

# ЗНАЧЕНИЕ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА СЕМЕЙСТВА HSP70 ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПОСТРЕАНИМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МОЗГА

И. В. Острова, В. В. Мороз, М. Ш. Аврущенко

ГУ НИИ общей реаниматологии РАМН, Москва

## Significance of Immunohistochemical Studies of Heat Shock Proteins of the HSP70 Family in the Investigation of Postresuscitative Brain Changes

I. V. Ostrova, V. V. Moroz, M. Sh. Avrushchenko

Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

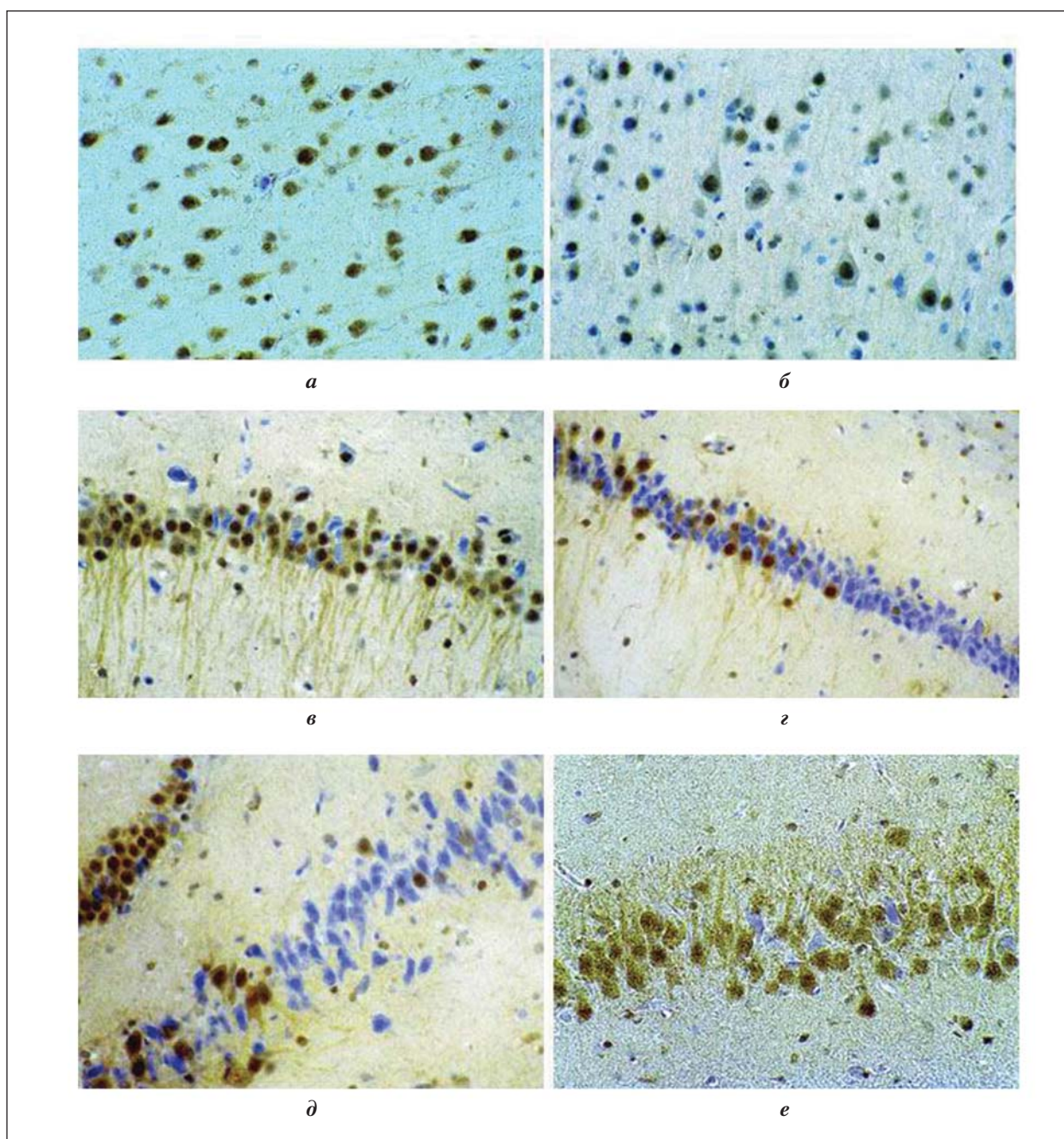
**Цель исследования** — оценить иммунореактивность различных нейрональных популяций к белкам теплового шока семейства HSP70 и выявить ее взаимосвязь с выраженностью морфологических изменений нейронов в постреанимационном периоде. **Материалы и методы.** Проведено комплексное иммуноцитохимическое и морфометрическое исследование состояния высокочувствительных к гипоксии нейрональных популяций пирамидных нейронов слоя V сенсомоторной коры большого мозга и секторов CA1, CA4 гиппокампа в динамике постреанимационного периода после 12-минутной остановки сердца. Иммунореактивность к белкам теплового шока определяли непрямой пероксидазно-антипероксидазным методом с использованием поликлональных антител к HSP70. Плотность и состав нейрональных популяций определяли с помощью морфометрического анализа. **Результаты.** Показано, что исходная иммунореактивность нейрональных популяций к HSP70 является важным фактором ее устойчивости к ишемическим повреждениям. Определена динамика постреанимационных сдвигов иммунореактивности нейрональных популяций к HSP70 и установлена ее взаимосвязь с развитием дистрофических изменений нервных клеток. Обсуждается перспективность комплексных иммуноцитохимических и морфометрических исследований для изучения механизмов постреанимационной патологии мозга. **Заключение.** В целом результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что роль HSP70 в поддержании гомеостаза нейрональных популяций более сложная и многофакторная, чем полагали ранее, и, по-видимому, не ограничивается только чисто нейропротективными свойствами. Высокое исходное содержание HSP70 вносит существенный вклад в устойчивость нейрональных популяций к ишемии-реперфузии, а сдвиги HSP70-иммунореактивности тесно связаны с развитием патологических изменений нервных клеток в ходе постреанимационного процесса. **Ключевые слова:** остановка сердца, иммуногистохимия, белки теплового шока, дистрофические изменения нервных клеток, морфометрия.

**Objective:** to evaluate the immunological responsiveness of various neuronal populations of heat shock proteins of the HSP 70 family and to reveal their association with the magnitude of postresuscitative neuronal morphological changes. **Materials and methods.** The hypoxia-highly sensitive neuronal populations of pyramidal neurons in the layer of the fifth cerebral sensorimotor cortex and hippocampal sectors CA1 and CA4 throughout the postresuscitative period after 12-minute cardiac arrest were subject to a complex immunocytochemical and morphometric study. Their immunological responsiveness to the thermal shock proteins was determined by the indirect peroxidase-antiperoxidase test using the polyclonal antibodies to HSP70. The density and composition of neuronal populations were ascertained by the morphometric assay. **Results.** The baseline immunological responsiveness of neuronal populations has been demonstrated to be an important factor of its resistance to ischemic lesions. The authors have determined a trend in postresuscitative changes in the immunological responsiveness of neuronal populations to HSP70 and established its association with the development of nerve cell dystrophic changes. They discuss whether complex immunocytochemical and morphometric studies are promising in investigating the mechanisms of postresuscitative brain abnormality. **Conclusion.** By and large, the findings suggest that the role of HSP70 in maintaining the homeostasis of neuronal populations is more complex and multifactorial, as earlier considered, and it is unlikely to be restricted itself to only merely neuroprotective properties. The high baseline content of HSP70 makes a considerable contribution to the resistance of neuronal populations to ischemia-reperfusion; and the changes in the immunological responsiveness to HSP70 are closely associated with the development of pathological nerve cell changes during a postresuscitative process. **Key words:** cardiac arrest, immunohistochemistry, heat shock proteins, nerve cell dystrophic changes, morphometry.

Одной из важнейших задач реаниматологии является полноценное восстановление мозга [1]. Ранее было показано, что восстановление функции ЦНС после клинической смерти тесно взаимосвязано с глубиной и выраженностью изменений, развивающихся на уровне нейрональных популяций [2]. Это обуславливает необ-

ходимость изучения механизмов и закономерностей постреанимационных изменений состояния нейрональных популяций.

Среди многочисленных механизмов постишемического повреждения нейронов одним из наиболее существенных считается нарушение белкового метабо-



**Рис. 1.** Иммунореактивность к HSP70 в различных нейрональных популяциях у intactных животных и в постреанимационном периоде (непрямой пероксидазно-антипероксидазный метод с докраской гематоксилином).

**a** – слой V сенсомоторной коры в норме; **б** – слой V сенсомоторной коры в постреанимационном периоде; **в** – сектор CA1 гиппокампа в норме; **г** – сектор CA1 гиппокампа в постреанимационном периоде; **д** – сектор CA4 гиппокампа в норме; **е** – сектор CA4 гиппокампа в постреанимационном периоде.

лизма [3–5]. При этом большое значение имеют не только количественные, но и качественные сдвиги в процессе синтеза белка, а именно – изменение спектра синтезируемых белков [6–8]. Согласно современным представлениям, существенное значение в развитии ишемических и реперфузионных процессов имеют белки теплового шока семейства HSP70, которые вырабатываются при разных видах стрессорных воздействий и играют важную роль в защите, восстановлении и адаптации клеток [9, 10]. Исследования на различных моделях изолированной ишемии мозга

свидетельствуют о наличии выраженных постишемических изменений экспрессии индуцибельной формы HSP70. При этом одни авторы полагают, что белки семейства HSP70 – хороший индикатор общего патофизиологического стресс-ответа на ишемию, но не всегда маркер нейронального выживания [11], другие – что эти белки являются нейропротекторами [10, 12, 13]. В то же время остается неясным, какие сдвиги происходят в мозге и, в частности, в высоко чувствительных к гипоксии нейрональных популяциях, после тотальной ишемии организма (клинической смерти).

Не исследовано также и значение исходного уровня иммунореактивности к HSP70 нейрональных популяций в их устойчивости к ишемии-реперфузии.

Целью настоящей работы была оценка иммунореактивности различных нейрональных популяций к белкам теплового шока семейства HSP70 и выявление ее взаимосвязи с выраженностью морфологических изменений нейронов в постреанимационном периоде.

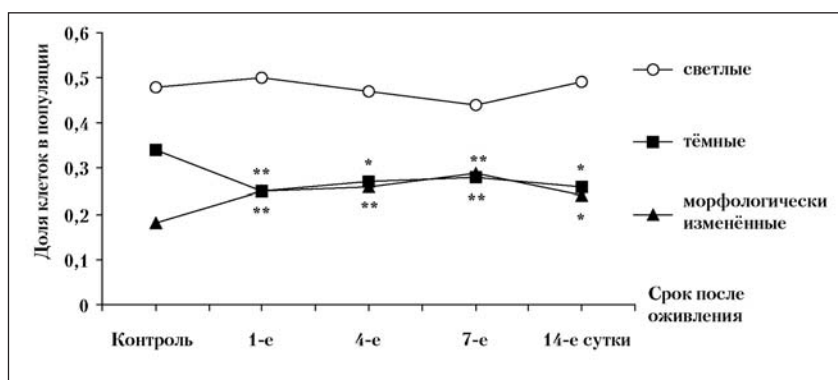


Рис. 2. Изменение состава популяции пирамидных клеток сектора СА4 в постреанимационном периоде после 12-минутной остановки сердца.  
\* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$  в сравнении с контролем.

### Материалы и методы

Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 160–190 г. Остановку системного кровообращения на 12 минут вызывали у животных под эфирным наркозом путем внутриторакального пережатия сосудистого пучка сердца [14]. Оживление осуществляли непрямым массажем сердца в сочетании с искусственной вентиляцией легких воздухом при внутритрахеальном введении раствора адреналина в дозе 0,1 мг/кг.

После забоя животных под эфирным наркозом немедленно выделяли образцы мозга, которые после стандартной обработки заливали в парафин. С парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 5 мкм. Исследовали популяции пирамидных нейронов секторов СА1 и СА4 гиппокампа, V слоя сенсомоторной коры через 1, 4, 7, 14-е сутки после остановки сердца (по 5 животных на каждый срок постреанимационного периода). Контролем к каждой группе подопытных крыс служили интактные животные соответствующего возраста.

Иммунореактивность к HSP70 в популяциях пирамидных нейронов гиппокампа и коры определяли непрямым пероксидазно-антипероксидазным методом с помощью поликлональных антител против HSP70 (1:500, DAKO, Denmark), позволяющих выявить как конститутивную, так и индуцибельную его формы. Эндогенную пероксидазную активность блокировали с помощью Peroxidase Block (DAKO, Denmark). После инкубации срезов с первичными (на ночь при +4°C) и вторичными (1 час при комнатной температуре) антителами (DAKO, Denmark) выявляли иммунную реакцию инкубацией в растворе 3,3-диаминобензидина (DAKO, Denmark) в течение 10 мин. Срезы докрашивали гематоксилином (Shandon, USA) и заключали в ImmuMount (Shandon, USA). Иммуногистохимическую реакцию контролировали инкубацией срезов со всеми реагентами кроме первичных антител.

Определяли плотность и состав нейрональных популяций пирамидных клеток разных отделов гиппокампа (сектора СА1 и СА4) и слоя V сенсомоторной области коры большого мозга с помощью метода дифференцированного морфометрического анализа, позволяющего количественно оценить глубину и выраженность повреждения мозга по степени вовлечения в патологический процесс различных элементов гетерогенных нейрональных популяций (светлые клетки — реактивные, темные — более стабильные) [2].

Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Результаты иммуногистохимического анализа показали, что исследованные нейрональные популяции су-

щественно отличаются по исходному содержанию иммунореактивных клеток. Так, у интактных животных в секторе СА4 гиппокампа только около 20% пирамидных клеток были HSP70-иммуноположительными (рис. 1, д), а в секторе СА1 иммунореактивность выявлялась в 80% нейронов (рис. 1, в). В популяции пирамидных клеток слоя V сенсомоторной коры подавляющее большинство нейронов (более 90%) характеризовалось высокой иммунореактивностью (рис. 1, а).

Результаты морфометрического анализа позволили выявить взаимосвязь между исходной иммунореактивностью исследованных нейрональных популяций к HSP70 и их ранимостью в постреанимационном периоде. Установлено, что общая плотность нейрональных популяций пирамидных клеток секторов СА1, СА4 гиппокампа и слоя V коры не изменялась, что свидетельствовало об отсутствии гибели нейронов (по крайней мере в течение 14-и суток постреанимационного периода). Однако, развивались дистрофические изменения нервных клеток. При этом в разных нейрональных популяциях патологические сдвиги были неодинаковыми по выраженности, глубине и динамике. Так, в секторе СА4 гиппокампа уже сразу после оживления (1-е сутки) дистрофическим изменениям подвергались темные нейроны: их доля в популяции уменьшалась, а доля морфологически измененных клеток увеличивалась (на 27,0 и 38,3%, соответственно). К 4-м суткам постреанимационного периода нарушения состава популяции сохранялись, а к 7-м — усиливались (увеличение доли морфологически измененных нейронов на 60,6%). К 14-м суткам после оживления у реанимированных животных в исследованной нейрональной популяции сохранялись выраженные нарушения ее состава (доля темных нейронов была снижена, а доля морфологически измененных клеток — повышена) (рис. 2).

В секторе СА1 гиппокампа через 1 сутки после оживления дистрофическим изменениям подвергались только светлые клетки (их доля в популяции снижалась на 5,9% при повышении доли морфологически измененных клеток на 33,3%). К 4-м суткам постреанимационного периода выявленные нарушения сохранялись (доля светлых нейронов уменьшена на 7,0%, а доля морфологически измененных нейронов увеличена на

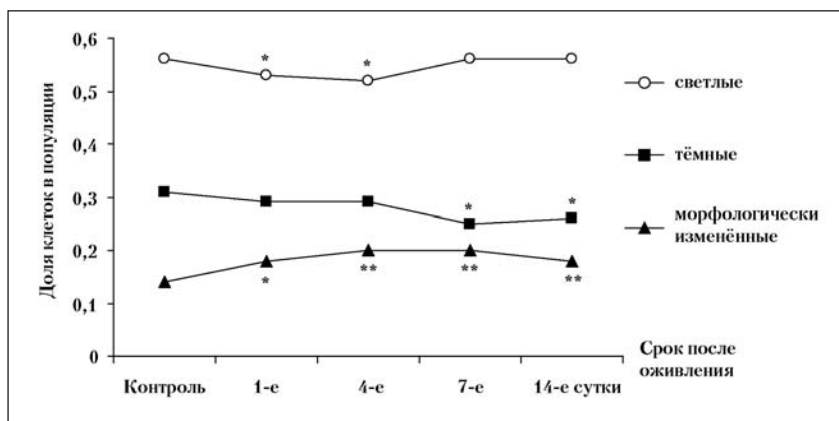


Рис. 3. Изменение состава популяции пирамидных клеток сектора СА1 в постреанимационном периоде после 12-минутной остановки сердца.

\* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$  в сравнении с контролем.

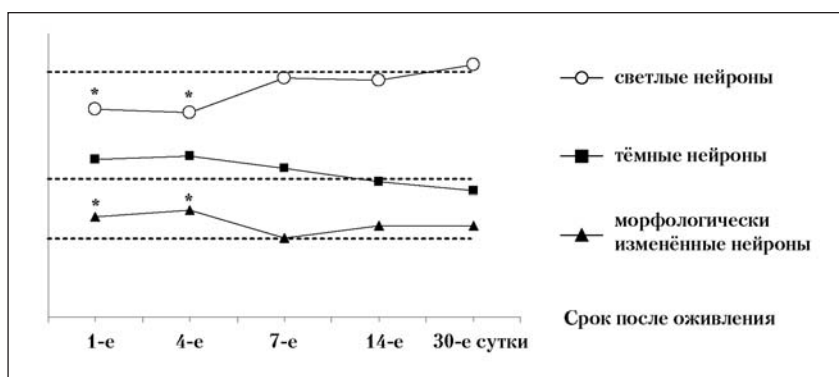


Рис. 4. Постреанимационные изменения доли нейронов разных типов в популяции пирамидных клеток слоя V сенсомоторной коры (в % от контроля).

44,4%). Дистрофические изменения темных нейронов развивались только через 7 суток после реанимации (снижение доли темных нейронов на 19,9% и увеличение доли морфологически измененных клеток на 31,5%) и сохранялись на 14-е сутки после оживления (доля темных нейронов была уменьшена на 14,4%, а доля морфологически измененных нейронов — увеличена на 35,6%) (рис. 3).

В слое V коры через 1 сутки после оживления у реанимированных крыс происходило уменьшение доли только светлых нейронов (на 17,8%) при увеличении доли морфологически измененных клеток (на 20,9%). Спустя 4 суток после оживления выявленные нарушения состава популяции сохранялись (доля светлых нейронов снижена на 18,6%, а морфологически измененных клеток — увеличена на 20,9%), Однако, уже к 7-м суткам постреанимационного периода состав исследованной популяции нормализовался, и не изменялся к 14-м суткам (рис. 4).

Итак, результаты морфометрического анализа позволили установить, что в исследованных нейрональных популяциях выраженность постреанимационных изменений неодинакова. В популяции пирамидных нейронов слоя V сенсомоторной коры наблюдались наименьшие повреждения (дистрофические изменения наиболее реактивных — светлых ней-

нов), причем эти нарушения носили транзиторный характер, и состав популяции нормализовался уже в раннем постреанимационном периоде (между 4-ми и 7-ми сутками). В популяции пирамидных клеток сектора СА1 гиппокампа постреанимационные сдвиги были более глубокими и длительными: хотя сначала дистрофическим изменениям подвергались только светлые клетки, но позднее в патологический процесс вовлекались уже и более стабильные темные нейроны. В секторе СА4 гиппокампа выявлены наиболее выраженные постреанимационные сдвиги состава нейрональной популяции — в процесс сразу вовлекались наиболее стабильные ее элементы — темные нейроны, причем в ходе постреанимационного процесса выявленные нарушения нарастали. Неодинаковая постреанимационная ранимость нейрональных популяций даже в пределах одного отдела мозга была показана нами и при клинической смерти другой этиологии [15], а также после остановки сердца разной длительности [16].

Проведенные ранее исследования [17, 18] свидетельствуют о взаимосвязи селективной чувствительности нервных клеток к ишемии с уровнем белкового метаболизма в ткани, нейронах и глие разных отделов мозга. Сопоставление данных иммуноцитохимических исследований и морфометрического анализа, проведенное в настоящей работе, позволяет полагать, что в феномене неодинаковой устойчивости нейрональных популяций к ишемии-реперфузии важную роль играет также уровень экспрессии HSP70. При этом выявляется прямая взаимосвязь между исходной иммунореактивностью популяции и ее устойчивостью к постреанимационным повреждениям. Действительно, как было показано выше, наименее ранимая популяция пирамидных клеток V слоя коры исходно характеризовалась наиболее высоким уровнем экспрессии HSP70, а наиболее подверженная постреанимационным изменениям популяция пирамидных клеток сектора СА4 — наименьшей иммунореактивностью. Следовательно, можно полагать, что высокое содержание в нейрональной популяции клеток, экспрессирующих конститутивную форму HSP70, является важным фактором обеспечения ее устойчивости к ишемии-реперфузии.

Изучение динамики изменений иммунореактивности к HSP70 у реанимированных животных позволило установить, что исследованные нейрональные

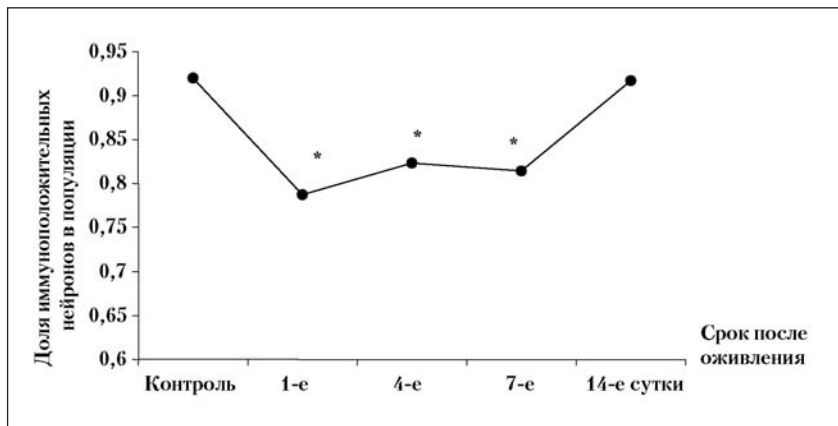


Рис. 5. Динамика постреанимационных изменений доли иммунореактивных элементов в популяции пирамидных клеток слоя V сенсомоторной коры.

\* —  $p < 0,05$  в сравнении с контролем.

популяции существенно различаются также по направлению и выраженности ее постреанимационных сдвигов. Так, в секторе СА1 иммунореактивность популяции пирамидных клеток существенно повышалась только к 4-м суткам постреанимационного периода, но уже к 7-м суткам падала ниже контрольного уровня (рис. 1, з). В секторе СА4 иммунореактивность популяции пирамидных клеток резко возрастала уже к 1-м суткам постреанимационного периода, достигала максимума к 7-м суткам и оставалась повышенной даже на 14-е сутки (рис. 1, е).

Увеличение содержания иммунореактивных клеток в гиппокампе на ранних сроках постреанимационного периода, по-видимому, обусловлено индукцией синтеза HSP72, поскольку в отличие от конститутивной формы белка теплового шока (HSP73), его индуцибельная форма (HSP72) в норме не выявляется в головном мозге крысы [9]. Данные о повышении уровня экспрессии HSP72 получены и на моделях изолированной ишемии мозга, а также при других экспериментальных воздействиях [9, 11, 13].

Сопоставление динамики развития дистрофических сдвигов в нейрональных популяциях с данными иммуногистохимического анализа показало, что увеличение доли морфологически измененных клеток в гиппокампе сопровождается повышением числа иммунореактивных нейронов. Так, в секторе СА1 максимальное увеличение доли морфологически измененных нейронов происходило на 4-е сутки, а в секторе СА4 — на 7-е сутки после оживления. Именно на этих сроках выявлено наибольшее содержание иммуноположительных нейронов в данных нейрональных популяциях. Полученные факты свидетельствуют о том, что повышение HSP70-иммунореактивности является, по-видимому, индикатором уровня дистрофических изменений в нейрональной популяции.

Вместе с тем, согласно результатам настоящей работы, углубление патологических сдвигов (например, вовлечение в процесс наиболее стабильных темных клеток в секторе СА1 на 7-е сутки после оживления) происходит на фоне резкого снижения доли иммунореактивных

клеток в нейрональной популяции. Аналогично этому, в слое V сенсомоторной коры также обнаружено, что развитие дистрофических изменений нервных клеток сопровождается уменьшением доли HSP70-иммунореактивных нейронов в популяции на ранних сроках после реанимации. Количественный анализ показал, что через 1 сутки после реанимации в сравнении с контролем доля иммуноположительных нормальных нейронов в популяции слоя V коры существенно уменьшается и остается сниженной до 7-х суток постреанимационного периода.

Только к 14-м суткам после оживления доля иммуноположительных нейронов в популяции возрастает, возвращаясь к контрольному уровню (рис. 5). Полученные данные свидетельствуют в пользу представлений о нейропротективных свойствах белков теплового шока. Значение HSP как нейропротектора было показано и при исследованиях его индуцибельной формы на различных моделях изолированной ишемии мозга [9, 19], а также на трансгенных животных [10, 20, 21]. Нейропротективное действие HSP70 связывают с его участием в утилизации и репарации поврежденных белков [22], в противовоспалительном ответе [23], а также в блокировании процессов клеточной гибели [10]. В настоящее время разрабатываются экспериментальные подходы к использованию HSP70 в терапии постишемических и нейродегенеративных заболеваний [10, 13, 24].

Таким образом, в настоящей работе установлены новые факты, свидетельствующие о значении исходной иммунореактивности нейрональных популяций к белкам теплового шока и взаимосвязи ее постреанимационных изменений с развитием дистрофических повреждений нейронов. Применение иммуноцитохимических методов, позволяющих выявлять топографию исследуемых антигенов в нейрональных популяциях, отдельных нервных клетках и их компартментах в сочетании с морфометрическим анализом, позволяющим количественно оценить состояние нейрональных популяций, представляются весьма перспективными для изучения механизмов постреанимационной патологии мозга. Такой комплексный подход дает возможность оценивать исходную иммунореактивность к различным стресс-белкам и индуцируемыми ишемией-реперфузией факторам; выявлять отличия в иммунореактивности между разными элементами нервной ткани и нейрональными популяциями; проводить сопоставления динамики постреанимационных сдвигов дистрофических изменений нервных клеток и с их иммунореактивностью; изучать общие закономерности и индивидуально-типологические особенности развития постреанимационного процесса. В перспективе это позволит разработать новые экспериментальные подходы для защиты мозга при профилактике и лечении постреанимационных энцефалопатий.

## Литература

1. *Неговский В. А., Мороз В. В.* Актуальные проблемы реаниматологии на рубеже XXI века. В кн.: Тез. докл. 2 Рос. конгр. по патофизиологии, 9-12 окт. 2000 г. М.: Медицина; 2000. 302.
2. *Аврущенко М. Ш.* Изменение гетерогенных нейронных популяций в постреанимационном периоде после остановки сердца у крыс. Анестезиология и реаниматология 1994; 5: 41–44.
3. *Lipton P., Raley-Susman K. M.* Autoradiographic measurements of protein synthesis in hippocampal slices from rats and guinea pigs. *Methods* 1999; 18 (2): 127–143.
4. *Neuman R. W.* Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Ann. Emerg. Med.* 2000; 36 (5): 483–505.
5. *White B., Sullivan J., DeGracia D. et al.* Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J. Neurol. Sci.* 2000; 179: 1–33.
6. *Yao X.-H., Yu H.-V., Koide S., Li X.-J.* Identification of a kay protein associated with cerebral ischemia. *Brain Res.* 2003; 967 (1–2): 11–18.
7. *Liu M., Alkaed N.* Hypoxic preconditioning and tolerance via hypoxia inducible factor (HIF) 1 $\alpha$ -linked induction of P450 2C11 epoxygenase in astrocytes. *J. Cereb. Blood Metab.* 2005; 25 (8): 939–948.
8. *Jin K., Mao X., Eshoo M. et al.* Microarray analysis of hippocampal gene expression in global cerebral ischemia. *Ann. Neurol.* 2001; 50 (1): 93–103.
9. *Fredduzzi S., Mariucci M. T., Ambrosini M. V.* Generalized induction of 72-kDa heat-shock protein after transient focal ischemia in rat brain. *Exp. Brain Res.* 2001; 136: 19–24.
10. *Giffard R., Lijun Xu., Heng Zh. et al.* Chaperones, protein aggregation, and brain protection from hypoxic/ischemic injury. *J. Experim. Biol.* 2004; 207: 3213–3220.
11. *Bottiger B.W., Schmitz B., Wiessner C. et al.* Neuronal stress response and neuronal cell damage after cardiopulmonary arrest in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1998; 18: 1077–1087.
12. *Kita T.* The role of heat shock proteins on the disordered tissues: implication for the pathogenesis and diagnostics in the forensic practice. *Nippon Hoigaku Zasshi* 2000; 54: 367–371.
13. *Franklin T. B., Krueger-Naug A. M., Clarke D. B. et al.* The role of heat shock proteins Hsp70 and Hsp27 in cellular protection of the central nervous system. *Int. J. Hyperthermia* 2005; 21 (5): 379–392.
14. *Корпачев В. Г., Лысенков С. П., Тель Л. З.* Моделирование клинической смерти и постреанимационной болезни у крыс. Патол. физиология и эксперим. терапия 1982; 3: 78–80.
15. *Аврущенко М. Ш.* Изучение популяции клеток Пуркинье коры мозжечка собак, перенесших остановку системного кровообращения. Бюл. эксперим. биологии и медицины 1981; 93 (12): 8–11.
16. *Аврущенко М. Ш., Саморукова В. В., Мороз В. В. и др.* Развитие постреанимационных морфологических изменений нейронов гиппокампа и мозжечка: общие закономерности и особенности. Патол. физиология и эксперим. терапия 2003; 2: 27–30.
17. *Аврущенко М. Ш., Маршак Т. Л., Фатеева В. И. и др.* Интенсивность синтеза белка в различных областях мозга крыс, перенесших остановку системного кровообращения. Анестезиология и реаниматология 1993; 2: 43–46.
18. *Аврущенко М. Ш., Маршак Т. Л.* Синтез белка в нейронах и сателлитных глиальных клетках после глобальной ишемии мозга, вызванной остановкой сердца у крыс. Бюл. эксперим. биологии и медицины 1997; 123 (3): 257–260.
19. *Plumier J. C., Krueger A. M., Currie R. W. et al.* Transgenic mice expressing the human inducible HSP70 have hippocampal neurons resistant to ischemic injury. *Cell Stress Chaperones* 1997; 2: 162–167.
20. *Yenari M. A., Fink S. L., Sun G. H. et al.* Gene therapy with HSP72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy. *Ann. Neurol.* 1998; 44: 584–591.
21. *Lee J. E., Yenari M. A., Sun G. H. et al.* Differential neuroprotection from human heat shock protein 70 overexpression in *in vitro in vivo* models of ischemia and ischemia-like conditions. *Exp. Neurol.* 2001; 170: 129–139.
22. *Christians E., Yan L.-J., Benjamin I.* Heat shock factor 1 and heat shock proteins: critical partners in protection against acute cell injury. *Crit. Care Med.* 2002; 30 (1): 43–50.
23. *Yenari M. A., Liu J., Zheng Z. et al.* Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat-shock protein protection. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005; 1053: 74–83.
24. *Klettner A.* The induction of heat shock proteins as a potential strategy to treat neurodegenerative disorders. *Drug News Prospect* 2004; 17 (5): 299–306.

Поступила 22.06.07