

УДК 57.012.3;57.032;57.033

## ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ НА ЦИТОАРХИТЕКТониКУ И УЛЬТРАСТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ОТДЕЛОВ МОЗГА, СВЯЗАННЫХ С ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИЕЙ У КРЫС

© 2021 г. Н. Л. Туманова<sup>1</sup>, Д. С. Васильев<sup>1, \*</sup>, Н. М. Дубровская<sup>1</sup>, Н. Н. Наливаева<sup>1</sup>, **И. А. Журавин<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

\*E-mail: dvasilyev@bk.ru

Поступила в редакцию 19.11.2020 г.

После доработки 29.11.2020 г.

Принята к публикации 30.11.2020 г.

С помощью светооптической и электронной микроскопии показано, что на двадцатые сутки после рождения у крысят, перенесших пренатальную гипоксию на 14-й день эмбрионального развития (E14, 7% O<sub>2</sub> в течение 3 ч), в энторинальной коре и гиппокампе наблюдаются нейродегенеративные изменения и снижается количество нейронов, в то время как в периферическом отделе обонятельного анализатора (обонятельных луковицах) существенных изменений в этот период развития не наблюдали. С помощью иммуногистохимического анализа также выявлены изменения в содержании и распределении нейтральной эндопептидазы неприлизина в энторинальной коре и гиппокампе. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что нарушение обонятельной функции у молодых крыс, возникающее в результате гипоксии матери во время беременности и проявляющееся в снижении эффективности поиска пищи, связано с патологическими изменениями клеток энторинальной коры и гиппокампа, а также со снижением в них содержания неприлизина.

**Ключевые слова:** онтогенез, пренатальная гипоксия, нейродегенерация, поведение, обоняние, гиппокамп, энторинальная кора, обонятельные луковицы, неприлизин

DOI: 10.31857/S0041377121020085

Одним из важнейших направлений современной биомедицины является выяснение причин возникновения и поиск способов ранней диагностики нейродегенеративных заболеваний, которые часто связаны с нарушением деятельности обонятельного анализатора. Ухудшение обоняния может указывать на развитие таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера (БА) и Паркинсона (Djordjevic et al., 2008; Doty, 2012; Морозова и др., 2014; Murphy, 2019), болезнь Хантингтона (Barresi et al., 2012) и другие формы деменции (Carnemolla et al., 2020). Нарушение обонятельной функции часто сопровождается повышенной смертностью у пожилых людей (Liu et al., 2019). Обонятельные расстройства проявляются раньше, чем когнитивные или двигательные нарушения и становятся все более явными и тяжелыми по мере прогрессирования нейродегенеративного процесса.

В последние годы с помощью функциональной МРТ проводится визуализация обонятельных структур

тур головного мозга, что способствует пониманию причин развития обонятельных расстройств при нейродегенеративных заболеваниях (Wang et al., 2010). Согласно данным МРТ, снижение объема обонятельных луковиц и трактов коррелирует со снижением когнитивных функций, анализируемых по краткой шкале оценки психического статуса MMSE (Thomann et al., 2009). При БА и болезни Паркинсона обонятельные расстройства могут быть связаны как с атрофией серого вещества обонятельных луковиц, первичной обонятельной коры, гиппокампа, таламуса и гипоталамуса, так и с ростом числа тормозных нейронов в обонятельных отделах (Wang et al., 2010). С другой стороны, бульбэктомия у разных видов грызунов (мышей, морских свинок и крыс) приводит к поведенческим, морфологическим, биохимическим и иммунологическим изменениям, характерным для развития нейродегенерации альцгеймеровского типа (см. обзор: Гуляева и др., 2017).

В работах нашей лаборатории было показано, что пренатальная гипоксия на 14-й день эмбрионального развития (E14, 7% O<sub>2</sub> в течение 3 ч) приводит у крыс к нарушению морфофункциональных свойств

**Принятые сокращения:** APP – предшественник β-амилоидного пептида; БА – болезнь Альцгеймера; Aβ – β-амилоидный пептид.

нервной ткани теменной коры и гиппокампа, снижению плотности дендритных шипиков и отставанию нейрогенеза, морфогенеза и формирования пластичности нервной системы (Vasilev et al., 2016; Туманова и др., 2018). Пренатальная гипоксия также приводит к изменению метаболизма  $\beta$ -амилоидного пептида (A $\beta$ ) и увеличению содержания его белка-предшественника (APP), а также к снижению активности  $\alpha$ -секретазы и увеличению активности  $\beta$ -секретазы, расщепляющих APP, что ведет к сдвигу баланса катаболизма APP в сторону образования A $\beta$  (Nalivaeva et al., 2004). Похожие изменения также наблюдаются при ишемии мозга взрослых крыс (Наливаева и др., 2005). При этих патологических изменениях в коре и гиппокампе также наблюдается дефицит амилоид-деградирующих ферментов неприлизина и эндотелин-превращающего фермента (Nalivaeva et al., 2004, 2012). У человека эти факторы в совокупности могут приводить к накоплению амилоидного пептида в нервной ткани, гибели нервных клеток, развитию нейродегенерации и деменции.

Помимо морфологических и биохимических изменений в ткани мозга, пренатальная гипоксия у крыс приводит к нарушению когнитивных функций в постнатальном онтогенезе, которые выявляются при тестировании животных в двухуровневом радиальном лабиринте, в тесте “Распознавание нового объекта” и при выработке инструментальных рефлексов (Дубровская, Журавин, 2009; Журавин и др., 2010). Таким образом, пренатальная гипоксия у крыс может рассматриваться в качестве зоотропной модели ранних стадий нейродегенеративных заболеваний человека. Однако исследования влияния пренатальной гипоксии на формирование структур, обеспечивающих обонятельную функцию животных, до сих пор не проводились.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния пренатальной гипоксии на морфофункциональные характеристики отделов мозга крыс, связанных с обонянием, а также на обоняние у крыс. В работе использовали методы световой и электронной микроскопии, иммуногистохимии, а также анализ результатов поиска пищи по запаху.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Животные.** Использовали самцов из потомства самок крыс линии Вистар контрольной и экспериментальной групп (с нормобарической гипоксией). Все эксперименты осуществляли в соответствии с протоколом использования лабораторных животных ИЭФБ РАН, основанного на директиве Европейского Сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными (European Com-

munities Council Directive #86/609 for the Care of Laboratory Animals).

**Модель пренатальной нормобарической гипоксии.** Самок экспериментальной группы на 14-е сутки беременности (E14) подвергали действию нормобарической гипоксии в специальной камере емкостью 100 л, содержащей системы терморегуляции, вентиляции, газового анализа и адсорбции выдыхаемого CO<sub>2</sub>. В ходе эксперимента содержание кислорода в камере снижали с 20.7 до 7.0% и поддерживали на этом уровне в течение 3 ч. Концентрация углекислоты в камере не превышала 0.2%, а температура поддерживалась на уровне 22°C. В камеру одновременно сажали не более 10 крыс. Самки контрольной группы находились такое же время в камере при нормальном содержании кислорода. На 20-е сут беременности (за 1 сут до родов) самок экспериментальной и контрольной групп рассаживали по отдельным клеткам. На 2-е сут после рождения в каждом выводке оставляли по 8 крысят. При расчете возраста крысят нулевым считали день их появления на свет.

**Световая микроскопия.** Светооптическое исследование проводили на крысятах в возрасте 20 сут (P20) контрольной ( $n = 10$ ) и экспериментальной групп ( $n = 9$ ). Ткань мозга фиксировали методом транскардиальной перфузии 10%-ным нейтральным формалином на фосфатном буфере (PBS, 4°C, pH 7.4). Замороженные фронтальные срезы мозга толщиной 20 мкм изготавливали на криостате Leica CM 1510S (Leica Microsystems, Germany). Для исследования отбирали срезы обонятельной луковицы (5.2–7.0 мм от линии Брегма) (Paxinos, Watson, 2005), гиппокампа и энторинальной коры мозга (4.5–5.5 мм от брегмы) и проводили окрашивание по Нисслю. С использованием микроскопа ImagerA (Zeiss, Германия) оценивали состояние нервной ткани мозга. Количественное сравнение клеток поля CA1 гиппокампа и энторинальной коры проводили на серии срезов толщиной 20 мкм, первый срез серии выбирали случайно, расстояние между последующими срезами в серии составляло 40 мкм. При проведении анализа использовали программу Video Test Master-Morphology (Video Test, Санкт-Петербург, Россия). По срезам (6 на каждое животное), содержащим дорсальный гиппокамп или энторинальную кору, вычисляли средние величины общего количества клеток и количества нейронов (на участке ткани площадью 10000 мкм<sup>2</sup>) для каждого животного контрольной ( $n = 8$ ) и экспериментальной групп ( $n = 8$ ).

**Электронная микроскопия.** Для анализа мозг крысят (в группе контроля  $n = 5$ , гипоксии  $n = 4$ ) на 20-й день постнатального развития (P20) фиксировали методом транскардиальной перфузии смесью 1%-ного

глутарового альдегида и 1%-ного формальдегида на 0.1 М PBS, pH 7.4. Блоки, содержащие обонятельную луковицу, энторинальную кору или гиппокамп дополнительно фиксировали 1%-ным OsO<sub>4</sub>, контрастировали уранилацетатом, обезвоживали и заливали в аралдит по стандартному протоколу (Туманова и др., 2018). На ультратоме LKB-III (LKB, Швеция) изготавливали срезы исследуемых отделов толщиной 50 нм, которые затем исследовали на электронном микроскопе FEI Tecnai V2 (FEI, США).

**Иммуногистохимия.** Для исследования отбирали срезы обонятельной луковицы (5.2–7.0 мм от bregma рис. 1а) (Paxinos, Watson, 2005), энторинальной области коры и поля CA1 дорсального гиппокампа (на уровне 4.5–5.5 мм от брегмы рис 2а, 3а) животных контрольной и экспериментальной групп ( $n = 8$  в каждой возрастной группе). Мозг фиксировали раствором 10%-ного нейтрального формалина на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4), затем изготавливали срезы на криостате Leica CM 1510S (Leica Microsystems, Германия). Для снижения аутофлуоресценции срезы инкубировали в 0.1 М растворе глицина (Sigma, Германия) на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4) под визуальным контролем до максимального ослабления свечения в диапазоне длин волн 490–550 нм. Блокировку неспецифического связывания антител осуществляли путем 1-часовой инкубации в 2%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (Sigma, Германия) на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4), в который добавляли 0.01% Тритона X100 для пермеабилзации клеточных мембран. При иммуногистохимическом исследовании распределения неприлизина использовали кроличьи поликлональные антитела Anti-CD10 (EPR5904, ab126593; Abcam, Великобритания разведение 1 : 100). Визуализацию осуществляли с помощью FITC-конъюгированных вторичных антител против IgG кролика (ab96902, Abcam; Великобритания разведение 1 : 500). В качестве негативного контроля неспецифического связывания проводили иммунохимическую реакцию в отсутствие первичных антител для исследованных областей мозга у каждого животного. В качестве позитивного контроля использовали ткань почки, характеризующуюся высоким содержанием неприлизина, взятой от контрольной крысы. Иммунофлуоресцентное свечение регистрировали с помощью микроскопа Leica DMR, оборудованном конфокальным сканером Leica TCS SL (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение флуорохрома FITC осуществляли светом He/Ar-лазера при длине волны 488 нм. Свечение FITC регистрировали в диапазоне длин волн 496–537 нм. Яркость свечения FITC на поле нервной ткани площадью 10000 мкм<sup>2</sup> оценивали при помощи программы Video Test Master-Morphology (Video Test, Санкт-Петербург, Россия). Для каждого животного вычисля-

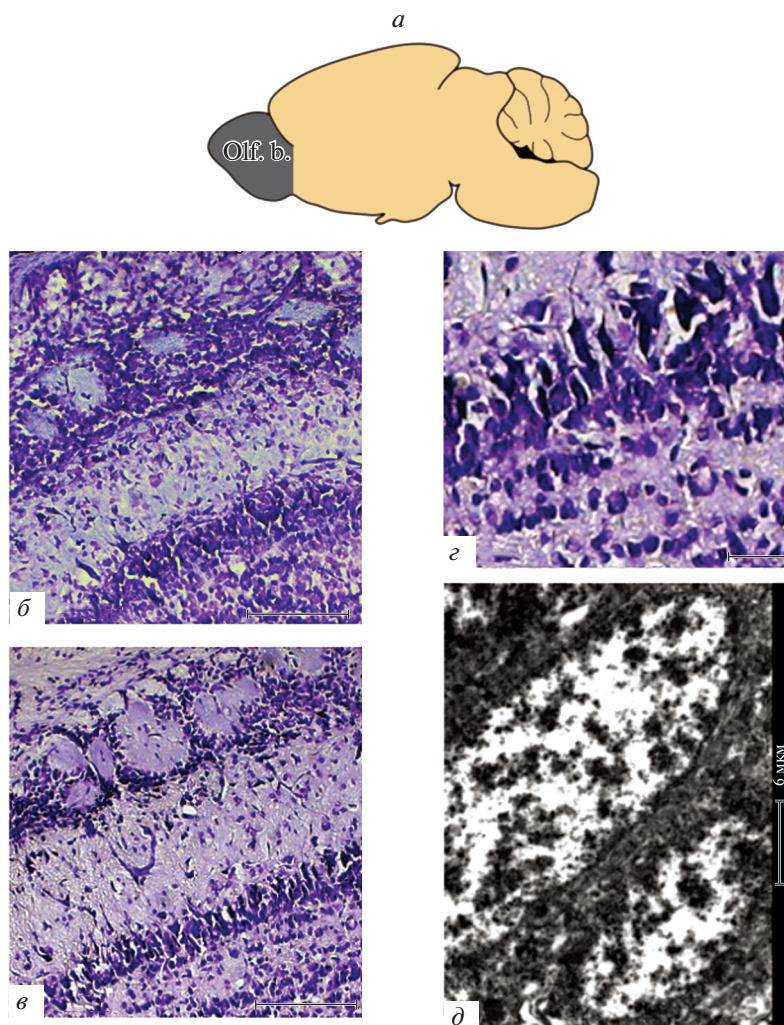
ли среднее значение по 6 срезам. Нормировку полученных значений для каждого животного осуществляли путем вычета среднего значения для негативного контроля (иммунохимическая реакция в отсутствие первичных антител) и сравнивали средние нормированные значения уровня сигнала FITC для животных контрольной ( $n = 8$ ) и экспериментальной ( $n = 8$ ) групп.

**Исследование поведения животных.** Эксперименты проводили на крысах, достигших возраста 30 сут контрольной группы (интактный контроль,  $n = 15$ ) и перенесших пренатальную гипоксию (экспериментальная группа “гипоксия”,  $n = 9$ ). В парадигме “поиск пищи” использовали модифицированную нами методику поиска корма (Sun et al., 2016). Тестирование животных проводили в специальной камере площадью 100 × 100 см с 16-ю отверстиями диаметром 2 см и непрозрачными стенками высотой 30 см. Во время эксперимента в два отверстия в полу закладывали по одному кусочку овсяного печенья диаметром 0.5 см. Кусочки печенья находились под слоем опилок ниже поверхности пола камеры на 0.5 см. Их расположение меняли при каждом новом тестировании. В эксперимент брали животных, прошедших 2-суточное пищевое голодание. Тестирование проводили ежедневно в течение 6 сут. В течение 15 мин теста оценивали в баллах количество добытых кусочков корма: 0, 1 или 2. Кроме того, за цикл тестирования регистрировали общее число обнюхиваний всех отверстий в полу экспериментальной камеры. После нахождения второго кусочка печенья тестирование прекращалось.

**Статистическая обработка данных.** Полученные данные обрабатывали с помощью пакета программ SigmaStat 3.0, используя непарный двусторонний  $t$ -критерий (two-tailed  $t$ -тест) и непараметрический критерий Манна–Уитни ( $U$ -критерий). Изменения считали достоверными при уровне значимости  $p = 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Морфология отделов коры мозга. 1) Обонятельные луковицы.** Исследование на светооптическом уровне окрашенных по методу Ниссля препаратов обонятельных луковиц (периферические отделы обонятельного анализатора) не выявило существенных различий в строении нервной ткани обонятельных луковиц контрольных и гипоксических крыс (рис. 1б, в). На рис. 1г показан слой митральных клеток, образованный несколькими концентрически расположенными рядами нейронов из обонятельных луковиц животного, перенесшего пренатальную гипоксию. На электроннограммах митральные клетки имели крупные размеры и большое ядро (рис. 1д) и не отличались от клеток данного слоя у контроль-

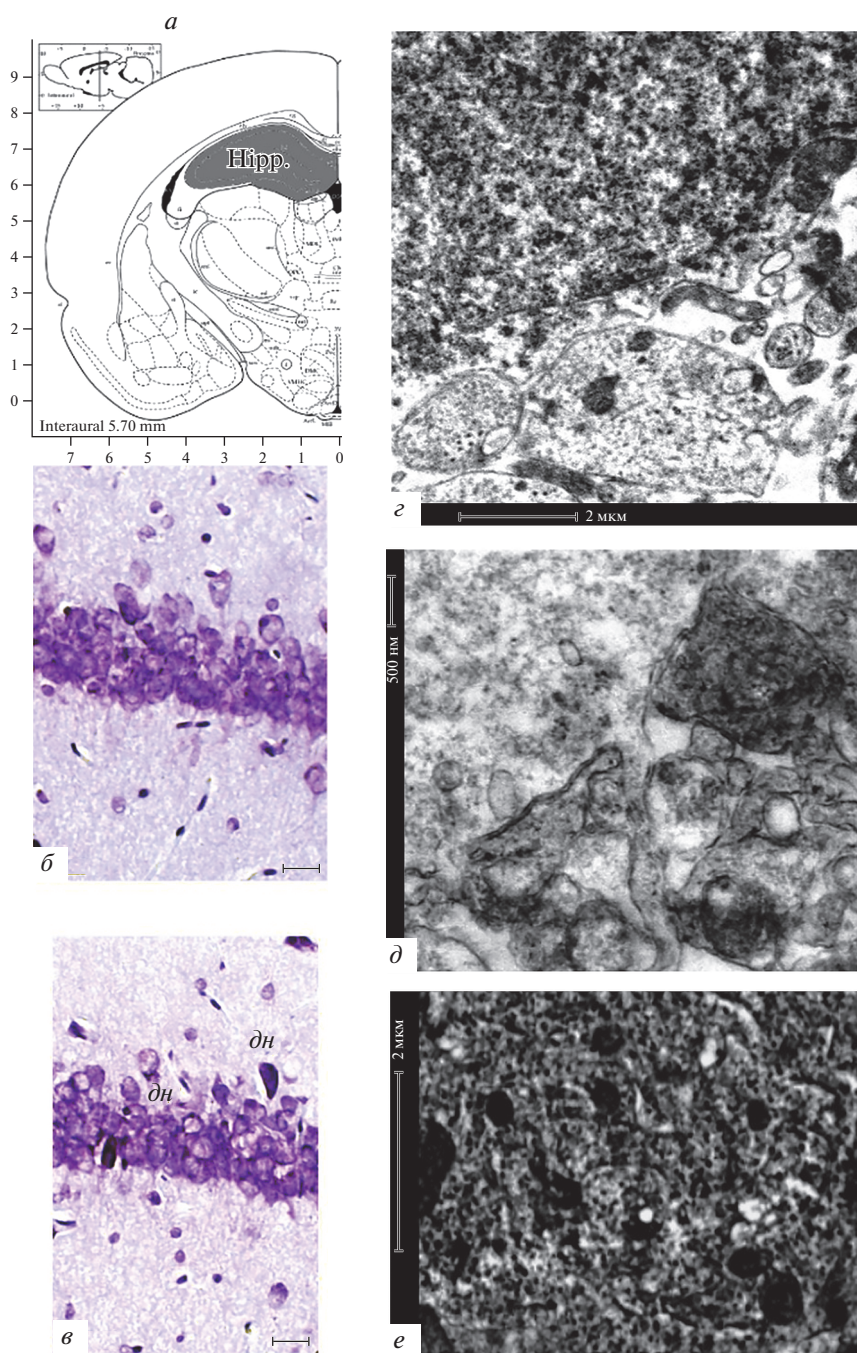


**Рис. 1.** Обонятельные луковицы 20-суточных крысят, перенесших пренатальную гипоксию. *a* – Схема расположения анализируемой области обонятельной луковицы (Olf. b.) (адаптация из: Paxinos, Watson, 2005). *б–г* – Репрезентативные микрофотографии ткани обонятельной луковицы крысят из контрольной (*б*) и экспериментальной (*в, г*) групп; окраска по Ниссля. *г* – Слой митральных клеток в обонятельных луковицах крысят, перенесших пренатальную гипоксию; окраска по Ниссля. Масштабная линейка: 200 (*б, в*) и 20 (*г*) мкм. *д* – Электронограмма обонятельной луковицы гипоксического животного; показаны митральные клетки с тонким ободком цитоплазмы

ных животных. Электронномикроскопическое исследование волокон и нейронов обонятельных луковиц также не выявило каких-либо различий между контрольными и гипоксическими животными.

**2) Гиппокамп.** С помощью светооптического метода Ниссля обнаружены структурные изменения нейронов в поле СА1 гиппокампа у крысят, перенесших пренатальную гипоксию, по сравнению с контрольными сверстниками. Среднее количество нейронов в пирамидном слое поля СА1 было ниже, чем в контроле (на  $15.4 \pm 5.8\%$  от уровня контроля,  $U = 8.1$   $p = 0.03$ ). В ряде нейронов видно набухание клеточных тел и их отростков, появление многочисленных вакуолей и лизис органоидов в цитоплазме (хроматолиз), в то время как у других нейронов на-

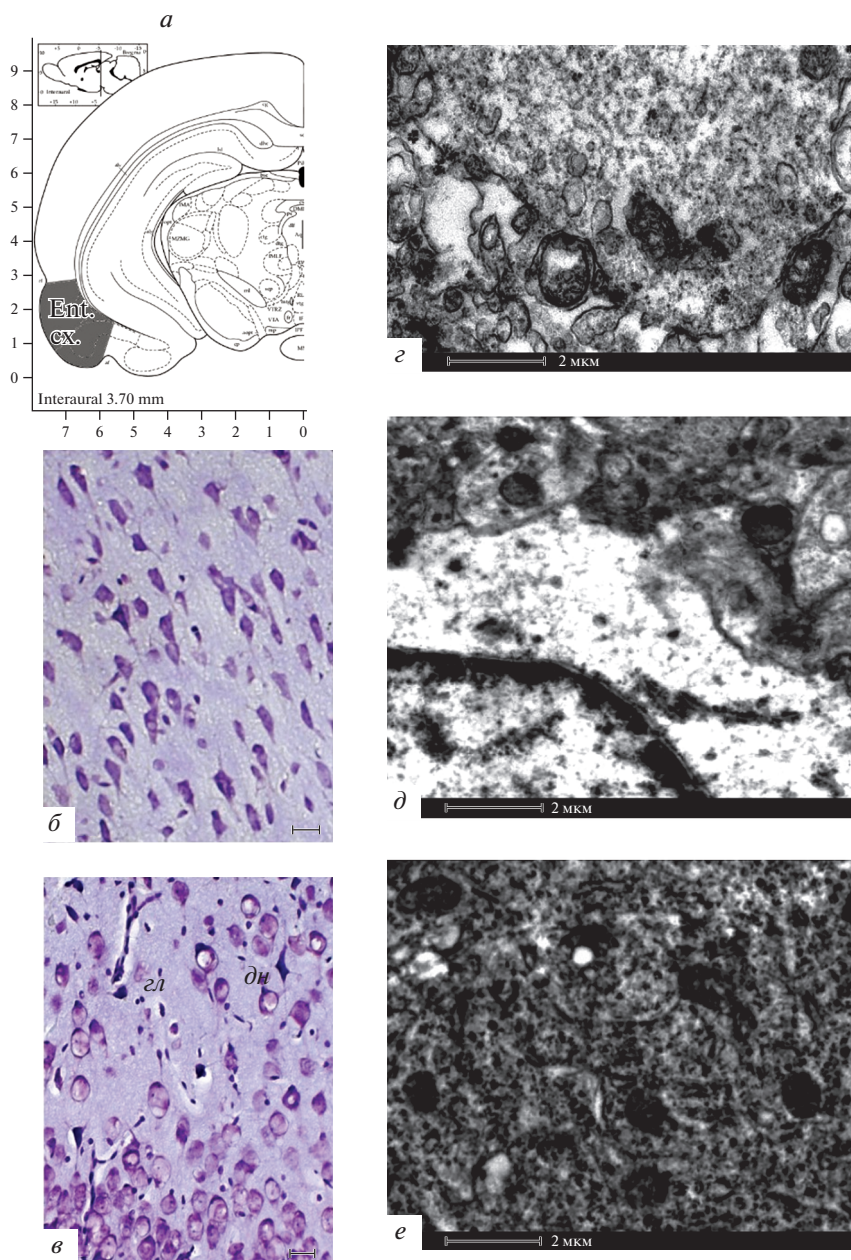
блюдали сморщивание клеточных тел и их отростков, а также уплотнение цитоплазмы (гиперхроматоз, рис. 2*б, в*). На электронограммах наряду с нормальными клетками (рис. 2*г*) у таких животных наблюдали нейроны с измененной структурой. Хроматолиз нейронов в гиппокампе крыс, перенесших гипоксию, встречался реже, чем гиперхроматоз. На рис. 2*д* представлен дегенерирующий по типу хроматолиза нейрон с набухшим телом и лизисом органоидов в цитоплазме, от тела которого отходит аксон с варикозным утолщением, а рядом с ним расположен измененный аксосоматический контакт с темной аксональной терминалью, принадлежащей гиперхромному нейрону. У таких нейронов (рис. 2*е*) в цитоплазме были трудно различимы органоиды (ЭПР и мито-



**Рис. 2.** Нейродегенеративные изменения в поле CA1 гиппокампа 20-суточных крысят после пренатальной гипоксии. *a* – Схема расположения анализируемой области гиппокампа (Hipp.) (адаптация из: Paxinos, Watson, 2005). *б, в* – Микрофотографии поля CA1 гиппокампа крысят из контрольной (*б*) и экспериментальной (*в*) групп; *дн* – дегенерирующий нейрон; окраска по Нисслю, масштабная линейка – 20 мкм. *г–е* – Электронограммы ткани поля CA1 гиппокампа крысят из контрольной (*г*) и экспериментальной (*д–е*) групп: нормальный нейрон (*г*), дегенерирующий нейрон с лизисом органоидов в цитоплазме (*д*), дегенерирующий нейрон с гиперхромной цитоплазмой и лизосомами (*е*).

хондрии), однако часто встречались лизосомы. В нейропиле гиппокампа наблюдали темные сморщенные дендритные отростки и терминали аксонов гиперхромных клеток с агглютинированными синнаптическими пузырьками.

**3) Энторинальная кора.** В энторинальной коре у крысят, перенесших пренатальную гипоксию, численность патологических изменений клеток по типу хроматолиза была выше, чем по гиперхроматозному типу. Это отмечали как на светооптическом, так и на



**Рис. 3.** Нейродегенеративные изменения в энторинальной коре 20-суточных крысят, перенесших пренатальную гипоксию. *a* – схема расположения анализируемой области энторинальной коры (Ent. cx.) (адаптация из: Paxinos, Watson, 2005). *б–в* – Микрофотографии поля энторинальной коры крысят контрольной (*б*) и экспериментальной (*в*) групп; *гл* – глиальная клетка *дн* – дегенерирующий нейрон, окраска по Нисслю, масштабная линейка – 20 мкм. *з–е* – Электронограммы ткани энторинальной коры крысят из контрольной (*з*) и экспериментальной (*д–е*) групп: нормальный нейрон (*з*), дегенерирующий нейрон с лизисом органоидов в цитоплазме (*д*) и дегенерирующий нейрон с гиперхромной цитоплазмой и лизосомами (*е*).

электронномикроскопическом уровне, особенно во II и III слоях (рис. 3б–в). У экспериментальных животных наряду с нормальными клетками (рис. 3з) наблюдали нейроны с измененной структурой. На электронограммах видны признаки нейродегенеративных изменений по типу хроматолиза: набухание клеточных тел и их отростков, появление крупных вакуолей, лизис органоидов в цитоплазме (рис. 3д).

В редких случаях выявляли одиночные каналцы ЭПР с рибосомами. У дегенерирующих нейронов по типу гиперхроматоза происходило сморщивание клеточных тел и их отростков, цитоплазма становилась электронноплотной, объем клеточного ядра уменьшался, вокруг него наблюдали ободок темной цитоплазмы, в которой сложно различить органоиды (ЭПР и митохондрии) (рис. 3е). В цитоплазме та-

ких нейронов наблюдается повышенное число лизосом — признак деструктивных процессов. В энторинальной коре (так же как и в гиппокампе) крысят, перенесших пренатальную гипоксию, обнаружено большее количество глиальных клеток с отростками, расположенных вокруг дегенерирующих нейронов, по сравнению с контрольными крысятами того же возраста. Общее количество клеток снижалось (на  $19.4 \pm 4.8\%$  от уровня контроля,  $U = 5.2$ ,  $p = 0.012$ ), среднее количество нейронов было также ниже, чем в контроле (на  $21.7 \pm 3.5\%$  от уровня контроля,  $U = 2.7$ ,  $p = 0.007$ ).

Таким образом, морфологическое исследование двух важных отделов мозга, связанных с обонятельной функцией и имеющих центральное происхождение — энторинальной коры и гиппокампа — у крыс, перенесших пренатальную гипоксию, выявило наличие патологических изменений нейронов на ранней стадии постнатального развития.

**Распределение неприлизина в нервной ткани.** Иммуногистохимический анализ распределения нейрорептидазы НЕП в исследуемых структурах мозга проводили по сравнению с негативным контролем в отсутствие первичных антител к неприлизу (рис. 4а–у), когда не наблюдали заметной аутофлуоресценции и неспецифического мечения ткани мозга вторичными антителами. В ткани печени и почек крысы, использовавшихся в качестве позитивного контроля, отмечали флуоресцентный сигнал в области испускания FITC, что свидетельствовало в пользу работоспособности антител (рис. 4к, л).

Согласно результатам иммуногистохимического анализа распределения неприлизина в ткани головного мозга, этот белок локализован как в нейропиле, так и вблизи тел нейронов (рис. 4б, д, з). Вследствие достаточно широкой локализации неприлизина проводили количественный анализ средних значений уровня иммунохимической реакции к этому белку в наблюдаемом поле нервной ткани, включающей как клетки, так и нейропиле. У молодых крысят, перенесших пренатальную гипоксию (рис. 4в, е, и), интенсивность иммунохимической реакции на неприлизин в кортикальных отделах мозга была снижена относительно контрольных животных на 33.4% в энторинальной коре ( $t = 3.81$ ;  $p = 0.002$ ) и 17.4% в поле СА1 гиппокампа ( $t = 2.81$ ;  $p = 0.014$ , рис. 4м). В ткани обонятельных луковиц различий в среднем уровне интенсивности иммунохимической реакции между контрольными животными и крысами, перенесшими пренатальную гипоксию, выявлено не было ( $t = 0.66$ ;  $p = 0.052$ ), однако наблюдали изменение топографии неприлизина с его преимущественной локализацией в центральной части обонятельной луковицы. Полученные данные свидетельствуют, что пренатальная гипоксия приводит к снижению

уровня неприлизина в энторинальной коре и гиппокампе развивающихся крысят.

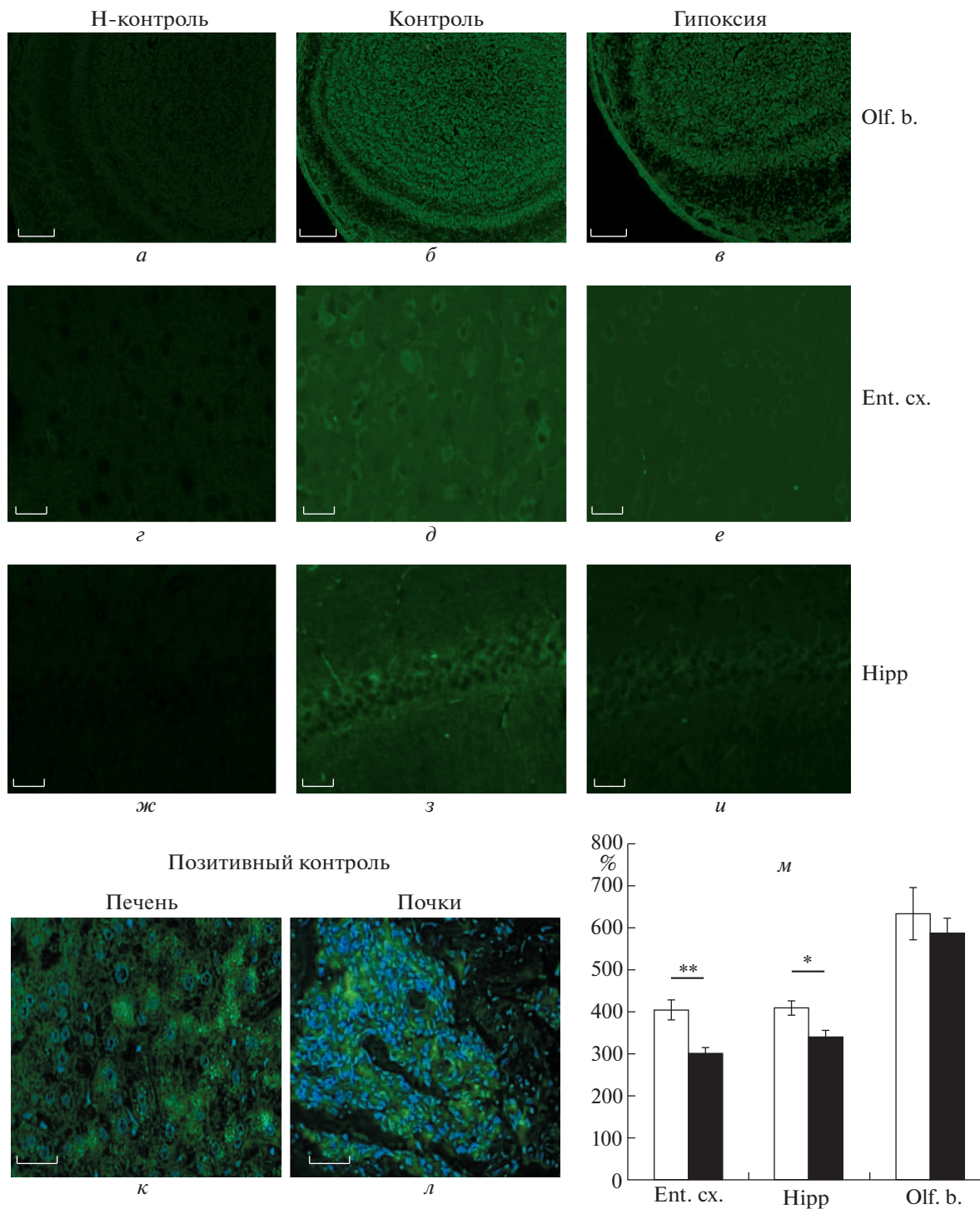
**Поведение животных.** Результаты тестирования животных в тесте поиска пищи в течение фиксированного времени показали, что в среднем у интактных крысят ( $n = 15$ ) эффективность поиска составляла  $1.83 \pm 0.06$  баллов, а у их сверстников, перенесших пренатальную гипоксию ( $n = 9$ ), этот параметр был на 43% ниже ( $p < 0.01$  при  $t = 4.1$ ) и составлял  $1.04 \pm 0.18$  балла. Более детальный анализ исследуемого поведения показал, что у крысят, перенесших пренатальную гипоксию, чаще ( $p < 0.01$  при  $U = 21$ ) наблюдается безуспешный поиск с нулевым результатом и они реже ( $p < 0.01$  при  $t = 3.5$ ) находят оба куска печенья (рис. 5).

Количество обнюхиваний отверстий в полу экспериментальной камеры в процессе поиска корма у интактных и перенесших пренатальную гипоксию животных не различалось и составляло в этих группах  $12.7 \pm 0.86$  и  $14.9 \pm 1.20$  соответственно.

## ОБСУЖДЕНИЕ

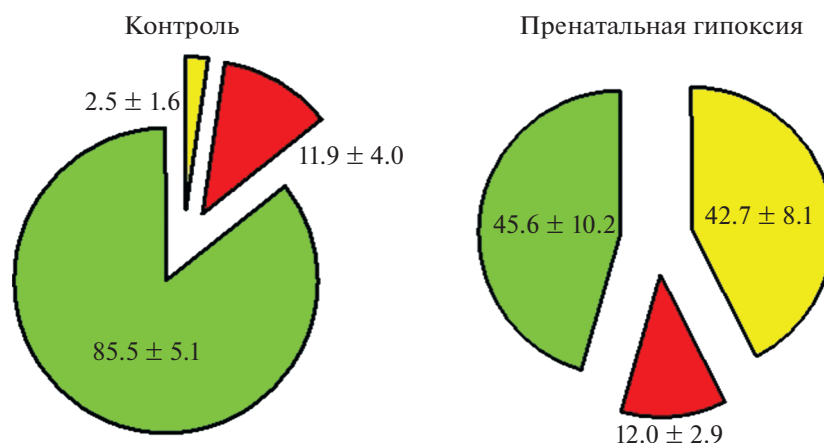
Формирование обонятельной системы начинается уже в эмбриональный период, что важно для выживания новорожденных и развития сенсорных систем мозга в раннем постнатальном периоде (Franks, Isaacson, 2005), а ее нарушения ведут к значительным перестройкам в развитии нейрональных сетей, принимающих участие в обонятельном поведении животных (Pardo et al., 2018). Проведенное нами исследование показало, что пренатальная гипоксия оказывает существенное влияние на формирование молекулярно-клеточных характеристик обонятельной системы и ее функционирование у крысят в первый месяц постнатального развития.

Известно, что обонятельный анализатор состоит из нескольких отделов. Его периферическая часть представлена рецепторными клетками, расположенными в обонятельном эпителии слизистой оболочки полости носа, и обонятельным нервом, образованным их аксонами. Волокна обонятельного нерва заканчиваются в обонятельной луковице, где происходит передача сенсорной информации на вторичные нейроны. Из обонятельной луковицы аксоны нервных клеток идут в обонятельную кору, которая делится на 5 главных областей (переднее обонятельное ядро, пириформная кора, обонятельный бугорок, кортикомедиальные части миндалины, часть энторинальной коры), каждая из которых имеет связи с центральными и лимбическими структурами. Проекция нейронов обонятельных луковиц имеют довольно широкое представительство в кортикальных структурах (Ghosh et al., 2011; Sosulski et al., 2011), их активация приводит к стимуляции клеток в



**Рис. 4** Влияние пренатальной гипоксии на распределение металлопептидазы неприлизина (FITC-позитивный сигнал зеленого цвета) в ткани обонятельных луковиц (Olf. b.), энторинальной коры (Ent. cx.) и поля СА1 гиппокампа (Hipp.) у 20-суточных крысят (б, в, д, е, з, и). а, г, ж – Негативный (Н) контроль иммуногистохимического окрашивания ткани мозга в отсутствие первичных антител к неприлизину; иммунохимическая реакция отсутствует. к–л – Примеры позитивного контроля иммунохимической реакции на неприлизин; в качестве позитивного контроля использовали ткань печени (к) и почки (л) контрольного животного, которые характеризуются высоким содержанием неприлизина (зеленый цвет FITC); ядра окрашены DAPI (синий цвет). м – Результаты денситометрического анализа яркости свечения FITC-позитивных структур в ткани энторинальной коры (Ent. cx.), поля СА1 гиппокампа (Hipp) и обонятельной луковицы (Olf. b.) 20-суточных животных с нормальным развитием (контроль, белые столбики, n = 8) и крысят, перенесших пренатальную гипоксию (черные столбики, n = 8); данные представлены в виде среднего значения и его ошибки в % от уровня среднего значения свечения FITC в ткани Н-контроля; различия между контрольной и экспериментальной группами достоверны при \* $p < 0.05$  и \*\* $p < 0.01$  (t-тест). Масштабная линейка: 100 (а–в) и 30 (г–л) мкм.





**Рис. 5.** Эффективность поиска пищи контрольными крысами ( $n = 15$ ) и крысами, перенесшими пренатальную гипоксию ( $n = 9$ ). Зеленый сектор – доля крысят, нашедших два куса корма, красный – нашедших один кусок, и желтый – доля крысят, не нашедших ни одного куса корма. Рядом с каждым сектором подписаны значения в процентах от суммарного количества животных (среднее  $\pm$  ошибка среднего). Различия между контрольной и экспериментальной группами по количеству животных, нашедших два куса корма или не нашедших ни одного куса, были статистически значимыми ( $p < 0.01$ ).

различных отделах мозга (Arzi, Sobel, 2011). С другой стороны, к обонятельной луковице подходит множество центробежных волокон из головного мозга. По этим волокнам лимбические центры модулируют активность обонятельной луковицы, и таким образом один запах может иметь разное значение в зависимости от состояния животного и поведенческого контекста.

Проведенное нами морфологическое исследование обонятельных луковиц крыс, перенесших пренатальную гипоксию, не выявило каких-либо существенных структурных изменений нейронов и волокон обонятельного тракта, а также клеток митрального слоя, аксоны которого образуют проекционные пути от обонятельных луковиц в центральные отделы мозга. Этот факт может быть связан с тем, что основная масса нейронов обонятельных луковиц формируется у крысят после 15–16-х сут эмбрионального развития (Bailey et al., 1999), а в нашей работе экспериментальное патологическое воздействие на беременных самок осуществлялось на 14-й день беременности. Тем не менее, морфологическое исследование двух отделов мозга, связанных с обонятельной функцией (энторинальной коры и гиппокампа) крысят, перенесших пренатальную гипоксию, показало патологические изменения нейронов уже на ранней стадии развития мозга (P20). Описанные нами изменения характеризуют такие патологические состояния клеток, как хроматоллиз, гиперхроматоз и скопление лизосом. Кроме того, в обеих структурах мозга наблюдали снижение количества нейронов и активацию глиальных клеток и их отростков, окру-

жающих дегенерирующие нейроны. При этом в энторинальной коре наблюдали более глубокие изменения, чем в гиппокампе.

Как было показано нами ранее, пренатальная гипоксия на сроке E14 нарушает образование и миграцию нейробластов в нижние слои энторинальной коры, что приводит к снижению в них числа нейронов (Васильев и др., 2020). Гибель проекционных нейронов энторинальной коры также может приводить к нарушению афферентации нейронов гиппокампа и, как следствие, к их дегенерации. В свою очередь, нарушение связей между энторинальной корой и гиппокампом с другими кортикальными центрами и обонятельными луковицами может изменять характер реакции животных на обонятельные стимулы.

Использованная нами методика тестирования обонятельного поведения крысят основана на поиске пищи по запаху и может отражать как мотивацию, так и состояние обонятельной системы животного (Bianchi et al., 2014). В наших исследованиях эффективность поиска пищи у животных, перенесших пренатальную гипоксию, была значительно ниже, чем у интактных сверстников, и у них результат поиска чаще оказывался нулевым и реже стопроцентным. Вместе с тем число обнюхиваний отверстий в полу экспериментальной камеры в процессе поиска корма, отражающих мотивацию, у интактных животных и перенесших пренатальную гипоксию не различалось. Этот факт позволяет сделать вывод, что пренатальная гипоксия нарушает у животных именно обонятельную функцию, а не мотивацию пище-

вого поиска. Ранее в научной литературе сообщалось о влиянии неблагоприятных пренатальных воздействий на более сложные формы обонятельного поведения, связанные с ассоциативным обучением и памятью (Тюлькова, 2010; Akers et al., 2011). Полученные нами данные демонстрируют влияние пренатальной гипоксии на выполнение поиска пищи по запаху уже на ранних этапах развития животных, что, несомненно, связано с выявленными нами морфологическими изменениями в энторинальной коре и гиппокампе.

Обонятельные луковицы являются единственной структурой мозга, в которой неприлизин синтезируется в значительных количествах еще до рождения и в первые дни жизни крыс (Dutriez et al., 1992), что свидетельствует о его важной роли в функционировании обонятельной системы. В литературе активно обсуждаются данные об участии неприлизина в регуляции пептидэргической системы головного мозга (Nalivaeva et al., 2020). Известно, что неприлизин расщепляет соматостатин – основной медиатор пептидэргической передачи в обонятельных луковицах (Nocera et al., 2019) и гиппокампе (Barnes et al., 1995). Более того, неприлизин является основным амилоид-деградирующим ферментом, и дефицит его содержания и активности играет важную роль в патогенезе БА (см. обзор: Nalivaeva, Turner, 2019). При этом энторинальная кора и гиппокамп страдают первыми от накопления  $\beta$ -амилоидного пептида в ходе развития БА (Reilly et al., 2003).

Нарушение метаболизма соматостатина в обонятельных луковицах также лежит в основе нарушения обоняния при БА (Saiz-Sanchez et al., 2010). Полученные нами результаты иммунохимического окрашивания на неприлизин в обонятельных структурах согласуются с результатами других авторов, проводивших подобные окрашивания в ткани коры головного мозга и гиппокампа (Pacheco-Quinto et al., 2016) с преимущественной пресинаптической локализацией (Fukami et al., 2002; Iwata et al., 2004) и в телах парвалбумин-позитивных нейронов (Pacheco-Quinto et al., 2016).

Как было показано нами ранее, пренатальная гипоксия приводит к снижению экспрессии и активности неприлизина в коре и гиппокампе мозга крыс (Nalivaeva et al., 2012). Полученные нами результаты о различиях характера распределения и содержания белка неприлизина в обонятельных луковицах, энторинальной коре и гиппокампе крыс, перенесших пренатальную гипоксию, указывают на наличие функциональной связи между количеством этой пептидазы, изменениями в состоянии нервной ткани и обонятельным поведением животных. Снижение содержания неприлизина в энторинальной коре и гиппокампе мозга крыс после пренатальной

гипоксии может являться предпосылкой нарушения баланса А $\beta$  в сторону его накопления, клеточной гибели и нейродегенерации. У человека такие изменения могут приводить к развитию спорадической формы БА и связанного с этим нарушением обоняния.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что нарушение обонятельной функции у молодых крыс, возникающее в результате пренатального гипоксического воздействия на 14-е сутки эмбрионального развития, может быть связано с патологическими изменениями нейронов энторинальной коры и гиппокампа и снижением в них содержания нейропептидазы неприлизина. При этом нейродегенеративные изменения в энторинальной коре животных, перенесших пренатальную гипоксию, выражены сильнее по сравнению с гиппокампом, что может свидетельствовать о более выраженном влиянии гипоксического воздействия на ее формирование.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность О.С. Алексеевой (ИЭФБ РАН) за оказание технической помощи в осуществлении гипоксического воздействия на крыс, а также Центру коллективного пользования научным оборудованием для физиологических, биохимических и молекулярно-биологических исследований (ЦКП) ИЭФБ РАН.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-015-00232) и согласно (частично) Госзаданию Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН № АААА-А18-118012290373-7.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу с животными осуществляли в соответствии с утвержденным протоколом использования лабораторных животных Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, основанного на директиве Европейского Сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными (European Communities Council Directive #86/609 for the Care of Laboratory Animals).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Н.Л. Туманова: морфологические исследования, написание статьи; Д.С. Васильев: морфологические и иммуногистохимические исследования, статистическая обработка данных; Н.М. Дубровская: поведенческие эксперименты и статистическая обработка данных, Н.Н. На-

ливаева: анализ данных, написание и редактирование текста статьи; И.А. Журавин: модель пренатальной гипоксии, общее руководство выполнением работы и оценка полученных данных. Текст и графические изображения статьи одобрены всеми соавторами.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Васильев Д.С., Туманова Н.Л., Калинина Д.С. 2020. Пренатальная гипоксия приводит к нарушению формирования нервной ткани энторинальной области коры мозга крыс. *Росс. Физиол. Журн.* Т. 106. № 10. С. 1278. (Vasilev D.S., Tumanova N.L., Kalinina D.S. 2020. Prenatal hypoxia disturbs the formation of pyramidal neurons in the entorhinal cortex of the rat brain. *Russ. J. Physiol.* V. 106. P. 1277).  
<https://doi.org/10.31857/S086981392010012X>
- Гуляева Н.В., Бобкова Н.В., Колосова Н.Г., Самохин А.Н., Степаничев М.Ю., Стефанова Н.А. 2017. Молекулярно-клеточные механизмы патогенеза спорадической формы болезни Альцгеймера: исследование *in vivo* на моделях грызунов. *Биохимия.* Т. 82. С. 1427. (Gulyaeva N.V., Bobkova N.V., Kolosova N.G., Samokhin A.N., Stepanichev M.Yu., Stefanova N.A. 2017. Molecular and cellular mechanisms of sporadic Alzheimer's disease: Studies on rodent models *in vivo*. *Biochemistry M.* V. 82. P. 1088.)  
<https://doi.org/10.1134/S0006297917100029>
- Дубровская Н.М., Журавин И.А. 2009. Онтогенетические особенности поведения крыс, перенесших гипоксию на 14-е или 18-е сутки эмбриогенеза. *Журн. Выssh. Нерв. Деят.* Т. 58. № 5. С. 616. (Dubrovskaya N.M., Zhuravin I.A. 2010. Ontogenetic characteristics of behavior in rats subjected to hypoxia on day 14 or day 18 of embryogenesis. *Neurosci. Behav. Physiol.* V. 40. P. 231).  
<https://doi.org/10.1007/s11055-009-9235-2>
- Журавин И.А., Васильев Д.С., Дубровская Н.М., Багрова Д.И., Кочкина Е.Г., Плеснева С.А., Туманова Н.Л., Наливаева Н.Н. 2010. Когнитивные расстройства в онтогенезе млекопитающих при нарушении пренатального развития. *Психиатрия.* Т. 4. № 46. С. 36. (Zhuravin I.A., Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Bagrova D.I., Kochkina E.G., Plesneva S.A., Tumanova N.L., Nalivaeva N.N. 2010. Cognitive impairments in ontogenesis of mammals after disturbed prenatal development. *Psikhiatriia.* V. 4. № 46. P. 36.)
- Морозова С.В., Савватеева Д.М., Петрова Е.И. 2014. Обонятельные расстройства у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями. *Неврологический журн.* № 1. С. 4. (Morozova S.V., Savvateeva D.M., Petrova E.I. 2014. *Nevrologicheskii zhurnal.* № 1. P. 4.)
- Наливаева Н.Н., Бабусикова Е., Доброта Д., Тернер А. 2005. Влияние ишемии и реперфузии на содержание предшественника амилоидного пептида и продуктов его протеолиза в гиппокампе крыс. *Нейрохимия.* Т. 22. № 3. С. 207. (Nalivaeva N.N., Babusikova E., Dobrota D., Turner A.J. 2005. Effect of ischaemia and reperfusion on the content and degradation of amyloid precursor protein in the hippocampus of rats. *Neurochem. J.* V. 22. P. 207.)
- Туманова Н.Л., Васильев Д.С., Дубровская Н.М., Журавин И.А. 2018. Ультраструктурные изменения в сенсомоторной коре при отставании развития двигательного поведения в раннем онтогенезе крыс, перенесших пренатальную гипоксию. *Цитология.* Т. 60. № 5. С. 390. (Tumanova N.L., Vasiliev D.S., Dubrovskaya N.M., Zhuravin I.A. 2018. Changes in ultrastructure of the sensorimotor cortex accompanied by the motor behavior dysfunctions in the early ontogenesis of rats subjected to the prenatal hypoxia. *Tsitologiya.* V. 60. P. 390.)  
<https://doi.org/10.31116/tsitol.2018.05.09>
- Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Самойлов М.О., Отеллин В.А. 2010. Механизмы формирования реакций мозга на действие гипербарической гипоксии в различные сроки пренатального периода развития у крыс. *Журн. акушерства и женских болезней.* Т. 59. № 4. С. 99. (Tul'kova E.I., Vataeva L.A., Samoilov M.O., Otellin V.A. 2010. Mechanisms of formation of brain reactions to hypobaric hypoxia in different periods of prenatal development of rats. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznei.* V. 59. P. 99.)
- Akers K.G., Kushner S.A., Leslie A.T., Clarke L., van der Kooy D., Lerch J.P., Frankland P.W. 2011. Fetal alcohol exposure leads to abnormal olfactory bulb development and impaired odor discrimination in adult mice. *Mol. Brain.* V. 4. P. 29. <http://www.molecularbrain.com/content/4/1/29>
- Arzi A., Sobel N. 2011. Olfactory perception as a compass for olfactory neural maps. *Trends Cogn. Sci.* V. 15. P. 537.  
<https://doi.org/10/1016/j.tics.2011.09.007>
- Barnes K., Doherty S., Turner A.J. 1995. Endopeptidase-24.11 is the integral membrane peptidase initiating degradation of somatostatin in the hippocampus. *J. Neurochem.* V. 64. P. 1826.  
<https://doi.org/10/1046/j.1471-4159.1995.64041826.x>
- Barresi M., Ciurleo R., Giacoppo S., Foti Cuzzola V., Celi D., Bramanti P., Marino S. 2012. Evaluation of olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases. *J. Neurol. Sci.* V. 323. P. 16.  
<https://doi.org/10/1016/j.jns.2012.08.028>
- Bailey M.S., Puche A. C., Shipley M. T. 1999. Development of the olfactory bulb: Evidence for glia-neuron interactions in glomerular formation. *J. Comp. Neurol.* T. 415. № 4. P. 423–448.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19991227\)415:4<423::AID-CNE2>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19991227)415:4<423::AID-CNE2>3.0.CO;2-G)
- Bianchi P., Bettini S., Guidi S., Ciani E., Trazzi S., Stagni F., Ragazzi E., Franceschini V., Bartesaghi R. 2014. Age-related impairment of olfactory bulb neurogenesis in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Exp. Neurol.* V. 251. P. 1.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.10.018>
- Carnemolla S.E., Hsieh J.W., Sipione R., Landis B.N., Kumfor F., Piguet O., Manuel A.L. 2020. Olfactory dysfunction in frontotemporal dementia and psychiatric disorders: A systematic review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* V. 118. P. 588.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.08.002>
- Djordjevic J., Jones-Gotman M., De Sousa K., Chertkow H. 2008. Olfaction in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* V. 29. P. 693.  
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.11.014>

- Doty R.L.* 2012. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* V. 8. P. 329.  
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.80>
- Dutriez I., Salès N., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P.* 1992. Pre- and post-natal ontogeny of neutral endopeptidase 24-11 (“enkephalinase”) studied by in vitro autoradiography in the rat. *Experientia.* V. 48. P. 290.  
<https://doi.org/10.1007/BF01930479>
- Franks K.M., Isaacson J.S.* 2005. Synapse-specific downregulation of NMDA receptors by early experience: a critical period for plasticity of sensory input to olfactory cortex. *Neuron.* V. 47. P. 101.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.024>
- Fukami S., Watanabe K., Iwata N., Haraoka Jo, Bao Lu, Gerard N.P., Gerard C., Fraser P., Westaway D., St. George-Hyslop P., Saido T.C.* 2002. A $\beta$ -degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse brain: synaptic and axonal localization inversely correlating with A $\beta$  pathology. *Neurosci. Res.* V. 43. P. 39.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(02\)00015-9](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(02)00015-9)
- Ghosh S., Larson S.D., Hefzi H., Marnoy Z., Cutforth T., Dokka K., Baldwin K.K.* 2011. Sensory maps in the olfactory cortex defined by long-range viral tracing of single neurons. *Nature.* V. 472. P. 217.  
<https://doi.org/10.1038/nature09945>
- Iwata N., Mizukami H., Shirotani K., Takaki Y., Muramatsu S., Lu B., Gerard N.P., Gerard C., Ozawa K., Saido T.C.* 2004. Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid- $\beta$  peptide in mouse brain. *J. Neurosci.* V. 24. P. 991.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4792-03.2004>
- Liu B., Luo Z., Pinto J.M., Shiroma E.J., Tranah G.H., Wirdfeldt K., Fang F., Harris T.B., Chen H.* 2019. Relationship between poor olfaction and mortality among community-dwelling older adults: A cohort study. *Ann. Intern. Med.* V. 170. P. 673.  
<https://doi.org/10.7326/M18-0775>
- Murphy C.* 2019. Olfactory and other sensory impairments in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* V. 15. P. 11.  
<https://doi.org/10.1038/s41582-018-0097-5>
- Nalivaeva N.N., Belyaev N.D., Lewis D.I., Pickles A.R., Makova N.Z., Bagrova D.I., Dubrovskaya N.M., Plesneva S.A., Zhuravin I.A., Turner A.J.* 2012. Effect of sodium valproate administration on brain neprilysin expression and memory in rats. *J. Mol. Neurosci.* V. 46. P. 569.  
<https://doi.org/10.1007/s12031-011-9644-x>
- Nalivaeva N.N., Fisk L., Kochkina E.G., Plesneva S.A., Zhuravin I.A., Babusikova E., Dobrota D., Turner A.J.* 2004. Effect of hypoxia/ischemia and hypoxic preconditioning/reperfusion on expression of some amyloid-degrading enzymes. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* V. 1035. P. 21.  
<https://doi.org/10.1196/annals.1332.002>
- Nalivaeva N.N., Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Turner A.J., Zhuravin I.A.* 2020. Role of neprilysin in synaptic plasticity and memory. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* Т. 106. № 10. С. 1191. (*Ross. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova.* V. 106. № 10. P. 1191.)  
<https://doi.org/10.31857/S0869813920100076>
- Nalivaeva N.N., Turner A.J.* 2019. Targeting amyloid clearance in Alzheimer’s disease as a therapeutic strategy. *Br. J. Pharmacol.* V. 176. P. 3447.  
<https://doi.org/10.1111/bph.14593>
- Nocera S., Simon A., Fiquet O., Chen Y., Gascuel J., Datiche F., Schneider N., Epelbaum J., Viollet C.* 2019. Somatostatin serves a modulatory role in the mouse olfactory bulb: neuroanatomical and behavioral evidence. *Front. Behav. Neurosci.* V. 13. P. 61.  
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00061>
- Pacheco-Quinto J., Eckman Ch.B., Eckman E.A.* 2016. Major amyloid- $\beta$  degrading enzymes endothelin-converting enzyme-2 and neprilysin are expressed by distinct populations of GABAergic interneurons in hippocampus and neocortex. *Neurobiol. Aging.* V. 48. P. 83.  
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.011>
- Pardo G.V.E., Lucion A.B., Calcagnotto M.E.* 2018. Postnatal development of inhibitory synaptic transmission in the anterior piriform cortex. *Int. J. Dev. Neurosci.* V. 71. P. 1.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.07.008>
- Paxinos G., Watson C.* 2005. The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam—Boston: Elsevier AP.
- Reilly J.F., Games D., Rydel R.E., Freedman S., Schenk D., Young W.G., Morrison J.H., Bloom F.E.* 2003. Amyloid deposition in the hippocampus and entorhinal cortex: quantitative analysis of a transgenic mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 100. P. 4837.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0330745100>
- Saiz-Sanchez D., Ubeda-Bañon I., de la Rosa-Prieto C., Argandoña-Palacios L., Garcia-Muñozguren S., Insausti R., Martínez-Marcos A.* 2010. Somatostatin, Tau, and  $\beta$ -amyloid within the anterior olfactory nucleus in Alzheimer disease. *Exp. Neurol.* V. 223. P. 347.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.06.010>
- Sosulski D.L., Lissitsyna Bloom M., Cutforth T., Axel R., Datta S.R.* 2011. Distinct representations of olfactory information in different cortical centres. *Nature.* V. 472. P. 213.  
<https://doi.org/10.1038/nature09868>
- Sun S., Li T., Davies H., Li W., Yang J., Li S., Ling S.* 2016. Altered morphologies and functions of the olfactory bulb and hippocampus induced by miR-30c. *Front. Neurosci.* V. 10. P. 207.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00207>
- Thomann P., Dos Santos V., Toro P., Schönknecht P., Essig M., Schröder J.* 2009. Reduced olfactory bulb and tract volume in early Alzheimer’s disease — a MRI study. *Neurobiol. Aging.* V. 30. P. 838.  
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.08.001>
- Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Tumanova N.L., Zhuravin I.A.* 2016. Prenatal hypoxia in different periods of embryogenesis differentially affects cell migration, neuronal plasticity, and rat behavior in postnatal ontogenesis. *Front. Neurosci.* V. 10. P. 126.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00126>
- Wang J., Eslinger P.J., Doty R.L., Zimmerman E.K., Grunfeld R., Sun X., Meadowcroft M.D., Connor J.R., Price J.L., Smith M.B., Yang Q.X.* 2010. Olfactory deficit detected by fMRI in early Alzheimer’s disease. *Brain Res.* V. 1357. P. 184.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.018>

## Effect of Prenatal Hypoxia on Cytoarchitectonics and Ultrastructural Organisation of Brain Regions Related to Olfaction in Rats

N. L. Tumanova<sup>a</sup>, D. S. Vasilev<sup>a,\*</sup>, N. M. Dubrovskaya<sup>a</sup>, N. N. Nalivaeva<sup>a</sup>, and I. A. Zhuravin<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223 Russia*

*\*e-mail: dvasilyev@bk.ru*

Using light and electron microscopy it was shown that on the 20<sup>th</sup> day after birth in rats subjected to prenatal hypoxia on E14 (7% O<sub>2</sub>, 3 h) in the central parts of the olfactory system – the hippocampus and entorhinal cortex, there were significant neurodegenerative changes and decreased number of neurones, while in the peripheral part of the olfactory system, namely olfactory bulbs, no changes were observed. Immunohistochemical analysis also revealed changes in the content and distribution of a metallopeptidase, neprilysin (NEP), in the entorhinal cortex and hippocampus of rats subjected to prenatal hypoxia. These data allow us to conclude that the impairment of the olfactory function in young rats, caused by maternal hypoxia during pregnancy and manifested itself as worsened performance in the food search task, is underlined by the pathological changes in the cells of the olfactory system as well as by the decreased content of NEP.

**Keywords:** entorhinal cortex, hippocampus, neurodegeneration, olfactory behavior, olfactory bulbs, ontogenesis, neprilysin, prenatal hypoxia