et al., 1988). Поэтому грызунов можно использовать для моделирования ранних стадий болезни Альцгеймера, когда еще нет накопления A β , но изменения в его метаболизме и метаболизме APP уже происходят.

Полученные нами данные о снижении числа правильных побегов в лабиринте уже через 60 мин после *i.c.* инъекций взрослым крысам батимастата (рис. 5.) свидетельствуют о том, что образование крупного растворимого белка sAPP α под действием α -секретазы необходимо для формирования памяти и её ингибирование нарушает нормальное протекание этого процесса. Восстановление же способности правильного выполнения поставленной задачи через сутки (или позже) после инъекции батимастата подтверждает имеющиеся данные об обратимом характере действия данного ингибитора (Parvathy et al., 1999). Крысы, перенесшие билатеральные инъекции батимастата в кору больших полушарий на 5-й и 7-й дни постнатального онтогенеза, во взрослом возрасте делали больше ошибок ($p < 0,001$) в простом одноуровневом лабиринте, чем их сверстники, перенесшие введение физиологического раствора, что выражалось

соответственно в $90,92 \pm 2,21$ и $97,17 \pm 0,68\%$ правильных побегов. Такое долговременное действие батимастата при введении его в кору новорожденных животных указывает на то, что дефицит α -секретазы в этот период развития мозга может являться критическим для формирования необходимых нейрональных связей, которые в дальнейшие периоды жизни животных вовлекаются в процессы формирования памяти. Эти данные согласуются с результатами наших исследований о действии пренатальной гипоксии у этих животных как на активность α -секретазы (Nalivaeva et al., 2004; Наливаева, 2006), так и на способность к обучению, которые были снижены в течение всего постнатального онтогенеза.

После инъекций фосфорамидона также нарушалась кратковременная память крыс, которая тестировалась в радиальном лабиринте (рис.5). Наши данные согласуются с результатами других исследователей, которые наблюдали нарушение когнитивных способностей у крыс после длительного (4-недельного) внутрижелудочкового введения тиорфана – ингибитора неприлизина, но не ЭКФ (Shirotani et al., 2001). Повторное тестирование животных через 6 месяцев после серии инъекций фосфорамидона взрослым или молодым (на 5-е и 7-е сутки постнатального онтогенеза) животным не выявило изменения в количестве правильных побегов по сравнению с первоначальным уровнем, что свидетельствует о кратковременном обратимом действии этого вещества.

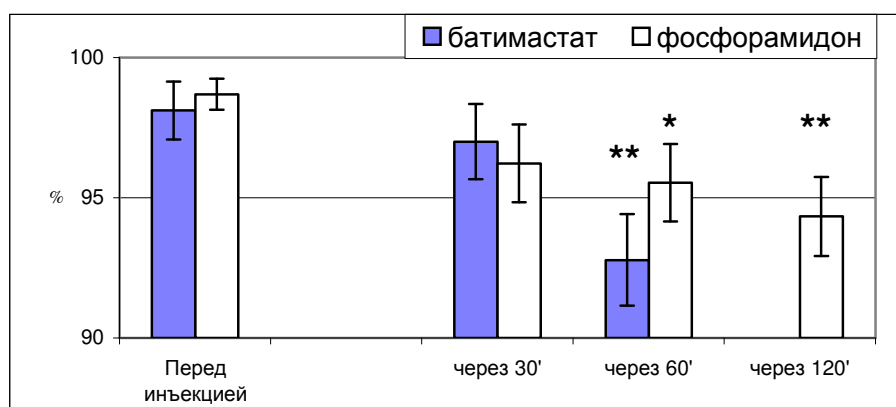


Рис. 5. Результаты тестирования крыс в радиальном лабиринте до и после введения батимастата или фосфорамидона.

По оси абсцисс указано время, прошедшее с момента введения фосфорамидона до начала тестирования животных. По оси ординат указан процент правильных побегов в лабиринте. * - $p < 0,01$, ** - $p < 0,001$

Таким образом, можно сделать вывод о том, что α -секретаза, неприлизин и ЭКФ вовлекаются в процессы запоминания у крыс, и ингибирование этих ферментов сопровождается ухудшением кратковременной памяти.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных можно заключить, что наиболее значимым для физиологического развития животных и становления в раннем онтогенезе врожденных форм двигательного поведения является период, когда в мозге эмбрионов преобладают процессы пролиферации и миграции клеток (выбранный нами срок гипоксии - E13,5), т.е. начало третьего триместра беременности. Тогда как для нормального развития когнитивных процессов мозга важными являются периоды пролиферации и миграции нейробластов (E13,5), а также их созревания и дифференцировки (E18,5). Неблагоприятные условия эмбрионального развития во время этих периодов приводят к необратимому нарушению механизмов кратковременной и долговременной памяти у экспериментальных животных. В отличие от чисто моторных, когнитивные нарушения, возникшие в результате пренатальной гипоксии, сохраняются и у взрослых животных. Причины подобных нарушений развития моторики и когнитивных функций мозга, полученных в наших экспериментах, могут корениться в изменениях биохимических характеристик и структурной организации нервной ткани сенсомоторной коры, стриатума и гиппокампа.

Известно, что растворимая форма АХЭ, неприлизин и крупные растворимые белки sAPP α и sAPP β , образующиеся в результате действия α - и β -секретаз, играют важную роль в процессах пролиферации, миграции и созревания нервных клеток, в установлении межклеточных контактов и развитии нервной ткани. Недостаток этих биологически активных веществ, обнаруживаемый после пренатальной гипоксии на определенных сроках онтогенетического развития, может вызывать нарушения определенных структур мозга и проявляться в наблюдавшихся изменениях поведения животных. Показательно, что менее выраженные последствия пренатальной гипоксии на E18,5 (по сравнению с гипоксией на E13,5) в развитии двигательного поведения крыс, выявленные в настоящей работе, коррелируют с менее значительными биохимическими сдвигами, обнаруженными после гипоксии на этом сроке.

В работе показано, что холинергическая система в сенсомоторной коре принимает участие в регуляции как врожденной двигательной активности, так и выполнения инструментальных движений разной степени сложности, а холинергическая система в

стриатуме участвует только в выполнении медленных пищедобывающих движений. Поэтому более низкие показатели при обучении, выполнении и сохранении инструментальных движений с длительным давлением, наблюдавшиеся у животных, перенесших гипоксическое воздействие, могут быть связаны с их чисто физической неспособностью давить в течение длительного времени на поршень или с неспособностью запоминать новый тип движения.

Пренатальная гипоксия вызывает как нарушение сохранности выработанного инструментального движения после длительного перерыва, так и снижение кратковременной рабочей памяти в радиальном лабиринте у взрослых крыс, что доказывает влияние гипоксического воздействия на когнитивные функции мозга. Принимая во внимание эти данные, а также данные о снижении активности α -секретазы и амилоид-деградирующих ферментов, наблюдаемой после пренатальной гипоксии или после *i.c.* введения ингибиторов этих ферментов, приводящем к нарушению процесса запоминания, можно предположить, что недостаток кислорода в мозге, наблюдаемый во время пренатальной гипоксии, вызывает возрастание риска возникновения когнитивных нарушений.

Таким образом, пренатальная гипоксия на определенных этапах онтогенеза, нарушая деятельность сенсомоторной коры и стриатума, исследованных в нашей работе, изменяет развитие двигательного поведения в первый месяц постнатального поведения и нарушает когнитивные функции у молодых и взрослых животных.

ВЫВОДЫ

1. У потомства (группы ГЕ13,5 и ГЕ18,5) самок крыс, перенесших трехчасовую нормобарическую гипоксию (7% O₂) во время беременности на 13,5-е или 18,5-е сутки, при сравнении с потомством контрольных животных выявлено отставание в физиологическом развитии и формировании двигательного поведения в раннем постнатальном онтогенезе. Показано, что наиболее значительные изменения в течение первого месяца постнатального развития возникают в результате гипоксического воздействия на 13,5-е сутки внутриутробного развития. Обнаруженные различия в выполнении движений крысами контрольной и экспериментальных групп нивелируются по мере взросления.

2. В отличие от чисто моторных, когнитивные нарушения после пренатальной гипоксии наблюдаются как у молодых (3-4 недельных, группа ГЕ13,5), так и у взрослых (3-4 месячных, группы ГЕ13,5 и ГЕ18,5) крыс. Вне зависимости от срока гипоксического воздействия (Е13,5

или E18,5) у взрослых животных выявлено ухудшение процесса обучения инструментальному рефлексу, нарушение долговременной и кратковременной памяти.

3. Активация холинергической системы сенсомоторной коры карбахолом приводит к разнонаправленному изменению врожденной двигательной активности (локомоции) и приобретенных инструментальных движений передней конечности разной степени сложности - обычных быстрых и выученных медленных.

4. При введении агониста (карбахол) или антагониста (скополамин) холинергической передачи в разные отделы стриатума обнаружены изменения в выполнении медленных пищедобывающих движений, имеющих дополнительные тактильную и тоническую компоненты. При этом дорзальный стриатум вовлечен, в основном, в процесс обучения новым медленным движениям, а вентральный стриатум участвует в регуляции медленных хорошо выученных движений. Эти данные позволяют предположить, что модификация холинергической системы сенсомоторной коры и/или стриатума может являться одним из механизмов нарушения выполнения врожденных и приобретенных движений, наблюдаемых после пренатальной гипоксии.

5. В экспериментах с введением в кору мозга ингибитора α -секретазы предшественника амилоидного пептида - батимастата, показано участие α -секретазы в процессах запоминания экспериментальной задачи как у взрослых крыс, а также у молодых животных в раннем постнатальном периоде, когда происходит интенсивное развитие нейронных сетей неокортекса.

6. В экспериментах с введением фосфорамидона выявлено участие в процессах запоминания у взрослых крыс таких амилоид-деградирующих ферментов, как нейропептидазы - неприлизин и эндотелин-конвертирующий фермент. На крысах, перенесших пренатальную гипоксию, также обнаружено снижение активности α -секретазы и нейропептидаз и нарушение памяти. Можно предположить, что изменение метаболизма амилоидного пептида и его предшественника в результате пренатальной гипоксии приводит к возрастанию риска нарушений когнитивных функций мозга.

Список статей, опубликованных по материалам диссертации.

1. Журавин И.А., Наливаева Н.Н., **Дубровская Н.М.** Влияние экзогенных ганглиозидов на формирование у крыс инструментальных движений с тактильным контролем // Журн. высш. нервн. деят. 1993. Т.43, N.6. С.1129-1136.
2. Журавин И.А., Наливаева Н.Н., Плеснева С.А., **Дубровская Н.М.**, Чекулаева У.Б., Клементьев Б.И. Нейрохимические характеристики неостриатума и моторной коры после выработки одностороннего манипуляторного рефлекса // Физиол. журнал им. И.М.Сеченова. 1994. Т.80, N.1. С.115-120.
3. Шаповалова К.Б., Журавин И.А., Поминова Е.В., **Дубровская Н.М.**, Дюбкачева Т.А. Сенсорные и моторные компоненты разных форм выученного движения при изменении активности холинергической системы неостриатума // Физиол. журнал им. И.М.Сеченова. 1994. Т. 80, № 12. С.34-44.
4. Журавин И.А., Наливаева Н.Н., Плеснева С.А., **Дубровская Н.М.**, Чекулаева У.Б., Клементьев Б.И. Активность аденилатциклазы и 5'- нуклеотидазы в сенсомоторных и лимбических структурах мозга крыс после обучения манипуляторному навыку // Физиол. журнал им. И.М.Сеченова. 1995. Т.81, N.1. С.40-47
5. Nalivaeva N., Plesneva S., Chekulaeva U., Zhuravin I., **Dubrovskaya N.**, Klementjev B. Hypoxic hypoxia induces different biochemical changes in the cortex of the right and left hemispheres of rat brain // Mol. Chem. Neuropathol. 1995. V.25, N.2-3. P.255-263.
6. **Dubrovskaya N.M.**, Zhuravin I.A. Role of the striatal cholinergic system in the regulation of learned manipulation in rats // Integrative Physiol. Behav. Sci. 1995. V.30, N.2. P.127-137.
7. N.Nalivaeva, S.Plesneva, U.Chekulaeva, **N.Dubrovskaya**, I.Zhuravin. Administration of gangliosides changes the properties of adenylate cyclase system in the sensorimotor and limbic structures of rat brain // In: Neurochemistry. Cellular, Molecular, and Clinical Aspects. (Eds. A. Teelken and J. Korf). N.-Y. – London: Plenum Press. 1997. P.919-923.
8. **Дубровская Н.М.**, Журавин И.А. Роль холинергических систем дорсального и вентрального стриатума мозга крысы в регуляции выученного движения // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. 1997. Т. 83, N. 1-2. С.83-89..
9. Журавин И.А., Наливаева Н.Н., Плеснева С.А., **Дубровская Н.М.** Влияние ганглиозидов на двигательную активность, обучение и механизмы регуляции трансдукции сигналов в мозгу у крыс // Журн. эвол. биох. физиол. 1999. Т. 35, №3. С.229-236.
10. Журавин И.А., **Дубровская Н.М.** Участие холинергической системы сенсомоторной коры мозга крысы в регуляции разных типов движений // Журн. высш. нервн. деят. 2000. Т.50, № 1. С.103-112.
11. **Дубровская Н.М.**, Потапов Д.О., Туманова Н.Л. Влияние пренатальной гипоксии на развитие крыс в постнатальном онтогенезе // Вестник молодых ученых. 2002. N 4. Серия: Науки о жизни. N 1. С.9-15.

12. I.A.Zhuravin, **N.M.Dubrovskaya**, S.A.Plesneva. Striatal level of regulation of learned forepaw movements in rats // *Physiol. Res.* 2002. V.51, Supl.1. P.S67-S76.
13. Журавин И.А., **Дубровская Н.М.**, Туманова Н.Л. Постнатальное физиологическое развитие крыс после острой пренатальной гипоксии // *Рос. физиол. журнал им. И.М.Сеченова.* 2003. Т. 89, № 5. С.522-532.
14. И.А.Журавин, Н.Л.Туманова, **Н.М.Дубровская**, К.Н.Федосеева. Нарушение формирования старой и новой коры при изменении условий эмбрионального развития // *Журн. эвол. биохим. физиол.* 2003. Т.39, №6. С. 608-618.
15. И.А.Журавин, Н.Л.Туманова, Е.В.Озирская, Д.С.Васильев, **Н.М.Дубровская**. 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.
16. **Дубровская Н.М.**, Наливаева Н.Н., Тернер Э.Дж., Журавин И.А. Влияние ингибитора α -секретазы, метаболизирующей предшественник амилоидного пептида, на формирование памяти у крыс // *Журн. высш. нервн. деят.*, 2005. Т.55, №6. С.725-728.
17. И.А.Журавин, Н.Л.Туманова, Е.В.Озирская, Д.С.Васильев, **Н.М.Дубровская**. Формирование структурной и ультраструктурной организации стриатума в постнатальном онтогенезе крыс при изменении условий их эмбрионального развития // *Журн. эвол. биохим. физиол.* 2007. Т.43, №2. С.85-93.