DOI:10.15360/1813-9779-2014-5-59-68

ПОСТРЕАНИМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЛИАЛЬНОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА (GDNF): ВЗАИМОСВЯЗЬ С ПОВРЕЖДЕНИЕМ КЛЕТОК ПУРКИНЬЕ МОЗЖЕЧКА (экспериментальное исследование)

М. Ш. Аврущенко, И. В. Острова, А. В. Волков

НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского, Москва, Россия
107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

Postresuscitation Changes in the Expression of Glial-Derived Neurotrophic Factor (GDNF): Association with Cerebellar Purkinje Cell Damage (An experimental study)

M. Sh. Avrushchenko, I. V. Ostrova, A. V. Volkov

V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Moscow, Russia
25, Petrovka St., Build. 2, Moscow 107031, Russia

Цель исследования: **установить значение уровня экспрессии белка GDNF в развитии процесса гибели клеток Пуркинье мозжечка после ишемии-реперфузии. *Материалы и методы*. У крыс разного пола вызывали 10-минутную остановку системного кровообращения, вызванную пережатием сосудистого пучка сердца. На разных сроках постреанимационного периода исследовали состояние высокочувствительной к гипоксии нейрональной популяции клеток Пуркинье мозжечка. При гистологическом анализе на препаратах, окрашенных крезиловым фиолетовым по Нисслю, определяли общее число клеток Пуркинье на 1 мм длины их слоя. При иммуноцитохимическом анализе определяли число GDNF-позитивных (слабо- и сильноокрашенных) и GDNF-негативных нейронов на 1 мм длины их слоя, а также общую плотность популяции. *Результаты*. С помощью гистологических и иммуноцитохимических исследований у реанимированных самцов и самок крыс определена динамика развития процесса гибели нейронов в популяции клеток Пуркинье мозжечка и выявлены постреанимационные изменения уровня экспрессии белка GDNF. Установлено, что у животных разного пола в популяции клеток Пуркинье развиваются однотипные и однонаправленные постреанимационные изменения. Первоначальный подъем уровня экспрессии белка GDNF в нейрональной популяции позволяет предупредить развитие процесса гибели нервных клеток. Последующее уменьшение уровня экспрессии GDNF сопровождается выпадением (гибелью) нейронов. При этом гибели подвергаются GDNF-отрицательные клетки. Обнаружены особенности, связанные с половой принадлежностью организма: у самцов сдвиги уровня экспрессии GDNF в популяции клеток Пуркинье, а также процессы гибели нейронов развиваются раньше, чем у самок. *Заключение*. Выявлена взаимосвязь между изменениями уровня экспрессии белка GDNF и развитием процесса гибели нейронов в постреанимационном периоде. Показано, что уровень экспрессии белка GDNF является важным фактором, влияющим на устойчивость нейронов к гибели в постреанимационном периоде. Это обуславливает перспективность применения GDNF для разработки подходов к защите мозга при ишемии-реперфузии.** ***Ключевые слова:*** **белок GDNF, постреанимационный период, гибель нейронов, клетки Пуркинье мозжечка, иммуногистохимия, морфометрический анализ**

Objective: **to determine the significance of the expression of GDNF protein for developing a cerebellar Purkinje cell death process after ischemia-reperfusion. *Materials and methods*. Rats of both sexes were subjected to 10 minutes of systemic circulatory arrest caused by cardiac vascular fascicle ligation. The status of a highly hypoxia-sensitive neuronal population of cerebellar Purkinje cells was investigated in different postresuscitation periods. The total number of Purkinje cells per mm of their layer length was estimated by a histological analysis of the specimens stained with cresyl violet after the Nissl procedure. An immunocytochemical analysis was made to determine the number of GDNF-positive (weakly and strongly stained) and GDNF-negative neurons per mm of their layer length and the total population density. *Results*. The histological and immunocytochemical studies of resuscitated male and female rats have determined a trend in the development of a neuron death process in the population of cerebellar Purkinje cells and revealed postresuscitation changes in the level of GDNF protein expression. Homogeneous and unidirectional postresuscitation changes have been ascertained to develop in the Purkinje cell population of the animals of both sexes. The initial rise in the expression of GDNF protein in the neuronal population can prevent the development of a nerve cell death process. The subsequent decrease in GDNF expression is accompanied by neuronal fallout (death). At the same time, GDNF-negative cells may undergo death. There are gender- specific**

Адрес для корреспонденции:

Острова Ирина Васильевна
E-mail: irinaostrova@mail.ru

Correspondence to:

Ostrova Irina Vasilyevna
E-mail: irinaostrova@mail.ru

features; the male rats show changes in GDNF expression in the Purkinje cell population and develop neuronal death processes earlier than the female rats. *Conclusion*. There was an association between the changes in GDNF protein expression and the development of a neuronal death process in the postresuscitation period. The GDNF protein expression was shown to be an important factor influencing the resistance of neurons to death in the postresuscitation period. This determines prospects for using GDNF to elaborate approaches to protecting the brain in ischemia-reperfusion. ***Key words:*** **GDNF protein, postresuscitation period, neuronal death, cerebellar Purkinje cells, immunohistochemistry, morphometric analysis.**

DOI:10.15360/1813-9779-2014-5-59-68

Введение

Исследование механизмов и закономерностей изменений, развивающихся на уровне нейрональных популяций, имеет существенное значение для изучения патогенеза постгипоксических энцефалопатий и разработки подходов к защите мозга. Это обусловлено наличием тесной взаимосвязи между восстановлением функции мозга в постреанимационном периоде и выраженностью изменений, развивающихся на уровне нейрональных популяций [1, 2]. Одной из наиболее актуальных задач реаниматологии является поиск эффективных методов защиты мозга [3—5].

Ранее нами были выявлены факторы, влияющие на устойчивость нейронов к постреанимационным изменениям: белки семейства HSP70 (HSP72 и HSP73) [1, 6, 7], а также белок GRP78 [8]. Важную роль в процессах роста и выживания нейронов отводят нейротрофическим факторам. Среди них большое значение имеет глиальный нейротрофический фактор (GDNF). Показаны его нейропротективные свойства для дофаминергических нейронов при болезни Паркинсона [9—11]. Выявлена его способность к защите нейронов при болезни Альцгеймера [12], диабете [13], повреждении спинного мозга и периферических нервов [14], а также при психических заболеваниях [15]. Показано увеличение экспрессии мРНК GDNF и продукции белка в некоторых отделах мозга после очаговой ишемии у взрослых и новорожденных крыс [16, 17]. Однако данные об изменениях уровня экспрессии этого белка противоречивы, а его роль и механизмы действия до настоящего времени не выяснены [15]. При этом вопрос о взаимосвязи уровня экспрессии белка GDNF с процессом гибели нейронов остается открытым.

Для анализа закономерностей и механизмов постреанимационных изменений нервных клеток представляется существенным исследовать взаимосвязь уровня экспрессии белка GDNF в высокочувствительной к гипоксии нейрональной популяции клеток Пуркинье мозжечка с развитием процесса гибели нейронов в постреанимационном периоде. Учитывая, что половая принадлежность организма является одним из важных факторов, влияющих на течение и исход критических состояний [18—21], представляет интерес также оценить, как в постреанимационном периоде реализуются нейропротективные свойства белка GDNF у животных разного пола.

Материал и методы

У самцов и самок белых нелинейных крыс массой 190—250 г под эфирным наркозом вызывали остановку

Introduction

There is a close relationship between the restoration of brain functions in the postoperative period and the severity of the changes at the neuronal populations level [1, 2]. Investigation of the mechanisms and regularities of changes developing within neuronal populations is essential for studies of pathogenesis of posthypoxic encephalopathies. One of the most important problems of resuscitation is a searching for effective methods of cerebral protection [3—5].

In previous studies, we have identified molecules HSP72, HSP73 and GRP78 as factors affecting the stability of neurons to postresuscitation changes [1, 6—8]. Glial-derived neurotrophic factor (GDNF) seems to be of a great significance for survival of neurons in different pathologies. GDNF possessed neuroprotective properties for dopaminergic neurons in Parkinson's disease [9—11], protected neurons in Alzheimer's disease [12], diabetes [13], spinal cord injury and peripheral nerve [14], psychiatric disorders [15]. Both GDNF mRNA expression and protein production were increased in the brain after focal ischemia in neonatal and adult rats [16, 17]. However, data on changes in the expression level of this protein are controversial, and the role and mechanism of GDNF actions has not been yet elucidated [15]. Thus the question about the relationship of a level of GDNF protein expression and a process of neuronal death is still unclarified.

For analysis the regularities and mechanisms of postresuscitation nerve cell changes it is necessary to investigate the expression of GDNF protein in hypoxia-sensitive neuronal populations and determine its relationship with the neuronal death induction. Since the gender is one of the important factors that influence the course and outcome of critical states [18—21] it was important to assess neuroprotective properties of GDNF protein in animals of both sexes post-resuscitation.

Materials and Methods

Male and female albino rats (190—250 g body mass) were anesthetized with an ether and cardiac arrest was evoked for 10 min by intrathoracic clamping of the supracardiac bundle of vessels with a special hook [22]. Animals were resuscitated with the aid of chest compressions in conjunction with mechanical air ventilation during hyperventilation by «Animal Respirator» (SMT Geratehandel) accompanied by intratracheal administration solution of adrenaline at a dose of 0.1 mg/kg. Animals were sacrificed by decapitation under ether anesthesia at 1, 4, 7, 14 days after resuscitation (5—7 males or females per each time). Sham-operated animals served as controls (7 males and 7 females). Experiments were performed according to the recommendations

DOI:10.15360/1813-9779-2014-5-59-68

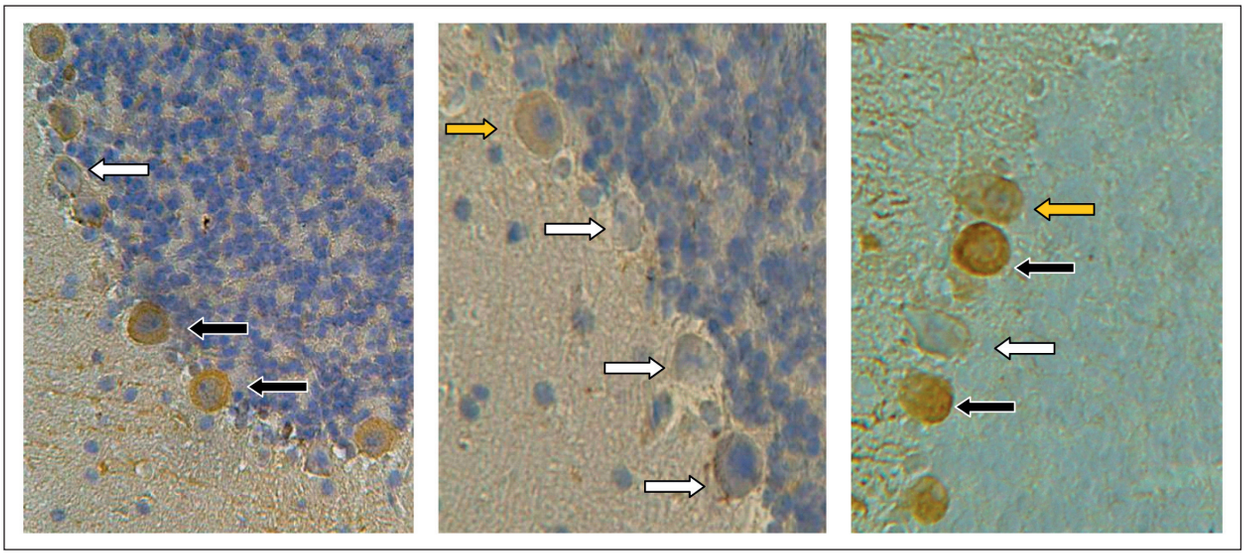

Рис. 1. Клетки Пуркинье с разным уровнем экспрессии глиального нейротрофического фактора (GDNF).
Fig. 1. Purkinje cells with different levels of GDNF expression.
Note (примечание). Here and in Fig. 2 (здесь и на рис. 2): GDNF — glial cell derived neurotrophic factor (глиальный нейротрофический фактор); $GDNF^-$-neurons — white arrows ($GDNF^-$-нейроны — белые стрелки); $GDNF^+$-neurons — yellow arrows ($GDNF^+$-нейроны — желтые стрелки); $GDNF^{++}$-neurons — black arrows ($GDNF^{++}$-нейроны — черные стрелки). ×400.

сердца на 10 мин путем внутриторакального пережатия сосудистого пучка сердца [22]. Оживление проводили непрямым массажем сердца в сочетании с искусственной вентиляцией легких воздухом в режиме гипервентиляции аппаратом «Animal Respirator» фирмы «SMT Geratehandel» с внутритрахеальным введением раствора адреналина в дозе 0,1 мг/кг. Через 1, 4, 7, 14 дн после реанимации животных выводили из эксперимента декапитацией под эфирным наркозом (по 5—7 самцов и самок на каждый срок постреанимационного периода). Контролем служили ложнооперированные животные (7 самцов и 7 самок). Эксперименты проводились согласно рекомендациям Этического комитета ФГБУ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минздрава СССР №755 от 12.08.1977).

Исследовались постреанимационные изменения состояния высокочувствительной к гипоксии популяции клеток Пуркинье коры мозжечка. Гистологический анализ проводили на парафиновых срезах толщиной 5—6 мкм, окрашенных крезиловым фиолетовым по Нисслю. Определяли общую плотность нейрональной популяции (число клеток Пуркинье на 1 мм длины их слоя). Иммуноцитохимические исследования проводили непрямым пероксидазно-антипероксидазным методом с использованием поликлональных антител к GDNF (разведение 1:100) (Santa Crus, USA) и визуализирующей системы EnVision™+Kit (DAKO, Glostrup, Denmark). Иммуноцитохимическая реакция контролировалась инкубацией срезов со всеми реагентами кроме первичных антител. При иммуногистохимическом исследовании выделяли GDNF-негативные ($GDNF^-$) и GDNF-позитивные нейроны с различным уровнем экспрессии GDNF (слабым — $GDNF^+$ и интенсивным — $GDNF^{++}$) (рис. 1).

Определяли число нейронов с разным уровнем экспрессии GDNF на 1 мм длины их слоя, а также общую плотность популяции (для сопоставления с данными гистологического анализа).

В исследованиях использовали систему анализа изображений (компьютер Intel, микроскоп Olympus BX-500, программы Image Scope M, Excel 2007). Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 7.0 с использованием *t*-критерия Стьюдента.

of the Ethics Committee of V. A. Negovsky Institute for General Reanimatology in accordance to the «Rules of the work using experimental animals» (Order № 755 of the Ministry of Public Health (USSR), 12.08.1977).

We investigated post-resuscitation changes of population of Purkinje cells of the cerebellar cortex highly sensitive to hypoxia. Paraffin-embedded brain tissue sections, 5—6 μm thick, were stained with cresyl violet by the Nissl procedure. The total density of neuronal population (number of Purkinje cells per 1 mm of the layer length) was assessed.

The GDNF immunoreactivity was determined by indirect peroxidase-antiperoxidase method using polyclonal antibodies against GDNF (dilution 1:100) (Santa Crus, USA) and visualization system EnVision™+Kit (DAKO, Glostrup, Denmark). Immunocytochemical control reaction was monitored by incubating sections with all reagents except the primary antibody.

The number of neurons with different levels of GDNF (negative — $GDNF^-$, weak — $GDNF^+$ and intense — $GDNF^{++}$) (Fig. 1) per 1 mm of the layer length, as well as the total population density was determined.

Images were analysed with the use of light microscope Olympus BX-500 (Japan), program ImageScopeM (Russia) and Excel software. Statistical processing of the data was performed using the Student's t-test.

Results and Discussion

According to histological data, the Purkinje cell death of male rats occured on 4th postoperative day and not further enhanced. At 1st day after resuscitation the total density of neuronal population was similar to the control, but at a 4th day decreased by 16.6% (Table 1). At later stages of post-resuscitation (7th and 14th day), further reduction of total population density did not occur (Table 1).

Immunohistochemical study demonstrated that in males the total population density was not changed at the 1st post-resuscitation day compared to the control (Fig. 2) that coincides with the results of histological analysis. Thus the number of $GDNF^{++}$-neurons was increased by

DOI:10.15360/1813-9779-2014-5-59-68

Таблица 1. Общее число клеток Пуркинье у крыс разного пола в постреанимационном периоде (*M±m*)
Table 1. Total number of Purkinje cells in rats of different gender in control and post-resuscitation period (*M±m*)

Gender	Control	Total number of Purkinje cells in post-resuscitation, days			
		1st	4th	7th	14th
Males	17,5±0,6	17,1±0,5	14,6±0,5*	14,1±0,6**	13,9±0,6**
Females	17,7±0,8	16,7±0,6	16,2±0,7	13,6±0,5**	12,9±0,5**

Note (примечание). * — $P<0,01$; ** — $P<0,005$ in comparison with control (в сравнении с контролем). Gender – пол; Control – контроль; Males – самцы; Females – самки, Days post-resuscitation: 1st, 4th, 7th, 14th – дни после реанимации: 1-е, 4-е, 7-е, 14-е сутки; Total number of Purkinje cells in post-resuscitation, days — общее число клеток Пуркинье в постреанимационном периоде, дни.

Результаты и обсуждение

Согласно результатам гистологического исследования, у реанимированных самцов процесс гибели клеток Пуркинье развивался к 4-м суткам постреанимационного периода и в дальнейшем не усиливался. Так, через 1 сут. после оживления общая плотность нейрональной популяции соответствовала контрольному уровню, но к 4-м сут. уменьшалась на 16,6% (табл. 1). На более поздних этапах постреанимационного периода (7- и 14-е сут.) дальнейшего снижения общей плотности популяции не происходило (табл. 1).

Иммуногистохимическое исследование показало, что у самцов через 1 сут. после реанимации в сравнении с контролем общая плотность популяции не изменяется (рис. 2), что совпадает с результатами гистологического анализа. При этом число $GDNF^{++}$ -нейронов увеличивается на 70,0%, число $GDNF^{-}$-нейронов уменьшается на 35,4%, а число $GDNF^{+}$-нейронов соответствует контрольному уровню (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что на данном этапе постреанимационного процесса уровень экспрессии GDNF в исследуемой нейрональной популяции возрастает за счет увеличения числа клеток, активно экспрессирующих этот белок. При этом гибели нейронов не происходит.

К 4-м суткам постреанимационного периода число $GDNF^{++}$-нейронов снижается, опускаясь до контрольных значений (рис. 2), т. е. уровень экспрессии белка GDNF в нейрональной популяции уменьшается. При этом число $GDNF^{+}$-клеток соответствует контролю, а число $GDNF^{-}$-нейронов снижено в сравнении с контролем на 32,3% (рис. 2). Установлено, что на этом этапе постреанимационного процесса снижается и общая плотность популяции (на 15,8% в сравнении с контролем), что совпадает с результатами гистологического анализа. При этом гибели подвергаются, очевидно, GDNF-неэкспрессирующие нейроны, поскольку в сравнении с контролем уменьшено только число $GDNF^{-}$-клеток (рис. 2).

На 7-е сутки постреанимационного периода дальнейших изменений общей плотности популяции не выявлено (снижение в сравнении с контролем на 14,7%) (рис. 2). При этом число GDNF-позитивных нейронов (как $GDNF^{+}$, так и $GDNF^{++}$) соответствует контрольному уровню, в то время как число $GDNF^{-}$-нейронов резко снижено (на 50,8%) (рис. 2). К 14-м суткам после

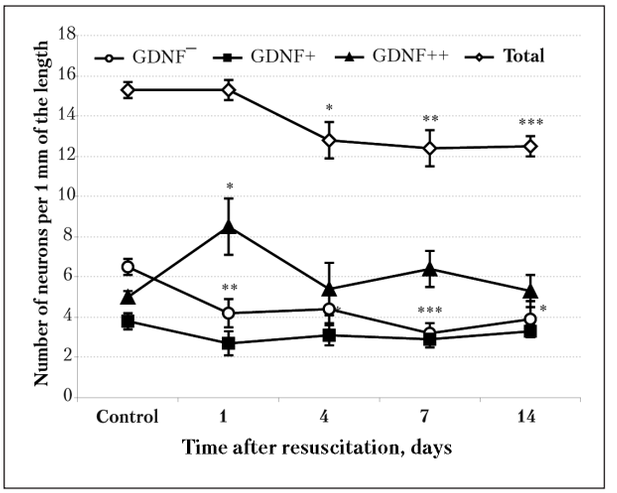

Рис. 2 Динамика изменения числа нейронов с разным уровнем экспрессии GDNF у самцов.
Fig. 2. Changes in numbers of neurons with different levels of GDNF expression in males.
Note (примечание). Here and in Fig. 3 (здесь и на рис. 3): Control – контроль; days – дни; Time after resuscitation — время после реанимации; Number of neurons per 1 mm of the length — число нейронов на 1 мм длины; Total — всего; GDNF — glial cell derived neurotrophic factor (глиальный нейротрофический фактор). *** — $p<0,005$; ** — $p<0,025$; * — $p<0,05$ in comparison with control (в сравнении с контролем).

70.0%, the number of $GDNF^{-}$-neurons was reduced by 35.4%, while the number of $GDNF^{+}$-neurons corresponded to the control (Fig. 2). The obtained data indicate that at this stage of post-resuscitation process the level of GDNF expression in neuronal population raises by increasing the number of cells actively expressing this protein with no neuronal death.

By the 4th postoperative day the number of $GDNF^{++}$-neurons was reduced to control (Fig. 2), i.e. GDNF expression level in neuronal population decreased. Whereas the numbers of $GDNF^{+}$-cells in experimental and control groups were sumilar, the numbers of $GDNF^{-}$-neurons were reduced by 32.3% (Fig. 2). At this stage of the post-resuscitation process the total density of the population also reduced by 15.8% vs. control that coincides with the results of histological analysis. Interestingly, only $GDNF^{-}$-cell numbers were significantly reduced demonstrating the selective death of neurons not expressing GDNF (Fig. 2).

On the 7th postoperative day further changes of the total density were not found (reduction by 14.7% of the control value) (Fig. 2). The number of GDNF-positive

DOI:10.15360/1813-9779-2014-5-59-68

оживления дальнейших изменений общей плотности популяции клеток Пуркинье, а также числа GDNF-позитивных и GDNF-негативных нейронов не обнаружено (рис. 2).

Итак, у самцов уровень экспрессии белка GDNF в популяции клеток Пуркинье возрастает уже в раннем постреанимационном периоде (через 1 сутки после оживления). При этом гибели нейронов не происходит. К 4-м суткам после реанимации уровень экспрессии белка GDNF в популяции снижается, что сопровождается развитием процесса выпадения нейронов. При этом уменьшено только число GDNF-негативных, т. е. неэкспрессирующих этот белок, нейронов.

У реанимированных самок в популяции клеток Пуркинье происходят аналогичные постреанимационные изменения, но они развиваются позднее, чем у самцов. Согласно данным гистологического исследования, в раннем постреанимационном периоде (1, 4 сутки) общая плотность нейрональной популяции соответствует контрольному уровню (табл. 1). Снижение общей плотности популяции (на 23,2% в сравнении с контролем) происходит только к 7 суткам после реанимации (табл.1), что свидетельствует о развитии процесса выпадения (гибели) нейронов. Позднее (14-е сутки) общая плотность популяции не изменяется, оставаясь существенно сниженной в сравнении с контролем (на 27,1%) (табл. 1).

При иммуногистохимических исследованиях выявлено, что у реанимированных самок через 1 сут. после оживления число GDNF-позитивных клеток Пуркинье (как $GDNF^{++}$, так и $GDNF^{+}$), а также число GDNF-негативных нейронов соответствует контролю (рис. 3). При этом не изменяется и общая плотность популяции, что совпадает с результатами гистологического исследования. К 4-м суткам постреанимационного периода при сохранении общей плотности популяции на контрольном уровне происходит увеличение числа $GDNF^{++}$-нейронов на 29,2%, а число $GDNF^{-}$-клеток уменьшается на 55,5% (рис. 3). При этом число $GDNF^{+}$-нейронов не изменяется. Полученные данные свидетельствуют о том, что на данном этапе постреанимационного процесса в популяции увеличивается число клеток, экспрессирующих GDNF, и уровень экспрессии GDNF в нейрональной популяции возрастает.

Через 7 суток после реанимации число $GDNF^{++}$-нейронов снижается, опускаясь до контрольных значений (рис. 3). При этом число $GDNF^{+}$-нейронов не изменяется, а число $GDNF^{-}$-нейронов резко уменьшается (снижение в сравнении с контролем на 50,8%). Именно на этом этапе происходит уменьшение общей плотности популяции (на 15,4% в сравнении с контролем). Полученные данные согласуются с результатами гистологического исследования и свидетельствуют о выпадении (гибели) нейронов. При этом, как было отмечено выше, уменьшено только число GDNF-отрицательных, т. е. неэкспрессирующих этот белок клеток (рис. 3). К 14-м суткам постреанимационного периода дальнейших изменений общей плотности популяции, а

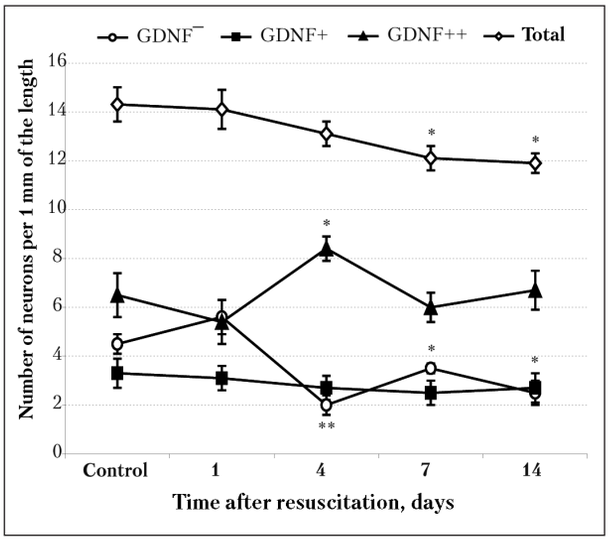

Рис. 3 Динамика изменения числа нейронов с разным уровнем экспрессии GDNF у самок.
Fig. 3. Changes in numbers of neurons with different levels of GDNF expression in females.
Note (примечание). ** — $p<0,01$; * — $p<0,05$ in comparison with control (в сравнении с контролем).

neurons (both $GDNF^{+}$ and $GDNF^{++}$ cells) did not differ from the values of the control, while the numbers of $GDNF^{-}$-neurons were dramatically reduced (by 50.8%) (Fig. 2). On the 14th day no further changes in total density of Purkinje cells and numbers of GDNF-positive and GDNF-negative neurons were revealed (Fig. 2).

Therefore, in males GDNF protein expression within the population of Purkinje cells increases early in a postoperative period (1 day after resuscitation), and neuronal death did not occur. By the 4th day after resuscitation the level of GDNF protein expression in the population was reduced that was accompanied by a neuronal loss. At the same time only the numbers of GDNF-negative neurons were decreased.

The same post-resuscitation changes occured in the population of Purkinje cells of resuscitated female rats, but they developed later than in males. According to data from the histological study, in early postoperative period (1 and 4 days) the total density of neuronal population corresponded to the control (Table 1). It decreased only at 7th day after resuscitation (by 23.2%) (Table 1), indicating the neuronal loss. Later (on 14th day), the density of the population was without further change, remaining reduced compared to the control (by 27.1%) (Table 1).

Immunohistochemical study revealed that in females on the 1st day post-resuscitation the numbers of GDNF-positive Purkinje cells (both $GDNF^{++}$ and $GDNF^{+}$), as well as GDNF-negative neurons correspond to the control (Fig. 3). The total density of Purkinje cells population was not changed that coincides with the histological findings.

By the 4th day the overall population density was as in control while the number $GDNF^{++}$neurons increased by 29.2% and the number of $GDNF^{-}$-cells was reduced by

DOI:10.15360/1813-9779-2014-5-59-68

также числа GDNF-позитивных и GDNF-негативных нейронов не обнаружено. Общая плотность популяции уменьшена на 16,8%, число GDNF-позитивных нейронов (как $GDNF^{+}$, так и $GDNF^{++}$) соответствует контролю, а число GDNF-отрицательных нейронов резко снижено (на 44,5%) (рис. 3).

Итак, у самок в популяции клеток Пуркинье уровень экспрессии белка GDNF возрастает уже в раннем постреанимационном периоде (через 4 суток после оживления), но это происходит позднее, чем у самцов. На этом этапе гибели нейронов не происходит. К 7-м суткам после реанимации уровень экспрессии белка GDNF в нейрональной популяции снижается до контрольных значений, что сопровождается развитием процесса выпадения клеток. При этом уменьшено только число GDNF-отрицательных нейронов.

Комплексный анализ результатов гистологических и иммуноцитохимических исследований позволил выявить взаимосвязь постреанимационных изменений уровня экспрессии белка GDNF с развитием процесса гибели нейронов. Установлено, что у животных разного пола в популяции клеток Пуркинье мозжечка развиваются однотипные и однонаправленные постреанимационные сдвиги. Уровень экспрессии GDNF возрастает уже в раннем постреанимационном периоде за счет увеличения в нейрональной популяции числа элементов, ранее неэкспрессирующих этот белок. Существенно, что на этом этапе ни у самцов, ни у самок гибели нейронов не происходит. На более поздних этапах постреанимационного процесса у животных обоего пола уровень экспрессии белка GDNF снижается. При этом уменьшается общая плотность популяции, что свидетельствует о гибели нейронов. Иммуногистохимические исследования позволили установить, что гибели подвергаются GDNF-отрицательные, т.е. неэкспрессирующие этот белок клетки.

Интересно, что выявленная нами в популяции клеток Пуркинье динамика постреанимационных сдвигов уровня экспрессии GDNF (первоначальный подъем и последующее снижение до нормы) совпадает с изменениями, обнаруженными в другой области мозга — гиппокампе при моделировании фокальной ишемии [23]. Резкое увеличение экспрессии GDNF показано и при повреждении Шванновских клеток [24].

Установлено, что хотя у самцов и у самок крыс в популяции клеток Пуркинье возникают аналогичные постреанимационные изменения, существуют особенности, связанные с половой принадлежностью организма. Обнаружено, что у самцов сдвиги уровня экспрессии GDNF, а также процессы гибели нейронов возникают раньше, чем у самок. Это согласуется с развиваемыми нами представлениями о наличии гендерных различий в постреанимационном повреждении мозга [19, 20, 25, 26].

В целом полученные результаты свидетельствуют о том, что и у самцов, и у самок уровень экспрессии белка GDNF является важным фактором, влияющим на устойчивость нейронов к гибели в постреанимаци-

55.5% (Fig. 3). The number of $GDNF^{+}$-neurons was not changed. The data indicate that at this stage of postresuscitation process the number of GDNF expressing cells increases and the level of GDNF-expression in the neuronal population raises.

By the 7th day after resuscitation the number of $GDNF^{++}$neurons falled to control values (Fig. 3). The number of $GDNF^{+}$-neurons was not changed, and the number of $GDNF^{-}$neurons sharply reduced, specifically, by 50.8% compared to the control. At the same time the total density of the population decreased by 15.4%. These data are consistent with the histologic findings and indicate loss of neurons. Thus as noted above, only GDNF-negative cells reduced (Fig. 3). By the14th day the density of population and the number of GDNF-positive and GDNF-negative neurons didn't changed. The total density reduced by 16.8% of control value, the number of GDNF-positive neurons (both $GDNF^{+}$ cells and $GDNF^{++}$cells) corresponded to the control, and the number of GDNF-negative neurons dramatically reduced (by 44.5%) (Figure 3).

Therefore, in the population of Purkinje cells of females the expression level of GDNF protein increases in the early postoperative period (within 4 days after the resuscitation), but later than of the males. At this stage neuron death did not occur. By the 7th day after resuscitation expression level of GDNF protein reduced to control values that was accompanied by neuronal loss (GDNF-negative neurons were dyeing).

Histological and immunocytochemical studies revealed the relationship of post-resuscitation GDNF protein expression level changes with the development process of a neuronal death. We found that in animals of different sex in a population of cerebellar Purkinje cells the same type and unidirectional post-resuscitation changes develop. The levels of GDNF expression increase in the early postoperative period due to an increase in numbers of neurons previously non-expressing this protein, and neuronal cell death did not occur in both males and females. Later GDNF protein expression level was decreasing in resuscitated animals of both genders. The total density of the population was also reduced indicating neuronal death. Immunohistochemical studies confirmed the loss of GDNF-negative cells.

It is interesting that dynamics of post-resuscitation changes of GDNF expression in the population of Purkinje cells (initial rise and subsequent decline to normal) coincides with the changes found in the hippocampus at focal ischemia [23]. Sharp increase of GDNF expression in damaged Schwann cells has been also demonstrated [24].

It was established that although male and female rats have similar post-resuscitation changes, there are gender differences. In males GDNF expression shifts as well as processes of neuronal death occur earlier than in females. This is consistent with our ideas about gender differences in post-resuscitation brain damage [19, 20, 25, 26].

In general, the results indicate that in both males and females expression level of GDNF protein is an important factor for resistance of neurons to death. Initial rise of

DOI:10.15360/1813-9779-2014-5-59-68

онном периоде. Первоначальный подъем уровня экспрессии белка GDNF в популяции клеток Пуркинье позволяет предупредить гибель нейронов. Последующее уменьшение уровня экспрессии GDNF сопровождается выпадением (гибелью) нейронов. При этом гибели подвергаются GDNF-отрицательные (т. е. не экспрессирующие этот белок) клетки. Следовательно, GDNF в постреанимационном периоде характеризуется нейропротективными свойствами.

Нейропротективное действие GDNF показано также in vitro на модели болезни Паркинсона (повреждающее действие 6-гидроксидофамина на дофаминергические нейроны клеток линии MN9D) [10]. Авторы полагают, что защитное действие GDNF связано с его способностью увеличивать экспрессию генов, ингибирующих апоптоз, и снижать экспрессию проапоптических генов. Действительно, при исследовании на аналогичной модели было показано, что введение GDNF приводит к увеличению экспрессии антиапоптических белков Bcl-2 и Bcl-w и уменьшает экспрессию проапоптических белков Bax и Bad [9]. Установлено также [13], что введение GDNF в стекловидное тело крыс с индуцированным диабетом уменьшает выраженность процесса нейродегенерации в сетчатке, что объясняют влиянием GDNF на дисфункцию транспорта глутамата. С увеличением синтеза GDNF связывают и положительное действие флавонидов на культивируемые астроциты [14]. Нейропротективный эффект препарата ladostigil, применяемого при болезни Паркинсона и при болезни Альцгеймера, связывают с его способностью к активации индуцируемого гипоксией фактора (HIF), который, в свою очередь, усиливает экспрессию ряда нейротрофических факторов, в том числе и GDNF [12]. Показано также, что при моделировании гипоксии — реперфузии *in vitro* применение экстракта кофеиновой кислоты, а также растения Erigeron breviscapus приводит к увеличению экспрессии GDNF в астроцитах и усилению выделения этого белка в культуральную среду, что способствует выживаемости нейронов [27].

Ранее нами было установлено [28], что активация поведения реанимированных животных позволяет предотвратить постреанимационную гибель нейронов в высокочувствительных к гипоксии отделах мозга (кора, гиппокамп и мозжечок) даже после длительной остановки сердца. Полученные недавно данные о том, что краткосрочные упражнения приводят к увеличению уровня белка GDNF в нейронах спинного мозга крыс [29], позволяют предположить, что одним из механизмов сохранения нейронов при активации поведения может быть увеличение уровня экспрессии GDNF. Полученные в настоящей работе данные также свидетельствуют в пользу этого предположения.

В последнее время появилось много экспериментальных исследований, связанных с разработкой различных способов введения в мозг экзогенного GDNF. Так, на модели повреждения спинного мозга у крыс разработана конструкция, обеспечивающая рост аксонов [30]. Показано, что увеличение экспрессии GDNF в

GDNF protein expression contributes to neuronal death prevention. The subsequent decrease in the GDNF expression was accompanied by a neuronal loss. Thus GDNF-negative cells (i.e. cells with no expression of the protein) are dying. Therefore GDNF is characterized by neuroprotective properties in the post-resuscitation period.

The neuroprotective action of GDNF was also shown in vitro in a Parkinson's disease model [10]. The authors suggested that the protective effect of GDNF was due to its ability to increase the expression of genes that inhibit apoptosis, and reduce the expression of proapoptotic genes. Indeed, when tested in the same model, it was shown that GDNF increased expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-w and reduced expression of proapoptotic proteins Bax and Bad [9]. It was also established that the introduction of GDNF into the vitreous of rats with induced diabetes reduced the severity of the process of neurodegeneration in the retina that is explained by the influence of GDNF on the dysfunction of glutamate transport [13]. Positive effects of flavonoids on cultured astrocytes were associated with the increase in the synthesis of GDNF [14]. Neuroprotective effect of the drug ladostigil, used in Parkinson's disease and Alzheimer's disease, is associated with its ability to activate hypoxia inducible factor (HIF), which in turn increases the expression of several neurotrophic factors including GDNF [12]. It was also shown in in vitro model of hypoxia-reperfusion that the use of an extract of caffeic acid and Erigeron breviscapus plants led to increased expression of GDNF in astrocytes and enhanced excretion of the protein into the culture medium that promoted survival of neurons [27].

Earlier we have found that the activation of behavior of resuscitated animals prevents post-resuscitation neuronal death in highly sensitive to hypoxia areas of the brain (cortex, hippocampus, and cerebellum), even after prolonged cardiac arrest [28]. Recent evidence that short-term exercise lead to increased levels of GDNF protein in neurons of the spinal cord in rats [29] suggest that a mechanism for preserving of neurons at behavior activation could be relate to an increase in the level of GDNF expression. The present data support this assumption.

Lately several experimental studies related to the development of different modes of administration of exogenous GDNF in the brain were published. It was shown that the increase the expression of GDNF in the transplanted Schwann cells promoted axonal regeneration and growth, formation of synapses and partial functional recovery in a spinal cord injury model in rats [30]. In *in vitro* studies the ability of biodegradable microparticles containing GDNF to induce differentiation of neural progenitor cells into mature neurons was demonstrated that considered as very promising for treatment of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases [31]. Delivering exogenous GDNF to the brain is currently under study, specifically, with the aid of lentivirus-mediated hGDNF gene delivery system [32], or through the recombinant human GDNF (r-metHuGDNF) construct [33].

DOI:10.15360/1813-9779-2014-5-59-68

трансплантированных Шванновских клетках способствует регенерации аксонов, формированию синапсов и частичному функциональному восстановлению. В исследованиях in vitro продемонстрирована способность биодеградирующих микрочастиц, содержащих GDNF, вызывать дифференцировку прогениторных нервных клеток в зрелые нейроны, что считают весьма перспективным при лечении болезни Паркинсона и других нейродегенеративных заболеваний [31]. В эксперименте разрабатываются и усовершенствуются новые способы доставки в мозг экзогенного GDNF — вирусные векторы (lentivirus-mediated hGDNF gene delivery system [32], а также рекомбинантный человеческий GDNF (r-metHuGDNF) [33].

Следует отметить, что хотя GDNF в целом рассматривается как важный нейротрофический фактор, его чрезмерная экспрессия может приводить к побочным эффектам [34]. Поэтому одним из существенных аспектов при разработке подходов к генной терапии, обеспечивающей защиту мозга, является регуляция уровня экспрессии генов [32]. В настоящее время на моделях *in vitro* уже разрабатываются системы регуляции уровня экспрессии GDNF [34]. Авторы полагают, что решение этой проблемы будет весьма перспективным для дальнейшего использования в экспериментах *in vivo,* причем не только для защиты нейронов, но и для нормализации поведения животных.

Итак, полученные нами результаты в целом свидетельствуют о том, что уровень экспрессии белка GDNF является важным фактором, влияющим на устойчивость нейронов к гибели в постреанимационном периоде. Полученные результаты представляются существенными для анализа механизмов развития постгипоксических энцефалопатий, а также для разработки подходов к их профилактике и коррекции. Активные поиски различных способов введения экзогенного GDNF обуславливают перспективность применения этого нейротрофического фактора для защиты мозга при ишемии — реперфузии.

Заключение

Выявлена взаимосвязь между изменениями уровня экспрессии белка GDNF и развитием процесса гибели нейронов в постреанимационном периоде. Установлено, что у животных разного пола в популяции клеток Пуркинье мозжечка развиваются однотипные и однонаправленные постреанимационные изменения. Первоначальный подъем уровня экспрессии белка GDNF в нейрональной популяции позволяет предупредить развитие процесса гибели нервных клеток. Последующее уменьшение уровня экспрессии GDNF сопровождается выпадением (гибелью) нейронов. При этом гибели подвергаются GDNF — отрицательные (т. е. не экспрессирующие этот белок) клетки. Обнаружены особенности, связанные с половой принадлежностью организма: у самцов сдвиги уровня экспрессии GDNF в популяции клеток Пуркинье, а также процессы гибели нейронов развиваются раньше, чем у самок.

В целом полученные результаты свидетельствуют о том, что уровень экспрессии белка GDNF является важным фактором, влияющим на устойчивость нейронов к гибели в постреанимационном периоде. Это обуславливает перспективность применения GDNF для разработки подходов к защите мозга при ишемии-реперфузии.

Литература

1. *Аврущенко М.Ш., Острова И.В., Волков А.В., Заржецкий Ю.В.* Постреанимационные изменения морфофункционального состояния нервных клеток: значение в патогенезе энцефалопатий. *Общая реаниматология.* 2006; 2 (5—6): 85—97.

It should be noted that although GDNF is generally regarded as an important neuro- trophic factor, its overexpression might lead to side effects [34]. Therefore, one of the essential aspects of the development of approaches to gene therapy that protects the brain is the regulation of gene expression level [22]. Currently, regulatory system capable to modulate the level of expression of GDNF are already being developed by in vitro modeling [34]. It is believed that the solution of problem of GDNF delivery to the brain will be promising for both neuron protection and behavior normalization.

Presented results demonstrate that the level of expression of GDNF protein is an important factor affecting the resistance of neurons to death post-resuscitation. Active search for optimal administration of exogenous GDNF in experimental setting would definitely optimize the future exploration of this neurotrophic factor in protecting the brain during ischemia-reperfusion in clinics.

Conclusion

In a subset of cerebellar Purkinje cells in male and female rats the same type and unidirectional post-resuscitation changes occur. Initial rise of GDNF protein expression within the neuronal population allows to prevent neuronal death. Subsequent decrease in the level of GDNF expression is accompanied by a neuronal loss. GDNF-negative (i. e. cells that do not express the protein) cells dies. Specific features associated with a gender: changes in a GDNF expression and neuronal cell death processes within the population of Purkinje cells are developed earlier in males than in females.

In general, the results indicate that the level of expression of GDNF protein is an important factor affecting the tolerance of the neurons to death during post-resuscitation. Data demonstrate potential applications of GDNF in protecting the brain during ischemia-reperfusion.

References

1. *Avrushchenko M.Sh., Ostrova I.V., Volkov A.V., Zarzhetsky Yu.V.* Postreanimatsionnye izmeneniya morfofunktsionalnogo sostoyaniya nervnykh kletok: znachenie v patogeneze entsefalopatii. *Obshchaya Reanimatologiya.* [Postresuscitative changes in the morphofunctional

DOI:10.15360/1813-9779-2014-5-59-68

2. *Авруценко М.Ш., Мороз В.В., Острова И.В.* Постреанимационные изменения мозга на уровне нейрональных популяций: закономерности и механизмы. *Общая реаниматология*. 2012; 8 (4): 69—78.
3. *Мороз В.В., Силачев Д.Н., Плотников Е.Ю., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Гребенчиков О.А., Лихванцев В.В.* Механизмы повреждения и защиты клетки при ишемии/реперфузии и экспериментальное обоснование применения препаратов на основе лития в анестезиологии. *Общая реаниматология*. 2013; 9 (1): 63—72.
4. *Авруценко М.Ш., Заржецкий Ю.В., Мороз В.В., Острова И.В., Гудашева Т.А., Середенин С.Б.* Влияние миметика фактора роста нервов ГК-2 на структурно-функциональное состояние мозга в раннем постреанимационном периоде. *Общая реаниматология*. 2012; 8 (5): 19—23.
5. *Заржецкий Ю.В., Мороз В.В., Волков А.В.* Влияние иммуноактивных препаратов на функциональное восстановление мозга и стероидные гормоны в постреанимационном периоде. *Общая реаниматология*. 2014; 10 (1): 5—11.
6. *Авруценко М.Ш.* Постреанимационные изменения мозга на уровне нейрональных популяций: значение в формировании постгипоксических энцефалопатий (обзор). *Hypoxia Med. J*. 2003; 11 (4): 34—52.
7. *Острова И.В., Мороз В.В., Авруценко М.Ш.* Значение иммуногистохимических исследований белков теплового шока семейства HSP70 для изучения постреанимационных изменений мозга. *Общая реаниматология*. 2007; 3 (5—6): 91—96.
8. *Острова И.В., Авруценко М.Ш., Волков А.В.* Взаимосвязь уровня экспрессии белка GRP78 с выраженностью постишемического повреждения гиппокампа у крыс разного пола. *Общая реаниматология*. 2011; 7 (6): 28—33.
9. *Cao J., Niu H., Wang H., Huang X., Gao D.* NF-κB p65/p52 plays a role in GDNF up-regulating Bcl-2 and Bcl-w expression in 6-OHDA-induced apoptosis of MN9D cell. *Int. J. Neurosci.* 2013; 123 (10): 705—710. http://dx.doi.org/10.3109/00207454.2013.795149. PMID: 23590664
10. *Li F., Wang M., Zhu S., Li L., Xiong Y., Gao D.* The potential neuroprotection mechanism of GDNF in the 6-OHDA-induced cellular models of Parkinson's Disease. *Cell Mol. Neurobiol.* 2013; 33 (7): 907—919. http://dx.doi.org/10.1007/s10571—013—9957—0. PMID: 23846419
11. *Li L., Chen H., Chen F., Li F., Wang M., Wang L., Li Y., Gao D.* Effects of glia cell line-derived neurotrophic factor on microRNA expression in a 6-hydroxydopamine-injered dopaminergic cell line. *J. Neural. Transm.* 2013; 120 (11): 1511—1523. http://dx.doi.org/10.1007/s00702—013—1031-z. PMID: 23771700
12. *Youdim M.* Multi target neuroprotective and neurorestorative anti-Parkinson and anti-Alzheimer drugs ladostigil and m30 derived from rasagiline. *Exp. Neurobiol.* 2013; 22 (1): 1—10. http://dx.doi.org/10.5607/en.2013.22.1.1. PMID: 23585716
13. *Wang L., Deng Q., Wu X., Yu J., Yang X., Zhong Y.* Upregulation of glutamate-aspartate transporter by glial cell line-derived neurotrophic factor ameliorates cell apoptosis in neural retina in streptozotocin-induced diabetic rats. *CNS Neurosci. Ther.* 2013; 19 (12): 945—953. http://dx.doi.org/10.1111/cns.12150. PMID: 23870489
14. *Xu S., Bi C., Choi R., Zhu K., Miernisha A., Dong T., Tsim K.* Flavonoids induce the synthesis and secretion of neurotrophic factors in cultured rat astrocytes: a signaling response mediated by estrogen receptor. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2013; 2013: 127075. http://dx.doi.org/10.1155/2013/127075. PMID: 23878590
15. *Kotyuk E., Nemeth N., Halmai Z., Faludi G., Sasvari-Szekely M., Szekely A.* Association between mood characteristics and polymorphisms of glial cell line-derived neurotrophic factor (GNDF) in patients with depression. *Neuropsychopharmacol. Hung.* 2013; 15 (2): 63—72. PMID: 23817357
16. *Myazaki H., Nagashima K., Okuma Y., Nomura Y.* Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor induced by transient forebrain ischemia in rats. *Brain Res.* 2001; 922 (3): 165—172. PMID: 11743946
17. *Ikeda T., Xia X.Y., Xia Y.X., Ikenoue T., Han B., Choi B.H.* Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against ischemia/hypoxia-induced brain injury in neonatal rats. *Acta Neuropathology.* 2000; 100 (2): 161—167. PMID: 10963363
18. *Заржецкий Ю.В., Волков А.В.* Некоторые вопросы патогенеза и терапии терминальных и постреанимационных состояний (экспериментальные исследования). *Общая реаниматология*. 2012; 8 (4): 55—68.
19. *Волков А.В., Авруценко М.Ш., Горенкова Н.А., Щербакова Л.Н., Заржецкий Ю.В.* Половые различия отсроченных постреанимационных изменений головного мозга (экспериментальное исследование). *Общая реаниматология*. 2007; 3 (5—6): 97—102.
20. *Волков А.В., Авруценко М.Ш., Горенкова Н.А., Заржецкий Ю.В.* Значение полового диморфизма и репродуктивных гормонов в патогенезе и исходе постреанимационной болезни. *Общая реаниматология*. 2006; 2 (5—6): 70—78.
21. *Lang J.T., McCullough L.D.* Pathways to ischemic neuronal cell death: are sex differences relevant? *J. Transl. Med.* 2008; 6: 33. http://dx.doi.org/10.1186/1479—5876—6-33. PMID: 18573200

state of nerve cells: implication in the pathogenesis of encephalopathies. *General Reanimatology*]. 2006; 2 (5—6): 85—97. [In Russ.]

2. *Avrushchenko M.Sh., Moroz V.V., Ostrova I.V.* Postreanimatsionnye izmeneniya mozga na urovne neironalnykh populyatsii: zakonomernosti i mekhanizmy. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Postresuscitation changes in the brain at the level of neuronal populations: patterns and mechanisms. *General Reanimatology*]. 2012; 8 (4): 69—78. [In Russ.]
3. *Moroz V.V., Silachev D.N., Plotnikov E.Yu., Zorova L.D., Pevzner I.B., Grebenchikov O.A., Likhvantsev V.V.* Mekhanizmy povrezhdeniya i zashchity kletki pri ishemii/reperfuzii i eksperimentalnoe obosnovanie primeneniya preparatov na osnove litiya v anesteziologii. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Mechanisms of cell damage and protection in ischemia/reperfusion and experimental rationale for the use of lithium-based preparations in anesthesiology. *General Reanimatology*]. 2013; 9 (1): 63—72. [In Russ.]
4. *Avrushchenko M.Sh., Zarzhetsky Yu.V., Moroz V.V., Ostrova I.V., Gudasheva T.A., Seredenin S.B.* Vliyanie mimetika faktora rosta nervov GK-2 na strukturno-funktsionalnoe sostoyanie mozga v rannem postreanimatsionnom periode (eksperimentalnoe issledovanie). *Obshchaya Reanimatologiya*. [Effect of the nerve growth factor mimetic GK-2 on brain structural and functional state in the early postresuscitation period (experimental study). *General Reanimatology*]. 2012; 8 (5): 19—23. [In Russ.]
5. *Zarzhetsky Yu.V., Moroz V.V., Volkov A.V.* Vliyanie immunoaktivnykh preparatov na funktsionalnoe vosstanovlenie mozga i steroidnye gormony v postreanimatsionnom periode. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Effect of immunoactive drugs on postresuscitation processes in the brain and steroid hormones. *General Reanimatology*]. 2014; 10 (1): 5—11. [In Russ.]
6. *Avrushchenko M.Sh.* Postreanimatsionnye izmeneniya mozga na urovne neironalnykh populyatsii: znachenie v formirovanii postgipoksicheskikh entsefalopatii (obzor). [Post-resuscitation changes in the brain at the neuronal population level: role in the formation of post-hypoxic encephalopathies (review)]. *Hypoxia Med. J*. 2003; 11 (4): 34—52. [In Russ.]
7. *Ostrova I.V., Moroz V.V., Avrushchenko M.Sh.* Znachenie immunogistokhimicheskikh issledovanii belkov teplovogo shoka semeistva HSP70 dlya izucheniya postreanimatsionnykh izmenenii mozga. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Significance of immunohistochemical studies of heat shock proteins of the HSP70 family in the investigation of postresuscitative brain chandes. *General Reanimatology*]. 2007; 3 (5—6): 91—96. [In Russ.]
8. *Ostrova I.V., Avrushchenko M.Sh., Volkov A.V.* Vzaimosvyaz urovnya ekspressii belka GRP78 s vyrazhennostyu postishemicheskogo povrezhdeniya gippokampa u krys raznogo pola. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Association of GRP78 protein expression with the degree of postischemic hippocampal damage in rats of both sexes. *General Reanimatology*]. 2011; 7 (6): 28—33. [In Russ.]
9. *Cao J., Niu H., Wang H., Huang X., Gao D.* NF-κB p65/p52 plays a role in GDNF up-regulating Bcl-2 and Bcl-w expression in 6-OHDA-induced apoptosis of MN9D cell. *Int. J. Neurosci.* 2013; 123 (10): 705—710. http://dx.doi.org/10.3109/00207454.2013.795149. PMID: 23590664
10. *Li F., Wang M., Zhu S., Li L., Xiong Y., Gao D.* The potential neuroprotection mechanism of GDNF in the 6-OHDA-induced cellular models of Parkinson's Disease. *Cell Mol. Neurobiol.* 2013; 33 (7): 907—919. http://dx.doi.org/10.1007/s10571—013—9957—0. PMID: 23846419
11. *Li L., Chen H., Chen F., Li F., Wang M., Wang L., Li Y., Gao D.* Effects of glia cell line-derived neurotrophic factor on microRNA expression in a 6-hydroxydopamine-injered dopaminergic cell line. *J. Neural. Transm.* 2013; 120 (11): 1511—1523. http://dx.doi.org/10.1007/s00702—013—1031-z. PMID: 23771700
12. *Youdim M.* Multi target neuroprotective and neurorestorative anti-Parkinson and anti-Alzheimer drugs ladostigil and m30 derived from rasagiline. *Exp. Neurobiol.* 2013; 22 (1): 1—10. http://dx.doi.org/10.5607/en.2013.22.1.1. PMID: 23585716
13. *Wang L., Deng Q., Wu X., Yu J., Yang X., Zhong Y.* Upregulation of glutamate-aspartate transporter by glial cell line-derived neurotrophic factor ameliorates cell apoptosis in neural retina in streptozotocin-induced diabetic rats. *CNS Neurosci. Ther.* 2013; 19 (12): 945—953. http://dx.doi.org/10.1111/cns.12150. PMID: 23870489
14. *Xu S., Bi C., Choi R., Zhu K., Miernisha A., Dong T., Tsim K.* Flavonoids induce the synthesis and secretion of neurotrophic factors in cultured rat astrocytes: a signaling response mediated by estrogen receptor. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2013; 2013: 127075. http://dx.doi.org/10.1155/2013/127075. PMID: 23878590
15. *Kotyuk E., Nemeth N., Halmai Z., Faludi G., Sasvari-Szekely M., Szekely A.* Association between mood characteristics and polymorphisms of glial cell line-derived neurotrophic factor (GNDF) in patients with depression. *Neuropsychopharmacol. Hung.* 2013; 15 (2): 63—72. PMID: 23817357
16. *Myazaki H., Nagashima K., Okuma Y., Nomura Y.* Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor induced by transient forebrain ischemia in rats. *Brain Res.* 2001; 922 (3): 165—172. PMID: 11743946

DOI:10.15360/1813-9779-2014-5-59-68

22. *Корпачев В.Г., Лысенков С.П., Тель Л.З.* Моделирование клинической смерти и постреанимационной болезни у крыс. *Патол. физиол. и эксперим. терапия*. 1982; 3: 78—80. PMID: 7122145

23. *Yan B.C., Park J.H., Kim S.K., Choi J.H., Lee C.H., Yoo K.Y., Kwon Y.G., Kim Y.M., Kim J.D., Won M.H.* Comparison of trophic factors changes in the hippocampal CA1 region between the young and adult gerbil induced by transient cerebral ischemia. *Cell Mol. Neurobiol.* 2012; 32 (8): 1231—1242. http://dx.doi.org/10.1007/s10571—012—9848—9. PMID: 22552890

24. *Xu P., Rosen K., Hedstrom K., Rey O., Guha S., Hart C., Corfas G.* Nerve injury induces glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expression in Schwann cells through purinergic signaling and the PKC-PKD pathway. *Glia*. 2013; 61 (7): 1029—1040. http://dx.doi.org/10.1002/glia.22491. PMID: 23553603

25. *Острова И.В., Аврущенко М.Ш., Волков А.В., Заржецкий Ю.В.* Половые различия структурных изменений головного мозга в постреанимационном периоде. *Общая реаниматология*. 2009; 5 (6): 60—65.

26. *Острова И.В., Аврущенко М.Ш., Заржецкий Ю.В., Афанасьев А.В., Волков А.В.* Гендерные различия в постреанимационном повреждении мозга и в эффективности иммуномодулятора панавира. *Общая реаниматология*. 2010; 6 (6): 25—28.

27. *Chai L., Guo H., Li H., Wang S., Wang Y., Shi F., Hu L., Liu Y., Adah D.* Scutellarin and caffeic acid ester fraction, active components of Dengzhanxixin injection, upregulate neurotrophins synthesis and release in hypoxia/reoxygenation rat astrocytes. *J. Ethnopharmacol.* 2013; 150 (1): 100—107. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.011. PMID: 24012966

28. *Гурвич А.М., Заржецкий Ю.В., Мутускина Е.А., Трубина И.Е., Аврущенко М.Ш., Пылова С.И.* Влияние поведенческой активности на восстановительные процессы у реанимированных крыс. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 1998; 125 (1): 104—106. PMID: 9532381

29. *McCullough M., Gyorkos A., Spitsbergen J.* Short-term exercise increases GDNF protein levels in the spinal cord of young and old rats. *Neuroscience*. 2013; 240: 258—268. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.063. PMID: 23500094

30. *Deng L., Deng P., Ruan Y., Xu Z., Liu N., Wen X., Smith G., Xu X.* A novel growth-promoting pathway formed by GDNF-overexpressing Schwann cells promotes proprospinal axonal regeneration, synapse formation and partial recovery of function after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 2013; 33 (13): 5655—5667. http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2973—12.2013. PMID: 23536080

31. *Gujral C., Minagawa Y., Fujimoto K., Kitano H., Nakaji-Hirabayashi T.* Biodegradable microparticles for strictly regulating the release of neurotrophic factors. *J. Control. Release*. 2013; 168 (3): 307—316. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.03.031. PMID: 23578846

32. *Yang W., Yang C., Xue Y., Lu T., Reiser J., Zhao L., Duan W.* Regulated expression of lentivirus-mediated GDNF in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and its neuroprotection on dopaminergic cells in vitro. *PLoS One*. 2013; 8 (5): e64389. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0064389. PMID: 23717608

33. *Taylor H., Barua N., Bienemann A., Wyatt M., Castrique E., Foster R., Luz M., Fibiger C., Mohr E., Gill S.* Clearance and toxicity of recombinant methionyl human glial cell line-derived neurotrophic factor (r-metHu GDNF) following acute convection-enhanced delivery into the striatum. *PLoS One*. 2013; 8 (3): e56186. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0056186. PMID: 23526931

34. *Quintino L., Manfré G., Wettergren E., Namislo A., Isaksson C., Lundberg C.* Functional neuroprotection and efficient regulation of GDNF using destabilizing domains in a rodent model of Parkinson's disease. *Mol. Ther.* 2013; 21 (12): 2169—2180. http://dx.doi.org/10.1038/mt.2013.169. PMID: 23881415

Поступила 07.02.14

derived mesenchymal stem cells and its neuroprotection on dopaminergic cells in vitro. *PLoS One*. 2013; 8 (5): e64389. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0064389. PMID: 23717608

33. *Taylor H., Barua N., Bienemann A., Wyatt M., Castrique E., Foster R., Luz M., Fibiger C., Mohr E., Gill S.* Clearance and toxicity of recombinant methionyl human glial cell line-derived neurotrophic factor (r-metHu GDNF) following acute convection-enhanced delivery into the striatum. *PLoS One*. 2013; 8 (3): e56186. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0056186. PMID: 23526931

34. *Quintino L., Manfré G., Wettergren E., Namislo A., Isaksson C., Lundberg C.* Functional neuroprotection and efficient regulation of GDNF using destabilizing domains in a rodent model of Parkinson's disease. *Mol. Ther.* 2013; 21 (12): 2169—2180. http://dx.doi.org/10.1038/mt.2013.169. PMID: 23881415

Submited 07.02.14

17. *Ikeda T., Xia X.Y., Xia Y.X., Ikenoue T., Han B., Choi B.H.* Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against ischemia/hypoxia-induced brain injury in neonatal rats. *Acta Neuropathology.* 2000; 100 (2): 161—167. PMID: 10963363

18. *Zarzhetsky Yu.V., Volkov A.V.* Nekotorye voprosy patogeneza i terapii terminalnykh i postreanimatsionnykh sostoyanii (eksperimentalnye issledovaniya). *Obshchaya Reanimatologiya.* [Some problems of the pathogenesis and therapy of terminal and postresuscitation conditions (experimental studies). *General Reanimatology*]. 2012; 8 (4): 55—68. [In Russ.]

19. *Volkov A.V., Avrushchenko M.Sh., Gorenkova N.A., Shcherbakova L.N., Zarzhetsky Yu.V.* Polovye razlichiya otsrochennykh postreanimatsionnykh izmenenii golovnogo mozga (eksperimentalnoe issledovanie). *Obshchaya Reanimatologiya*. [Sexual differences in delayed postresuscitative brain changes (experimental study). *General Reanimatology*]. 2007; 3 (5—6): 97—102. [In Russ.]

20. *Volkov A.V., Avrushchenko M.Sh., Gorenkova N.A., Zarzhetsky Yu.V.* Znachenie polovogo dimorfizma i reproduktivnykh gormonov v patogeneze i iskhode postreanimatsionnoi bolezni. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Implication of sexual dimorphism and reproductive hormones in the pathogenesis and outcome of postresuscitative disease. *General Reanimatology*]. 2006; 2 (5—6): 70—78. [In Russ.]

21. *Lang J.T., McCullough L.D.* Pathways to ischemic neuronal cell death: are sex differences relevant? *J. Transl. Med*. 2008; 6: 33. http://dx.doi.org/10.1186/1479—5876—6-33. PMID: 18573200

22. *Korpachev V.G., Lysenkov S.P., Tel L.Z.* Modelirovanie klinicheskoi smerti i postreanimatsionnoi bolezni u krys. [Modeling clinical death and postresuscitation disease in rats]. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya Terapiya*. 1982; 3: 78—80. PMID: 7122145. [In Russ.]

23. *Yan B.C., Park J.H., Kim S.K., Choi J.H., Lee C.H., Yoo K.Y., Kwon Y.G., Kim Y.M., Kim J.D., Won M.H.* Comparison of trophic factors changes in the hippocampal CA1 region between the young and adult gerbil induced by transient cerebral ischemia. *Cell Mol. Neurobiol.* 2012; 32 (8): 1231—1242. http://dx.doi.org/10.1007/s10571—012—9848—9. PMID: 22552890

24. *Xu P., Rosen K., Hedstrom K., Rey O., Guha S., Hart C., Corfas G.* Nerve injury induces glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expression in Schwann cells through purinergic signaling and the PKC-PKD pathway. *Glia*. 2013; 61 (7): 1029—1040. http://dx.doi.org/10.1002/glia.22491. PMID: 23553603

25. *Ostrova I.V., Avrushchenko M.Sh., Volkov A.V., Zarzhetsky Yu.V.* Polovye razlichiya strukturnykh izmenenii golovnogo mozga v postreanimatsionnom periode. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Gender differences in postresuscitative brain structural changes. *General Reanimatology*]. 2009; 5 (6): 60—65. [In Russ.]

26. *Ostrova I.V., Avrushchenko M.Sh., Zarzhetsky Yu.V., Afanasyev A.V., Volkov A.V.* Gendernye razlichiya v postreanimatsionnom povrezhdenii mozga i v effektivnosti immunomodulyatora panavira. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Gender differences in postresuscitative brain injuri and in the immunomodulator panavir. *General Reanimatology*]. 2010; 6 (6): 25—28. [In Russ.]

27. *Chai L., Guo H., Li H., Wang S., Wang Y., Shi F., Hu L., Liu Y., Adah D.* Scutellarin and caffeic acid ester fraction, active components of Dengzhanxixin injection, upregulate neurotrophins synthesis and release in hypoxia/reoxygenation rat astrocytes. *J. Ethnopharmacol.* 2013; 150 (1): 100—107. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.011. PMID: 24012966

28. *Gurvich A.M., Zarzhetsky Yu.V., Mutuskina E.A., Trubina I.E., Avrushchenko M.Sh., Pylova S.I.* Vliyanie povedencheskoi aktivnosti na vosstanovitelnye protsessy u reanimirovannykh krys. [Effect of behavioral activity on recovery processes in resuscitated rats]. *Byulleten Eksperimentalnoi Biologii i Meditsiny.* 1998; 125 (1): 104—106. PMID: 9532381. [In Russ.]

29. *McCullough M., Gyorkos A., Spitsbergen J.* Short-term exercise increases GDNF protein levels in the spinal cord of young and old rats. *Neuroscience*. 2013; 240: 258—268. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.063. PMID: 23500094

30. *Deng L., Deng P., Ruan Y., Xu Z., Liu N., Wen X., Smith G., Xu X.* A novel growth-promoting pathway formed by GDNF-overexpressing Schwann cells promotes proprospinal axonal regeneration, synapse formation and partial recovery of function after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 2013; 33 (13): 5655—5667. http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2973—12.2013. PMID: 23536080

31. *Gujral C., Minagawa Y., Fujimoto K., Kitano H., Nakaji-Hirabayashi T.* Biodegradable microparticles for strictly regulating the release of neurotrophic factors. *J. Control. Release*. 2013; 168 (3): 307—316. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.03.031. PMID: 23578846

32. *Yang W., Yang C., Xue Y., Lu T., Reiser J., Zhao L., Duan W.* Regulated expression of lentivirus-mediated GDNF in human bone marrow-