ИЗМЕРЕНИЕ УПРУГО-ЭЛАСТИЧНЫХ СВОЙСТВ МЕМБРАНЫ НАТИВНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ *IN VITRO*

В. А. Сергунова¹, Е. К. Козлова², Е. А. Мягкова¹, А. М. Черныш¹

¹ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского, Москва Россия, 107031, Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2 ² Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

In Vitro Measurement of the Elastic Properties of the Native Red Blood Cell Membrane

V. A. Sergunova¹, E. K. Kozlova², E. A. Myagkova¹, A. M. Chernysh¹

¹ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Moscow 25, Petrovka St., Build. 2, Moscow 107031, Russia
 ² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation 8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119991, Russia

Цель исследования. Выработать методику получения изображений нативных клеток в физиологической среде, измерить локальную жесткость фиксированных мембран эритроцитов в жидкости в опытах *in vitro. Материал и методы.* Забор крови производили у четырех здоровых доноров в процессе профилактических осмотров. Кровь помещали в микроветты с ЭДТА. Эритроциты фиксировали в среде буферного раствора на подложку с покрытием полилизина. Изображение клеток получали с помощью АСМ NTEGRA Prima, (NT-MDT, РФ). Жесткость мембран оценивали с помощью метода атомно-силовой спектроскопии. *Результаты.* Получены значения эффективного модуля Юнга для статистической выборки фиксированных мембран эритроцитов. При действии верапамила на кровь модуль Юнга был равен 528±21кП. При действии на кровь ионов тяжелых металлов средняя локальная жесткость высушенной мембраны была увеличена до 942±56 на глубине 35 нм. *Выводы.* Измерения силовых характеристик эритроцитов в жидкости позволяют получать воспроизводимые результаты исследований упруго-эластичных свойств мембран. С помощью метода атомной силовой микроскопии и атомно-силовой спектроскопии можно анализировать свойства, атомно-силовая спектроскопия.

Objective: to develop a procedure to image native cells in a physiological medium and to measure the local stiffness of fixed red blood cell membranes in liquid *in vitro* experiments. *Material and methods*. Blood was taken from 4 healthy donors during prophylactic examinations and placed in EDTA-containing Microvette tubes. The red blood cells were fixed in buffer solution onto a polylysine-coated substrate. Cell images were obtained using an ACM NTEGRA Prima microscope (NT-MDT, the Russian Federation). Membrane stiffness was estimated by atomic force spectroscopy. *Results*. The values of effective Young's modulus were obtained for a statistical sample of fixed red blood cell membranes. Under the action of verapamil on blood, Young's modulus was equal to 528 ± 21 kP. Under the action of heavy metal ions on blood, the mean local stiffness of the dried membrane was increased up to 942 ± 56 at a depth of 35 nm. *Conclusion*. The measurements of the force characteristics of red blood cells in liquid can yield reproducible results of examining the elastic properties of the membranes. Atomic force microscopy and atomic force spectroscopy can be employed analyze the properties of a live cell in the physiological medium. *Key words:* membranes, elastic properties, atomic force spectroscopy, erythrocytes.

DOI:10.15360/1813-9779-2015-3-39-44

Введение	Introduction
Одной из важных задач реаниматологии является	One of the important problems of reanimatology is
определение упруго-эластичных свойств эритроцитов	determining the elasticity patterns of erythrocytes in crit-
при критических состояниях. Эти свойства обеспечи-	ical illness. These properties ensure efficient cell transfer in
вают эффективность транспорта клеток в системе сосу-	vascular microcirculation and effective tissue oxygenation.
дов микроциркуляции и оксигенацию тканей. Для ис-	Different techniques are used to investigate the deforma-
Адрес для корреспонденции:	Correspondence to:
Виктория Сергунова	Victoria Sergunova
E-mail: orbf@mail.ru	E-mail: orbf@mail.ru

следования деформируемости эритроцитов используют разные методы: фильтрацию через поры с диаметрами около 5 мкм, методы лазерной дифрактометрии [1]. Однако это косвенные методы изучения деформируемости эритроцитов. Прямым методом изучение упруго-эластичных свойств эритроцитов является атомносиловая спектроскопия (АСС) [2]. Атомная силовая микроскопия (АСМ) и АСС позволяют непосредственно наблюдать биологические объекты в реальном времени и изучать их механические свойства. При этом АСМ обеспечивает получение изображений поверхности мембран в нанодиапазоне [3, 4], а АСС позволяет исследовать деформируемость и жёсткость биологических объектов [5, 6], в том числе мембран клеток и их фрагментов [7, 8].

Оба эти метода реализуются с помощью атомного силового микроскопа (АСМ) на одной аппаратуре и на одних и тех же образцах. Измерение жёсткости проводится после получения изображений мембран или их фрагментов в поле АСМ [9]. На выбранные участки измерения жёсткости действуют зондом с заданной силой. По деформации биологической структуры делается заключение о жесткости материала и его механических свойствах. Деформируемость и жёсткость мембран эритроцитов меняется при заболеваниях — при сахарном диабете, ишемии миокарда, гипертонии [10, 11], у больных с онкологическими заболеваниями [12, 13]. Изучение нативных биологических объектов на АСМ в жидкости представляет собой технически и методически сложное направление [14, 15], поскольку живые клетки — мягкие объекты, которые плавают в растворе. Для проведения исследований их необходимо зафиксировать на подложке и сформировать монослой [16].

ACM и ACC расширяет возможности получения информации об эритроцитах, потому что оба метода пригодны для исследования характеристик живых клеток в буфере на наноразмерном уровне.

Цель работы — разработать методику получения изображений нативных клеток в жидкой среде, измерить локальную жесткость мембран эритроцитов при различных условиях в жидкости в опытах *in vitro*.

Материал и методы

Забор крови производили у четырех здоровых доноров. В соответствии с требованиями этического комитета НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского было получено согласие всех доноров на проведение исследований. Кровь в объеме 200 мкл помещали в микроветты с ЭДТА (Sarstedt AG and Co., Germany).

Цельную кровь разделяли на плазму и эритроциты с помощью центрифугирования (центрифуга «Hettich Mikro 220R» (Германия) в течение 10 минут, 1000 об/мин). Надосадочную жидкость, содержащую плазму, удаляли и к эритроцитам добавляли раствор буфера (фосфатно-солевой буфер (PBS, pH 7,4) для восстановления исходного объема.

Для стабилизации мембраны в приготовленную суспензию добавляли 100 мкл 1% глутарового альдегида и инкубировали в течение 30 минут, после чего эритроциты отмывали дистиллированной водой. В отмытые эритроциты добавляли bility of erythrocytes: filtration through pores with diameters of about 5 micron, methods of laser diffraction [1]. However, all of this are indirect methods for studying the deformability of red blood cells. Direct method to study the elasticity of erythrocyte membrane is an atomic force spectroscopy (AFS) [2]. Atomic force microscopy (AFM) and AFC allows both direct observing the biological objects in real time and determining their mechanical properties.

AFM allows to obtain images of the membranes surface in the nano range [3, 4]. AFS allows to investigate the deformability and rigidity of biological objects [5, 6] including cell membranes and its fragments [7, 8].

Both of these methods are realized using atomic force microscopes (AFM) on the same equipment and on the same samples. Measurement of rigidity in the AFM field is conducted following acquisition of imagesof the membranes or their fragments by AFM [9]. Probe with a given force affects the selected areas of interest to determine local rigidity. Deformation of biological structures is informative for a rigidity determining of the material and evaluating the mechanical properties of the object. Deformability of erythrocyte membranes and rigidity are changing in various diseases including diabetes, myocardial ischemia, hypertension [10, 11], cancer [12, 13].

Studying native biological objects in fluid with AFM is technically complecated [14, 15] since living cells represent soft objects that float in the solution. For research purposes it is necessary to fix them on the substrate and use a cell monolayer [16]. Therefore, the AFM and AFC expand possibilities of gathering information about erythrocytes making possible to study membrane properties of living cells in the buffer at the nanoscale

The goal of the study was developing a technique for obtaining images of native cells in a physiological environment, to measure the local rigidity of the erythrocytes membranes in fluid in experiment *in vitro*.

Materials and Methods

Blood samples were harvested from four healthy donors following obtaining the informed consent from each donor in accordance to requirements of the Ethics Committee of the V. A. Negovsky Institute of General Reanimatology. Blood was placed in microvetty with EDTA (Sarstedt AG and Co., Germany). Whole blood was divided to plasma and erythrocytes by centrifugation for 10 min at 1000 rpm (centrifuge «Hettich Mikro 220R», Germany).Supernatant containing plasma was discarded and the original volume was restored with phosphate buffered saline (PBS, pH 7,4). For erythrocyte membrane 0,1 ml of 1% glutaraldehyde was added for 30 minutes anderythrocytes were centrifuged in the presence of distilled water added.

The resulting slurry was aliquoted onto a glass coated with polylysine (0,5 mg/ml for one hour in a Petri dish followed by drying on air during 2 hours) and allowed to adhere for 10 minutes, then dipped in a 1% glutaraldehyde for 5 seconds to fix the cells to the glass surface. The resulting sample was washed in PBS and scannned by AFM.

Images were acquired by AFM NTEGRA Prima (NT MDT, Russia) in a liquid using an insert (model AU028NTF) with open liquid cell. Scanning was performed in a contact mode. The number of scan points were 512. Rigidity was evaluated by AFC. This буфер PBS (pH 7,4) в количестве 5 мл. Фиксацию эритроцитов к стеклу в среде буферного раствора, проводили с помощью полилизина. Для этого чистые обезжиренные покровные стекла помещали на 1 час в чашку Петри с раствором полилизина 0,5 мг/мл. После чего высушивали их на воздухе в течение 2 часов.

Полученную суспензию наносили на стекла с полилизиновым покрытием и оставляли для адгезии на 10 минут, затем опускали в 1% глутаровый альдегид на 5 секунд для улучшения фиксации клеток к стеклу. Полученный образец промывали в PBS (pH 7,4) и приступали к сканированию данного образца с помощью ACM.

Для получения изображений с помощью ACM NTEGRA Prima (NT MDT, Россия) в жидкости использовали измерительный вкладыш модели AU028NTF с открытой жидкостной ячейкой. Сканирование производили в контактном режиме. Число точек сканирования — 512. Жесткость мембраны оценивали с помощью метода атомно-силовой спектроскопии. Метод позволяет измерять величину деформации поверхности мембраны и кантилевера в зависимости от вертикального смещения пьезосканера, на котором помещена мембрана [2].

Для получения изображения и измерения деформации мембраны в буфере использовали кантилеверы типа SD-R150-T3L450B-10. Радиус зонда кантилевера 150 нм, коэффициент упругости 0,15 Н/м.

Измерения локальной жёсткости мембраны сухих эритроцитов проводили кантилеверами SD-R150-NCL-10. Радиус зонда кантилевера 150нм. Коэффициент упругости кантилевера 30 Н/м.

Результаты и обсуждение

Для оценки упруго-эластичных свойств мембраны построили зависимость F (h), где F — сила, h — глубина индентации зонда в мембрану.

Для определения модуля Юнга (Е) использовали модель Герца (1), которая описывает деформацию мембраны при действии на нее сферического зонда:

 $F=(4/3)ER^{0.5}h^{(3/2)}(1),$

где: **F** — Сила; **E** — модуль Юнга мембраны; **R** — радиус зонда; **h** — глубина индентации.

По зависимости F(h), можно оценить величину E для разных глубин погружения зонда.

Изображения эритроцитов, полученные в жидкости, и 3D профиль указанной стрелкой клетки, представлены на рис. 1. Диаметр эритроцита 8517 нм, высота 1125 нм, глубина впадины 468 нм.

Изначально ACM изображения клетки при сканировании в жидкости имеют более низкое пространственное разрешение по сравнению с изображением сухих клеток. Качество полученных изображений эритроцитов в жидкости зависит от образца, от выбора



Рис. 1. Изображение нативных эритроцитов в жидкости и профиль эритроцита, указанного стрелкой. Fig. 1. Image of native erythrocytes in a liquid and the profile of the erythrocyte, indicated by the arrow.

method allows measuring the deformation of the membrane and cantilever depending on the vertical displacement of a piezoscanner, on which the membrane is placed [12]. To acquire images and measure the deformation of the membrane the type SD-R150-T3L450B-10 cantilever was used. The radius of the cantilever probe was 150 nm, coefficient of elasticity was 0.15 N/m.

Measurement of local stiffness of the dry membrane of ery-throcytes was performed with cantilevers of SD-R150-NCL-10 type. The radius of the cantilever probe was 150 nm, coefficient of the cantilever elasticity was 30 N/m.

Results and Discussion

For evaluation of elastic properties of the membrane the dependence F (h) was plotted, where F - force, h - depth of probe indentation into the membrane.

Determination of the Young's modulus was performed using the Hertz model (1), which describes the deformation of the membrane under the action of its spherical probe:

Выборка для измерения tg силовой кривой для стекла и мембраны эритроцита в жидкости. Determining tg of force curve for glass and erythrocyte membrane in liquid microenvironment.

Conditions	Number	Number	Number scans	Number of	Number of	All objects	
	of donors	of samples	of on sample	studying cells on sample	local measure- ments on cell	cells	points
Glass		5	3				15
Sample with erythrocytes	4	4	2	5 - 15	6	120	720

Note (примечание): Conditions — условия; glass — стекло; sample with erythrocytes — образец с эритроцитами; number — число: donors — доноров; samples scans on sample — сканов на образце; studying cells on sample — исследуемых клеток на образце; local measurements on cell — локальных измерений на клетке; all objects — всего объектов; cells — клеток; points — точек.

Original Observation



Рис. 2. Кривые измерения жесткости в жидкости: a -стекла; b -мембраны эритроцита. Fig. 2. The curves in measurement of rigidity in liquid: glass (a) vs. erythrocyte membrane (b).



Рис. 3. Эмпирическая зависимость F(h) (1) и теоретическая аппроксимация (2) для мембраны эритроцита в жидкости. Fig. 3. Empirical relationship F (h) (1) and theoretical approximation (2) for the erythrocyte membrane in the fluid. Note (примечание): h (depth of indentation probe, nm) – глубина индентации зонда, нм; F (h) (empirical dependence) – эмпирическая зависимость; kPa – кПа; nN – нН (нананьютон).

оптимальных специфических режимов работы ACM и квалификации исследователя.

На рис. 2 приведены силовые кривые, полученные в жидкости: для стекла (tg φ = 6) (рис. 2, *a*), и силовая кривая для мембраны эритроцита (tg φ =3,3) (рис. 2, *б*).

Общее количество измерений локальной жесткости мембраны эритроцита представлено в табл. 1.

Производили преобразование исходной эмпирической функции I (\triangle Z) в зависимость F(h), где \triangle Z — подъем пьезосканера (нм); I — ток рассогласования фотодиода (нA); h — глубина индентации зонда (нм).

$F=K(I_M/I_{cT}) \cdot \Delta Z$

 $I_{\scriptscriptstyle M}$ и $I_{\scriptscriptstyle CT}$ — токи рассогласования для мембраны и стекла соответственно.

Полученная эмпирическая зависимость F(h) представлена на рис. 3. Эта эмпирическая зависимость была аппроксимированна теоретической зависимостью (1).

$F=(4/3)ER^{0.5}h^{(3/2)}(1)$

 \mathbf{F} – force; \mathbf{E} – Young's modulus of the membrane; \mathbf{R} – probe radius, h the depth of indentation.

We can estimate E for different depths of probe immersion according to the dependence of F (h).

Images of erythrocytes obtained in liquid and the 3D profile of cells are shown in Figure 1. The diameter of the erythrocyte was 8517 nm, height was 1125 nm, the depth was 468 nm.

AFM images of the cells originally scanned in the fluid have a low spatial resolution compared to the images of dry cells. Quality of red blood cells images in a liquid depends on the sample, depends on optimum operating conditions of the AFM and experience of a researcher. Figure 2 (a) shows the power curve obtained for the glass in the fluid (tg φ =6), and Figure 3 (b) illustrates the power curve for the erythrocyte membrane, (tg φ =3.3).

The total number of local rigidity measurements of the erythrocyte membrane is shown in Table 1.

Original empirical function I ($\triangle Z$) was converted into dependence F (h), where $\triangle Z$ – rises of a piezoscanner (nm), I – differential current of photodiode (nA), h – depth of indentation probe (nm).

$F=K(I_M/I_{cT}) \cdot \Delta Z$

Iм и Icr — differential currents for membrane and glass, correspondingly.

The resulting empirical dependence F (h) is shown in Figure 3. These empirical relationships were approximated by theoretical dependence (1).

It was assumed that the mechanical properties of the erythrocyte membrane are uniform. The average values of the Young's modulus of the membrane of red blood cells in the fluid were 310–680 kPa. The specified dispersion was defined as different objects of measurement (cells) and difference of the local properties of the erythrocyte. The Young's modulus on the torus of the cell membrane was 576 kPa (Fig. 1).

Dry erythrocyte membrane is not uniform, and the modulus E for different values of h are different. Empirical



Рис. 4. Эмпирическая зависимость F(h) для мембраны эритроцита высушенного на воздухе; Eef i — графики модели (1) для различных значений эффективного модуля Юнга. Fig. 4. Empirical relationship F (h) for the dry erythrocyte membrane on air; Eef i — graphic model (1) for different values of the effective Young's modulus.

Note (примечание): h (depth of indentation probe, nm) – глубина индентации зонда, нм; F (h) (empirical dependence) – эмпирическая зависимость; nN – нН (нананьютон).

При этом предполагается, что механические свойства мембраны эритроцита однородны. Значения модуля Юнга фиксированных мембран нормальных эритроцитов измеренные в жидкости лежали в пределах 310—680 кПа. Указанный разброс определялся как различными объектами (клетками) измерения, так и различием локальных свойств эритроцита. Модуль Юнга на торе мембраны клетки указанной на рис. 1 составил 576 кПа.

Мембрана сухого эритроцита неоднородна, и модуль Е для разных величин h различен. Эмпирическая зависимость F(h) мембраны сухого эритроцита представлена на рис. 4, где представлены изменения модуля Юнга для различных глубин индентации зонда. Точки пересечения графиков модели Герца с эмпирической кривой дают количественную оценку эффективного модуля Юнга мембраны на глубинах hi.

Литература

- Муравьев А.А., Муравьев А.В., Тихомирова И.А., Булаева С.В., Маймистова А.А. Методы изучения деформируемости эритроцитов в эксперименте и клинике. Клин. лабор. диагностика. 2010; 1: 28–29. РМІD: 20201374
- Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Козлов А.П., Черныш А.М. Измерение локальной жесткости мембран эритроцитов с помощью атомно-силовой спектроскопии. Общая реаниматология. 2013; 9 (1): 14–17. http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-1-14
- Kozlova E.K., Chernysh A.M., Moroz V.V., KuzovlevA.N. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. Micron. 2013; 44: 218–227. http://dx.doi.org/10. 1016/j.micron.2012.06.012. PMID: 22854216
- Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Gudkova O., Sergunova V., Kuzovlev A. Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. Sci. Rep. 2014; 4: 6033. http://dx.doi.org/10.1038/ srep06033. PMID: 25112597
- Dupres V., Verbelen C., Dufrêne Y.F. Probing molecular recognition sites on biosurfaces using AFM. Biomaterials. 2007; 28 (15): 2393–2402. http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.011. PMID: 17126394

dependence F (h) of the dry erythrocyte membrane is shown in Figure 4, which displays changes of Young's modulus for different depths of indentation probe. The point of intersection of the graphs of the Hertz model with empirical curve provides a quantitative estimation of the effective Young's modulus of the membrane at depths hi. Measuring the elasticity of the membrane of dry red blood cells was performed by a cantilever SD-R150-NCL-10. The radius of the probe cantilever was 150 nm. The coefficient of elasticity of the cantilever was 30 N/m.

The empirical dependence of F(h) under the action of verapamil on the blood was approximated by a model (1), as in control cells (Fig. 3), and the average value of Young's modulus was 528±21kP. During action of heavy metal ions on the blood the empirical dependence F(h) for the dried cells was close to the function shown in Figure 4. The average value of local stiffness was increased (942±56kP at a depth of 35 nm). Therefore, measuring the power characteristics of red blood cells in the fluid allows obtaining reproducible results when determining the elasticity patterns of membranes.

Using the methods of AFM and AFS it is possible to analyze properties and morphology of living cells directly in a physiological environment.

Эмпирическая зависимость F(h) при действии верапамила на кровь аппроксимировалась моделью (1), как и у контрольных клеток (рис. 3), а среднее значение модуля Юнга составило 528 ± 21 кП. При действии на кровь ионов тяжелых металлов эмпирическая зависимость F(h) для высушенных клеток была близка к функции, представленной на рис. 4. Средняя величина локальной жесткости была увеличена и составила $E=942\pm56$ на глубине 35 нм. Измерение силовых характеристик эритроцитов в жидкости позволяет получать воспроизводимые результаты исследований упругоэластичных свойств мембран.

Таким образом, с помощью метода атомной силовой микроскопии и атомно-силовой спектроскопии можно анализировать эластично-упругие свойства живой клетки, непосредственно в физиологической среде.

References

- Muravyev A.A., Muravyev A.V., Tikhomirova I.A., Bulaeva S.V., Maimistova A.A. Metody izucheniya deformiruemosti eritrotsitov v eksperimente i klinike. [Techniques for experimental and clinical studies of erythrocyte deformability]. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. 2010; 1: 28–29. PMID: 20201374. [In Russ.]
- Sergunova V.A., Gudkova O.E., Kozlov A.P., Chernysh A.M. Izmerenie lokalnoi zhestkosti membran eritrotsitov s pomoshchyu atomnosilovoi spektroskopii. Obshchaya Reanimatologiya. [Measurement of the local tension of red blood cell membranes by atomic force spectroscopy. General Reanimatology]. 2013; 9 (1): 14–17. http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-1-14. [In Russ.]
- Kozlova E.K., Chernysh A.M., Moroz V.V., KuzovlevA.N. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron.* 2013; 44: 218–227. http://dx.doi.org/10. 1016/j.micron.2012.06.012. PMID: 22854216
- Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Gudkova O., Sergunova V., Kuzovlev A. Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. Sci. Rep. 2014; 4: 6033. http://dx.doi.org/10.1038/ srep06033. PMID: 25112597

Original Observation

- Butt H.-J., Cappella B., Kappl M. Force measurements with the atomic force microscope: technique, interpretation and applications. Surface Sci. Rep. 2005; 59: 1–152. http://dx.doi.org/10.1016/j.surfrep.2005. 08.003
- Kim Y., Kim K., Park Y. Measurement techniques for red blood cell deformability: recent advances. In: Moschandreou T.E. (ed.). Blood cell

 an overview of studies in hematology. Croatia, 2012: 167–195. http://dx.doi.org/10.5772/50698
- Roduit C., van der Goot F.G., De Los Rios P., Yersin A., Steiner P., Dietler G., Catsicas S., Lafont F., Kasas S. Elastic membrane heterogeneity of living cells revealed by stiff nanoscale membrane domains. *Biophys. J.* 2008; 94 (4): 1521–1532. http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.112862. PMID: 17981897
- Мороз В.В., Голубев А.М., Козлова Е.К., Афанасьев А.В., Гудкова О.Е., Новодержкина И.С., Марченков Ю.В., Кузовлев А.Н., Заржецкий Ю.В., Костин А.И., Волков Д.П., Яковлев В.Н. Динамика морфологических изменений эритроцитов и биохимических показателей консервированной цельной крови в различные сроки хранения. Общая реалиматология. 2013; 9 (1): 5–13. http://dx.doi.org/10.15360/ 1813-9779-2013-1-5
- Мороз В.В., Мягкова Е.А., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Остапченко Д.А., Черныш А.М., Решетняк В.И. Морфологические особенности эритроцитов у больных с тяжёлой сочетанной травмой. Общая реапиматология. 2013; 9 (3): 14–23. http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-3-14
- Мороз В.В., Сергунова В.А., Назаров Б.Ф., Козлова Е.К., Черныш А.М., Власов И.Б. Изменения наноструктуры мембран красных клеток крови при кровопотере на этапах хирургического лечения у больных при операциях на спинном мозге. Общая реаниматология. 2013; 9 (2): 5–11. http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-2-5
- Voïtchovsky K., Antoranz Contera S., Kamihira M., Watts A., Ryan J.F. Differential stiffness and lipid mobility in the leaflets of purple membranes. *Biophys. J.* 2006; 90 (6): 2075–2085. http://dx.doi. org/10.1529/biophysj.105.072405. PMID: 16387758
- Lekka M., Fornal M., Pyka-Fościak G., Lebed K., Wizner B., Grodzicki T., Styczeń J. Erythrocyte stiffness probed using atomic force microscope. Biorheology. 2005; 42 (4): 307–317. PMID: 16227658
- Buys A.V., Van Rooy M.J., Soma P., Van Papendorp D., Lipinski B., Pretorius E. Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study. Cardiovasc. Diabetol. 2013; 12: 25. http://dx.doi.org/10.1186/1475-2840-12-25. PMID: 23356738
- Li M., Liu L., Xi N., Wang Y., Dong Z., Xiao X., Zhang W. Atomic force microscopy imaging and mechanical properties measurement of red blood cells and aggressive cancer cells. *Sci. China Life Sci.* 2012; 55 (11): 968–973. http://dx.doi.org/10.1007/s11427-012-4399-3. PMID: 23160828
- Yu M., Wang J., Wang H.X., Liu L., Yan Y., Zhang J., Liang Y., Dong S. Calculation of the intracellular elastic modulus based on an atomic force microscope micro-cutting system. *Sci. Bul.* 2012; 57 (15): 1868– 1872. http://dx.doi.org/10.1007/s11434-012-5053-y
- Мороз В.В., Черныш А.М., Козлова Е.К., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Федорова М.С., Кирсанова А.К., Новодержкина И.С. Нарушение наноструктуры мембран эритроцитов при острой кровопотере и их коррекция перфторуглеродной эмульсией. Общая реаниматология. 2011; 7 (2): 5–9. http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2011-2-5
- Мороз В.В., Голубев А.М., Афанасьев А.В., Кузовлев А.Н., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Черныш А.М. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях. Общая реаниматология. 2012; 8 (1): 52-60. http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2012-1-52
- Ефремов Ю.М., Багров Д.В., Дубровин Е.В., Шайтан К.В., Яминский И.В. Атомно-силовая микроскопия животных клеток: обзор достижений и перспективы развития. Биофизика. 2011; 56 (2): 288–303. PMID: 21542359

Поступила 26.01.2015

- Dupres V., Verbelen C., Dufrêne Y.F. Probing molecular recognition sites on biosurfaces using AFM. Biomaterials. 2007; 28 (15): 2393– 2402. http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.011. PMID: 17126394
- Butt H.-J., Cappella B., Kappl M. Force measurements with the atomic force microscope: technique, interpretation and applications. Surface Sci. Rep. 2005; 59: 1–152. http://dx.doi.org/10.1016/j.surfrep.2005. 08.003
- Kim Y., Kim K., Park Y. Measurement techniques for red blood cell deformability: recent advances. In: Moschandreou T.E. (ed.). Blood cell – an overview of studies in hematology. Croatia, 2012: 167–195. http://dx.doi.org/10.5772/50698
- Roduit C., van der Goot F.G., De Los Rios P., Yersin A., Steiner P., Dietler G., Catsicas S., Lafont F., Kasas S. Elastic membrane heterogeneity of living cells revealed by stiff nanoscale membrane domains. Biophys. J. 2008; 94 (4): 1521–1532. http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.112862. PMID: 17981897
- Moroz V.V., Golubev A.M., Kozlova E.K., Afanasyev A.V., Gudkova O.E., Novoderzhkina I.S., Marchenkov Yu.V., Kuzovlev A.N., Zarzhetsky Yu.V., Kostin A.I., Volkov D.P., Yakovlev V.V. Dinamika morfologicheskikh izmenenii eritrotsitov i biokhimicheskikh pokazatelei konservirovannoi tselnoi krovi v razlichnye sroki khraneniya. Obshchaya Reanimatologiya. [Time course of morphological changes in red blood cells and stored whole blood biochemical parameters in different storage periods. General Reanimatology]. 2013; 9 (1): 5–13. http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-1-5. [In Russ.]
- Moroz V.V., Myagkova E.A., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Ostapchenko D.A., Chernysh A.M., Reshetnyak V.I. Morfologicheskie osobennosti eritrotsitov u bolnykh s tyazheloi sochetannoi travmoi. Obshchaya Reanimatologiya. [Morphological features of red blood cells in patients with severe concomitant injury. General Reanimatology]. 2013; 9 (3): 14–23. http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-3-14. [In Russ.]
- Moroz V.V., Sergunova V.A., Nazarov B.F., Kozlova E.K., Chernysh A.M., Vlasov I.B. Izmeneniya nanostruktury membran krasnykh kletok krovi pri krovopotere na etapakh khirurgicheskogo lecheniya u bolnykh pri operatsiyakh na spinnom mozge. Obshchaya Reanimatologiya. [Changes in the nanostructure of red blood cells in intraoperative blood loss during spinal cord surgery. General Reanimatology]. 2013; 9 (2): 5–11. http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-2-5. [In Russ.]
- Voätchovsky K., Antoranz Contera S., Kamihira M., Watts A., Ryan J.F. Differential stiffness and lipid mobility in the leaflets of purple membranes. *Biophys. J.* 2006; 90 (6): 2075–2085. http://dx.doi. org/10.1529/biophysj.105.072405. PMID: 16387758
- Lekka M., Fornal M., Pyka-Fościak G., Lebed K., Wizner B., Grodzicki T., Styczeń J. Erythrocyte stiffness probed using atomic force microscope. Biorheology. 2005; 42 (4): 307–317. PMID: 16227658
- Buys A.V., Van Rooy M.J., Soma P., Van Papendorp D., Lipinski B., Pretorius E. Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study. Cardiovasc. Diabetol. 2013; 12: 25. http://dx.doi.org/10.1186/1475-2840-12-25. PMID: 23356738
- Li M., Liu L., Xi N., Wang Y., Dong Z., Xiao X., Zhang W. Atomic force microscopy imaging and mechanical properties measurement of red blood cells and aggressive cancer cells. *Sci. China Life Sci.* 2012; 55 (11): 968–973. http://dx.doi.org/10.1007/s11427-012-4399-3. PMID: 23160828
- Yu M., Wang J., Wang H.X., Liu L., Yan Y., Zhang J., Liang Y., Dong S. Calculation of the intracellular elastic modulus based on an atomic force microscope micro-cutting system. *Sci. Bull.* 2012; 57 (15): 1868– 1872. http://dx.doi.org/10.1007/s11434-012-5053-y
- Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Fedorova M.S., Kirsanova A.K., Novoderzhkina I.S. Narushenie nanostruktury membran eritrotsitov pri ostroi krovopotere i ikh korrektsiya perftoruglerodnoi emulsiei. Obshchaya Reanimatologiya. [Impairments in the nanostructure of red blood cell membranes in acute blood loss and their correction with perfluorocarbon emulsion. General Reanimatology]. 2011; 7 (2): 5–9. http://dx.doi.org/ 10.15360/1813-9779-2011-2-5. [In Russ.]
- Moroz V.V., Golubev A.M., Afanasyev A.V., Kuzovlev A.N., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Chernysh A.M. Stroenie i funktsiya eritrotsita v norme i pri kriticheskikh sostoyaniyakh. Obshchaya Reanimatologiya. [The structure and function of a red blood cell in health and critical conditions. General Reanimatology]. 2012; 8 (1): 52-60. http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2012-1-52. [In Russ.]
- Efremov Yu.M., Bagrov D.V., Dubrovin E.V., Shaitan K.V., Yaminsky I.V. Atomno-silovaya mikroskopiya zhivotnykh kletok: obzor dostizhenii i perspektivy razvitiya. [Atomic force microscopy of living cells: advances and future outlooks]. Biofizika. 2011; 56 (2): 288–303. PMID: 21542359. [In Russ.]

Submited 26.01.2015

ЭКСПРЕССИЯ МОЗГОВОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА (BDNF) ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ НЕЙРОНОВ К ГИБЕЛИ В ПОСТРЕАНИМАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

И. В. Острова, М. Ш. Аврущенко

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

Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Increases the Resistance of Neurons to Death in the Postresuscitation Period

I. V. Ostrova, M. Sh. Avrushchenko

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

Одним из наиболее актуальных вопросов в современной нейробиологии и медицине остается поиск веществ, способных защитить клетки головного мозга от повреждающего действия гипоксии. В настоящее время в литературе широко обсуждаются возможности применения нейротрофических факторов, в частности, белка BDNF (brain-derived neurotrophic factor), для лечения неврологических заболеваний. Однако остается неясным, как изменяется уровень экспрессии данного белка в нейронах головного мозга в постреанимационном периоде после остановки системного кровообращения. Цель исследования. Определить уровень экспрессии BDNF в высокочувствительной к ишемии нейрональной популяции клеток Пуркинье мозжечка и оценить его значение в устойчивости нейронов к ишемии-реперфузии. Материалы и методы. У половозрелых белых нелинейных самцов крыс (n=11) под эфирным наркозом вызывали остановку сердца на 12 мин путем внутриторакального пережатия сосудистого пучка сердца с последующим оживлением. Контрольную группу составили ложнооперированные животные (n=11). На 7-е сутки после реанимации методом морфометрического анализа на окрашенных по Нисслю парафиновых срезах толщиной 5-6 мкм определяли общее число клеток Пуркинье на 1 мм длины их слоя. Иммуногистохимическое исследование экспрессии белка BDNF в клетках Пуркинье проводили непрямым пероксидазно-антипероксидазным методом с использованием первичных поликлональных антител против BDNF. Подсчитывали число клеток Пуркинье с разной иммунореактивностью к белку BDNF. Интенсивность экспрессии BDNF оценивали по показателю средней оптической плотности. Результаты. 12-минутная остановка системного кровообращения у крыс приводила к уменьшению числа клеток Пуркинье на 12,5%. При иммуногистохимическом исследовании обнаружено, что число BDNF⁻ нейронов у реанимированых крыс было снижено. При этом число BDNF+ и BDNF++ нейронов соответствовало контрольному уровню. Следовательно, погибали только BDNF-негативные, т. е. не экспрессирующие белок BDNF нейроны. Анализ средней оптической плотности показал, что среди оставшихся нейронов уровень экспрессии белка BDNF был повышен в сравнении с контролем. Выявленные факты свидетельствуют о нейропротективном действии этого белка в постреанимационном периоде. Заключение. Способность к экспрессии белка BDNF является важным фактором, повышающим устойчивость нейронов к гибели в постреанимационном периоде. Это обуславливает перспективность использования BDNF для разработки новых подходов к защите мозга при ишемии-реперфузии. Ключевые слова: белок BDNF, постреанимационный период, гибель нейронов, клетки Пуркинье мозжечка, морфометрический анализ, иммуногистохимия, средняя оптическая плотность.

A search for substances that are able to protect brain cells from the damaging effect of hypoxia remains one of the most relevant issues in modern neurobiology and medicine. Whether neurotrophic factors, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein in particular, can be used to treat neurological diseases is the subject of wide speculation in the literature now. However, how the expression of this protein in the brain neurons changes after systemic circulatory arrest in the postresuscitation period remains uncertain. *Objective:* to estimate the level of BDNF expression in the highly ischemia-sensitive neuronal population of cerebellar Purkinje cells and the value of BDNF in the resistance of neurons to ischemia-reperfusion. *Materials and methods.* In mature outbred male albino rats (n=11), the heart was stopped under ether anesthesia at 12 minutes via intrathoracic ligation of the vascular fascicle, followed by revivification. A control group included pseudo-operated animals (n=11). On days 7 after revivification, a morphometric analysis of Nissl-stained paraffin sections 5-6 µm thick was used to determine the total number of Purkinje cells per 1 mm of their layer length. The expression of BDNF protein in the Purkinje cells was immunohistochemically examined by an indirect peroxidase-antiperoxidase test using primary polyclonal antibodies against BDNF. The count of Purkinje cells with different immune responses to BDNF protein

Адрес для корреспонденции:

Ирина Острова E-mail: irinaostrova@mail.ru Correspondence to:

Irina Ostrova E-mail: irinaostrova@mail.ru Original Observation

was calculated. The intensity of BDNF expression was estimated from the mean optical density. *Results*. 12-minute systemic circulatory arrest in the rats resulted in a 12.5% reduction in the number of Purkinje cells. The immunohistochemical examination revealed a lower numbers of BDNF⁻ neurons in the resuscitated rats. In this case, the count of BDNF⁺ and BDNF⁺⁺ neurons corresponded to their reference level. Consequently, only BDNF-negative neurons, i.e. those that failed to express BDNF protein, died. Analysis of the mean optical density indicated that the remaining neurons had a higher BDNF protein expression than those in the controls. The found facts suggest that this protein has a neuroprotective effect in the postresuscitation period. *Conclusion*. The capability for BDNF expression is an important factor that enhances neuronal resistance to death in the postresuscitation period. *This offers* protein, postresuscitation period, neuronal death, cerebellar Purkinje cells, morphometric analysis, immunohistochemistry, mean optical density.

DOI:10.15360/1813-9779-2015-3-45-53

Ввеление

Introduction

Остановка сердца часто сопровождается нарушениями функции мозга, что является одной из основных причин смертности среди реанимационных больных [1, 2]. Ишемия-реперфузия вызывает повреждение нервных клеток в различных областях головного мозга — сенсомоторной коре, гиппокампе, стриатуме, таламусе, мозжечке. Восстановление функции мозга после реанимации тесно взаимосвязано с состоянием высокочувствительных к гипоксии нейрональных популяций [3]. Поэтому исследование механизмов развивающихся нарушений необходимо для понимания причин постгипоксических энцефалопатий, а также поиска эффективных способов их профилактики и коррекции.

Нами выявлены факторы, способствующие повышению устойчивости нейронов к постреанимационной гибели и являющиеся «индикаторами» повреждения мозга. Так, установлено значение постреанимационных изменений уровня экспрессии белков теплового шока семейства HSP70, глюкозо-регулируемого белка GRP78, глиального нейротрофического фактора GDNF [3–5].

В настоящее время в литературе широко обсуждается терапевтический потенциал нейротрофических факторов в качестве нейропротекторов [6—10]. Нейротрофины — это уникальное семейство полипептидных ростовых факторов, которые влияют на пролиферацию, дифференцировку, выживание и гибель нейронов. Они необходимы для нормального функционирования нервной системы, участвуют в высшей нервной деятельности. Изменения уровня нейротрофинов связаны с рядом нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, хорея Хантингтона [11].

В последние годы пристальное внимание специалистов различных профилей привлекает один из главных представителей семейства нейротрофинов — нейротрофический фактор головного мозга (brain-derived neurotrophic factor — BDNF).

BDNF — это белок с молекулярной массой 14 кДа, принадлежащий к классу цитокинов, семейству факторов роста и подсемейству нейротрофинов. Он экспрессируется в развивающемся и зрелом мозге млекопитающих [12]. Его много в гиппокампе, коре, мозжечке, стриатуме, миндалевидном теле и гипоталамусе [13, 14]. BDNF синтезируется, главным образом, в ней-

Cardiac arrest is commonly accompanied by disturbances of brain function that are considered as one of the main causes of death of critically ill patients [1, 2]. Ischemia-reperfusion causes nerve cell damage in various regions of the brain including sensorimotor cortex, hippocampus, striatum, thalamus and cerebellum. Recovery of brain functions after resuscitation is closely linked to the conditions of neuronal populations highly sensitive to hypoxia [3]. Studies of mechanisms of developing brain disorders are urgently needed to reveal the causes of posthypoxic encephalopathies, as well as to determine more efficient approaches to their prevention and correction.

Previously we have identified factors that can improve the sustainability of neurons to post-resuscitation death and which are considered as «indicators» of a brain damage. They include heat shock protein HSP70, glucoseregulated protein GRP78, glia-derived neurotrophic factor GDNF differentially expressed in brain compartments post-resuscitation [3-5].

Currently the therapeutic potential of neurotrophic factors as neuroprotective agents is thoroughly discussing [6-10]. Neurotrophins belong to unique family of polypeptide growth factors affecting proliferation, differentiation, survival and death of neurons. Neurotrophins are indispensable for normal functioning of the nervous system and involved in activities of CNS. Quantitative changes of neurotrophins have been shown to be associated with a number of neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's chorea [11].

In recent years, attention of scientists has been attracted by one of the main representatives of neurotrophins, the brain-derived neurotrophic factor(BDNF).

BDNF is a 14 kDa protein that belongs to the class of cytokine family of growth factors and neurotrophins subfamily. It is expressed in the developing and adult mammalian brain [12]. There is a large amount of this protein in the hippocampus, cortex, cerebellum, striatum, amygdala and hypothalamus [13, 14]. BDNF is synthesized primarily in neurons. It has been also found in platelets, astrocytes, microglia, endothelium, hepatic cells, muscle [6]. BDNF is indispensible for learning and memory processes, promotion of growth and differentiation of new neurons and synapses [8, 15–17]. BDNF has revealed its antihypoxic properties [18], anti-inflammatory activity [6] and capabilities to inhibit apoptosis [19, 20], stimulate the ронах. Он также обнаружен в тромбоцитах, астроцитах, клетках микроглии, эндотелия, печени, мышечной ткани [6]. BDNF важен для процессов обучения и памяти, способствует росту и дифференцировке новых нейронов и синапсов [8, 15—17]. Установлено, что BDNF обладает антигипоксическими свойствами [18], противовоспалительным действием [6], угнетает апоптоз [19, 20], а также стимулирует регенерацию и рост поврежденных нервных волокон [6]. В многочисленных экспериментальных исследованиях продемонстрировано нейропротективное действие BDNF [8, 21—26].

В эксперименте на различных моделях изолированной ишемии мозга были выявлены изменения экспрессии BDNF. Однако данные этих исследований неоднозначны и различаются по локализации и динамике выявленных сдвигов [27—30].

В связи с этим целью настоящей работы было исследовать уровень экспрессии BDNF в высокочувствительной к ишемии нейрональной популяции клеток Пуркинье мозжечка и оценить его значение в устойчивости нейронов к ишемии-реперфузии.

Материал и методы

Эксперименты проводились на белых нелинейных крысах-самцах массой 190—250 г согласно рекомендациям Этического комитета ФГБНУ НИИ общей реаниматологии имени В. А. Неговского в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минздрава СССР №755 от 12.08.1977). У 11 крыс под эфирным наркозом вызывали остановку сердца на 12 мин путем внутриторакального пережатия сосудистого пучка сердца [31]. Оживление проводили непрямым массажем сердца в сочетании с искусственной вентиляцией легких воздухом в режиме гипервентиляции аппаратом «Animal Respirator» («SMT Geratehandel») с внутритрахеальным введением раствора адреналина в дозе 0,1 мг/кг. Контрольную группу составили ложнооперированные животные (n=11).

На 7-е сутки после реанимации забирали образцы мозга, которые фиксировали либо в растворе Карнуа (для гистологического исследования), либо в формалине (для иммуногистохимического исследования). 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 общее число клеток Пуркинье на 1 мм длины их слоя.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии белка BDNF в клетках Пуркинье проводили непрямым пероксидазно-антипероксидазным методом с использованием первичных поликлональных антител против BDNF (разведение 1:100) (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) и визуализирующей системы LSAB+Kit (DAKO, Glostrup, Denmark). Иммуноцитохимическая реакция контролировалась инкубацией срезов со всеми реагентами кроме первичных антител. Подсчитывали число клеток Пуркинье с разной иммунореактивностью к белку BDNF. При этом выделяли BDNF-негативные (BDNF⁻), BDNF-позитивные (BDNF⁺) и BDNF-сильнопозитивные нейроны (BDNF⁺⁺) (рис. 1).

В работе использовали систему анализа изображений (микроскоп Olympus BX-41 (Japan), фотокамера Olympus 500UZ (Japan), программы Image Scope M (SMA, Russia) и Excel).

Интенсивность экспрессии BDNF оценивали по показателю средней оптической плотности, которую определя-



Рис. 1. Клетки Пуркинье с разным уровнем экспрессии мозгового нейротрофического фактора BDNF. Пероксидазноантипероксидазный метод, докраска гематоксилином. ×400. Fig. 1. Purkinje cells with different levels of BDNF expression. Peroxidase-antiperoxidase method, hematoxylin staining. ×400.

Note (примечание). Here and fig. 2, 3 (здесь и на рис. 2,3): BDNF — brain-derived neurotrophic factor (нейротрофический фактор головного мозга); BDNF⁻-neurons — white arrow (BDNF⁻-нейроны — белая стрелка), BDNF⁺-neurons -black thin arrow (BDNF⁺-нейроны — черная тонкая стрелка); BDNF⁺⁺-neurons — black thick arrow (BDNF⁺⁺-нейроны черная толстая стрелка).

regeneration of damaged nerve fibers [6]. Numerous experimental studies have demonstrated neuroprotective action of BDNF [8, 21-26].

The BDNF expression changes have been revealed in various models of isolated cerebral ischemia. However, these studies were ambiguous and the BDNF expression varied depending on localization and dynamics of the changes [27–30].

The aim of this study was to investigate the level of BDNF expression in hypoxia-sensitive neuronal population of cerebellar Purkinje cells and reveal the contribution of BDNF to the resistance of neurons to ischemiareperfusion.

Materials and Methods

Experiments were carried out on male albino rats (190–250 g body mass) according to the recommendations of the Ethics Committee of V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology in accordance to the «Rules of the work using experimental animals» (Order No755 of the Ministry of Public Health (USSR), 12.08.1977). Rats (n=11) were anesthetized with an ether and cardiac arrest was evoked for 12 min by intrathoracic clamping of the supracardiac bundle of vessels with a special hook [31]. Animals were resuscitated with the aid of chest compressions combined with mechanical air ventilation by «Animal Respirator» (SMT Geratehandel) accompained by intratracheal administration solution of adrenaline at a dose of 0,1 mg/kg. Sham-operated animals served as control (n=11).

On the 7th day after resuscitation brain samples were collected and fixed in Carnoy's solution (for histology) or formalin (for immunohistochemical studies).

Histological study was performed using the slices 5-6 microns thick prepared from paraffin-embedded brain tissue spec-



Рис. 2. Число клеток Пуркинье мозжечка с разной иммунореактивностью к BDNF у контрольных и опытных крыс. Fig. 2. Number of cerebellar Purkinje cells with different BDNF immunoreactivity in control and experimental rats. Note (примечание): * $-P_t < 0,05$; ** $-P_t < 0,01 - vs.$ control (по сравнению с контролем). Data are presented as mean \pm standart error of mean данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. Number of neurons per 1 mm lenght число нейронов на 1 мм длины; control group — контрольная группа; experimental group — экспериментальная группа.

ли в программе Nis Elements 3.2. (Nikon, Japan) на основании визуальной оценки и анализа оптической плотности все объекты (клетки Пуркинье) были разделены на 3 подгруппы: BDNF⁻ (средняя оптическая плотность <0,3 у. е.), BDNF⁺ (0,3 у.е. <средняя оптическая плотность <0,36 у. е.) и BDNF⁺⁺ нейроны (средняя оптическая плотность >0,36 у. е.). Вычисляли относительную частоту признака в каждой группе.

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 7.0. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента, а также критериев Манна-Уитни, Колмогорова-Смирнова. При сравнении частотных величин использовали критерий Пирсона.

Результаты и обсуждение

В ходе гистологического морфометрического исследования выявлено, что у реанимированных крыс на 7-е сутки постреанимационного периода в популяции клеток Пуркинье происходит снижение общего числа нейронов на 12,5%, что свидетельствует об их гибели (16,6±0,6 и 13,6±0,6 в контроле и опыте, соответственно, p_r <0,001).

При иммуногистохимическом исследовании обнаружено, что у реанимированых крыс число BDNF⁻ нейронов снижено на 50%. Число BDNF⁺ и BDNF⁺⁺ нейронов соответствовало контрольному уровню (рис. 2). Следовательно, можно предположить, что гибели подвергались только BDNF-негативные, т.е. не экспрессирующие этот белок нейроны.

При сравнении интенсивности экспрессии белка BDNF в клетках Пуркинье в двух группах было обнаружено, что реанимированные животные отличаются от контрольных по распределению средней оптической плотности (p_{λ} <0,001) (рис. 3). imens, stained with cresyl violet by the Nissl procedure. The total number of Purkinje cells per 1 mm of their layer length was determined.

Immunohistochemical examination of BDNF protein expression in Purkinje cells was performed by indirect peroxidase-antiperoxidase method using polyclonal primary antibodies to BDNF at a 1: 100 dilution (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) and LSAB⁺Kit (DAKO, Glostrup, Denmark). Immunocytochemical reaction was monitored by incubating the sections with all reagents except the primary antibody. Purkinje cells with different BDNF immunoreactivity were counted. Neurons were separated on BDNF-negative (BDNF⁻⁻), BDNF-positive (BDNF⁺) and BDNFstrong positive (BDNF⁺⁺) (Fig. 1).

We used image analysis system that included microscope Olympus BX-41 (Japan), camera Olympus 500UZ (Japan), the program Image Scope M (SMA, Russia), and Excel.

The intensity of BDNF expression was evaluated in terms of mean optical density as defined by the program Nis Elements 3.2. (Nikon, Japan). Based on visual assessment and analysis of the optical density, the objects (Purkinje cells) were divided into 3 subgroups: BDNF⁻ (mean optical density $\leq 0,3$), BDNF⁺ (0,3 < mean optical density $\leq 0,36$) and BDNF⁺⁺ neurons (mean optical density > 0.36). The relative frequencies of each pattern in each group were calculated.

Statistical data processing was performed using Statistica 7.0. The significance of differences was assessed by Student's *t*-test, Mann-Whitney test, Kolmogorov-Smirnov test. When comparing the frequency values we used Pearson criterion.

Results and Discussion

The histological study revealed the decreased total number of neurons in the population of Purkinje cells of resuscitated rats: on the 7th postoperative day, it was 12.5% less vs. control indicating cell death (16.6±0.6 μ 13.6±0.6 in control and experimental groups, correspondently, P_r <0.001).

Immunohistochemical study revealed that the number of BDNF⁻ neurons in resuscitating rats was reduced by 50%. The number of BDNF⁺ and BDNF⁺⁺ neurons did not differ compared to the control (Fig. 2). Data suggest that the BDNF-negative neurons were subjected to death.

When comparing the intensity of BDNF protein expression in Purkinje cells in the two groups it was found that resuscitated animals differ from the control in distribution of a mean optical density ($P_i < 0.001$) (Fig. 3).

Relative frequency distribution of the mean optical density in groups demonstrates that in resuscitated animals the sharing of BDNF⁻ cells among surviving neurons is decreasing with the increase in proportion of BDNF⁺ neurons (by 5.96% and 7.34%, P<0.05 vs. controls) (Fig. 4).

These data demonstrate that the level of BDNF expression increases within the population of Purkinje cells in resuscitated rats compared to control.

Overall, the results of our study suggest that the death of BDNF⁻ cells occurs post-resuscitation. At the same time in the population of survived neurons BDNF expression level increases.

According to this study, the 12-minute systemic circulatory arrest in rats leads to reduction in the number of cerebellar Purkinje cells. Analysis of the number of neurons with different BDNF immunoreactivity showed that BDNF⁻ neurons, i.e. not expressing the protein, die,



Рис. 3. Распределение средней оптической плотности BDNF в нейрональной популяции клеток Пуркинье в контроле (*a*) и опыте (*b*).

Fig. 3. Distribution of the mean optical density of BDNF in neuronal population of Purkinje cells in control (a) and experimental (b) groups.

Note (примечание): mean optical density – значение оптической плотности; number of cells – число клеток.

Анализ относительных частот распределения средней оптической плотности в группах показал, что у реанимированных животных по сравнению с контролем среди сохранившихся нейронов снижалась доля BDNF⁻ клеток (на 5,96%, p<0,05) при повышении доли BDNF⁺ нейронов (на 7,34%, p<0,05) (рис. 4).

Полученные данные указывают на то, что в популяции клеток Пуркинье у реанимированных крыс в сравнении с контролем возрастает уровень экспрессии BDNF.

В целом, результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что в постреанимационном периоде происходит гибель BDNF⁻ клеток. При этом в популяции выживших нейронов уровень экспрессии BDNF повышается.

Согласно данным настоящего исследования, 12-минутная остановка системного кровообращения у крыс приводит к снижению числа клеток Пуркинье мозжечка. Иммуногистохимический анализ числа нейронов с разной иммунореактивностью к BDNF показал, что гибнут BDNF⁻, т. е. не экспрессирующие этот белок клетки Пуркинье. При этом среди оставшихся нейронов уровень экспрессии белка BDNF повышается. Выявленные факты свидетельствуют о нейропротективных свойствах этого белка в постреанимационном периоде.

Аналогичные результаты были получены и на других моделях ишемии. Так, повышение уровня BDNF было выявлено в гиппокампе крыс через 12—24 ч после 8-минутной остановки сердца, вызванной асфиксией [24]. Значительное увеличение числа BDNF-иммунопозитивных нейронов было найдено в черной субстанции через 1 неделю после 90-мин фокальной цереб-



Рис. 4. Содержание нейронов с разной средней оптической плотностью в популяции клеток Пуркинье у контрольных и опытных крыс.

Fig. 4. Content of neurons with different mean optical density in the population of Purkinje cells in control and experimental rats.

Note (примечание): Control group — контрольная группа; experimental group — опытная группа; neurons — нейроны; highly positive — сильно позитивные; positive — позитивные; negative — негативные. ральной ишемии, вызванной пережатием сонной артерии [30]. Микроэмболия головного мозга вызывала увеличение уровня белка BDNF в гиппокампе на 7-е сутки после ишемии [29]. Экспрессия BDNF и его рецептора TrkB в поле CA1 гиппокампа снижалась на ранних сроках (4 часа — 1 сутки) после ишемии мозга у песчанок, однако восстанавливалась в выживших нейронах к 3-им суткам [26].

У больных в критическом состоянии был выявлен повышенный уровень BDNF в плазме крове по сравнению со здоровыми волонтерами [32]. Авторы предположили, что для восстановления функций ЦНС требуютвысокие уровни BDNF, а неспособность ся поддерживать адекватный уровень этого белка связана с дисфункцией мозга. Поэтому BDNF может быть хорошим маркером дисфункции мозга у больных в критическом состоянии, и в целом - иметь важное прогностическое значение в клинике. Недавние исследования это подтверждают. Так, у пациентов с вегетососудистой дистонией и закрытой черепно-мозговой травмой повышение концентрации BDNF в сыворотке крови коррелировало с уменьшением выраженности тревоги и улучшением конгнитивных функций [33]. Низкий уровень BDNF в плазме крови был связан с высокой смертностью среди пациентов отделения интенсивной терапии (Intensive Care Unit) [33]. В 10-летнем исследовании Pikula et al. [34] было обнаружено, что низкие концентрации BDNF в сыворотке пожилых людей связаны с повышенным риском внезапного инсульта. Низкие и крайне высокие значения сывороточной концентрации BDNF являются прогностически неблагоприятными для формирования структурных поражений головного мозга у новорожденных группы риска [35]. Определение уровня BDNF в сыворотке крови можно использовать и в клинической неонаталогии для диагностики тяжести поражения и прогноза развития у детей органических форм поражения ЦНС [36].

Существуют экспериментальные доказательства защитного действия BDNF на нейроны при его экзогенном введении. Так, постишемическая внутрижелудочковая инфузия BDNF предотвращала гибель нейронов поля CA1 гиппокампа и активацию астроглии при глобальной ишемии мозга у крыс [37]. Введение BDNF в остром постишемическом периоде после окклюзии средней мозговой артерии (MCAO) у крыс приводило к уменьшению зоны инфаркта и снижению неврологического дефицита [21, 22].

По мнению многих исследователей, нейропротективный эффект различных воздействий, таких как, гипотермия, ишемическое прекондиционирование, трансплантация микроглии, введение прогестерона, двигательная активность, опосредован именно BDNF и его рецептором TrkB [7–9, 24–26, 38].

Защитное действие BDNF объясняют его антиапоптотическими, противовоспалительными, а также антицитотоксическими свойствами [2, 6, 19, 23].

В литературе широко обсуждаются перспективы применения BDNF в клинике. В настоящее время разwherein the expression level of BDNF protein increases among the remaining neurons. These findings demonstrate neuroprotective properties of BDNF post-resuscitation.

Similar results were obtained in other models of ischemia. Thus, the increased BDNF level was detected in rat hippocampus 12–24 hours after 8-minute – cardiac arrest caused by asphyxia [24]. Significant increase in BDNF-immunopositive neurons were found in the substantia nigra one week after a 90-min focal cerebral ischemia induced by clamping the carotid artery [30]. Brain microembolia evoked increases in BDNF protein expression in the hippocampus 7 days after ischemia [29]. Expression of BDNF and TrkB receptors in the hippocampal CA1 field decreased 4 hours – 1 day after cerebral ischemia in gerbils, but restored in surviving neurons in 3 days [26].

Elevated levels of BDNF in blood plasma were detected in critically ill patients compared to healthy volunteers [32]. The authors suggested that the restoration of the central nervous system requires high levels of BDNF, and failure to maintain adequate levels of this protein is associated with dysfunction of the brain. Therefore, BDNF may serve as a promising marker of a brain dysfunction in critically ill patients, and in general might possess a prognostic value in the clinics. Recent studies confirm the latter suggestion. In patients with vascular dystonia and closed traumatic brain injury the increased BDNF concentration in serum was correlated with a decrease in the severity of both anxiety and cognitive functions improvements [33]. Low levels of BDNF in blood plasma were associated with high mortality in ICU (Intensive Care Unit) [33]. A 10-year study of Pikula et al. [34] have been found that low serum concentrations of BDNF in the elderly are associated with increased risk of sudden stroke. Low and very high values of serum BDNF were found to be prognostically unfavorable for the formation of structural brain damage in newborns at risk [35]. Determining the level of BDNF in the serum was suggested to be employed in clinical neonatology for the diagnosis and prognosis of the severity of the development of organic forms CNS lesions in children [36].

There is an experimental evidence for the protective effect of BDNF in neurons when administered exogenously. Postischemic intraventricular infusion of BDNF prevented neuronal death of hippocampal CA1 neurons and astroglial activation after global cerebral ischemia in rats [37]. The administering of BDNF in the acute postischemic period after middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats decreased infarct aria and reduced neurological deficits [21, 22].

According to numerous studies, the neuroprotective effects of various conditions, such as hypothermia, ischemic preconditioning, microglia transplantation, progesterone administrating, physical activity, are mediated by BDNF and its receptor TrkB [7–9, 24–26, 38].

Protective effect of BDNF was explained by its antiapoptotic, anti-inflammatory, as well as anti-cytotoxic properties [2, 6, 19, 23]. рабатываются различные стратегии для решения проблемы доставки нейротрофинов в мозг (системы переноса с помощью вирусных векторов, стволовых клеток костного мозга, синтетических и натуральных полимеров; синтетические пептидные миметики и т.д.) [6, 10].

Заключение

Остановка системного кровообращения приводит к существенному повреждению популяции клеток Пуркинье мозжечка — снижению общего числа нейронов. При этом гибнут BDNF-негативные клетки. Способность к экспрессии белка BDNF является важным фактором, повышающим устойчивость нейронов к гибели в постреанимационном периоде. Это обуславливает перспективность использования BDNF для разработки новых подходов к защите мозга при ишемии-реперфузии.

Литература

- Schneider A., Böttiger B.W., Popp E. Cerebral resuscitation after cardiocirculatory arrest. Anesth. Analg. 2009; 108 (3): 971–979. http://dx.doi.org/10.1213/ane.0b013e318193ca99. PMID:19224811
- Huang L., Applegate P.M., Gatling J.W., Mangus D.B., Zhang J., Applegate R.L. A systematic review of neuroprotective strategies after cardiac arrest: from bench to bedside (part II-comprehensive protection). Med. Gas Res. 2014; 4: 10. http://dx.doi.org/10.1186/2045-9912-4-10. PMID: 25671079
- Аврущенко М.Ш., Мороз В.В., Острова И.В. Постреанимационные изменения мозга на уровне нейрональных популяций: закономерности и механизмы. Общая реаниматология. 2012; 8 (4): 69–79. http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2012-4-69
- Острова И.В., Аврущенко 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. http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2011-6-28
- Аврущенко М.Ш., Острова И.В., Волков А.В. Постреанимационные изменения экспрессии глиального нейротрофического фактора (GDNF): взаимосвязь с повреждением клеток Пуркинье мозжечка (экспериментальное исследование). Общая реаниматология. 2014; 10 (5): 59–68. http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-5-59-68
- Chen A.I., Xiong L-J., Tong Y.U., Mao M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. Biomed. Rep. 2013; 1 (2): 167–176. http://dx.doi.org/10.3892/br.2012.48. PMID: 24648914
- Ishrat T., Sayeed I., Atif F., Hua F., Stein D.G. Progesterone is neuroprotective against ischemic brain injury through its effects on the PI3K/Akt signaling pathway. *Neuroscience*. 2012; 210: 442–450. http://dx.doi. org/10.1016/j.neuroscience.2012.03.008. PMID: 22450229
- Kim G., Kim E. The effects of antecedent exercise on motor function recovery and brain-derived neurotrophic factor expression after focal cerebral ischemia in rats. J. Phys. Ther. Sci. 2013; 25 (5): 553–556. http://dx.doi.org/10.1589/jpts.25.553. PMID: 24259800
- Singh M., Su C. Progesterone-induced neuroprotection: factors that may predict therapeutic efficacy. Brain Res. 2013; 1514: 98–106. http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.01.027. PMID: 23340161
- Géral C., Angelova A., Lesieur S. From molecular to nanotechnology strategies for delivery of neurotrophins: emphasis on brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmaceutics*. 2013; 5 (1): 127–167. http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics5010127. PMID: 24300402
- Numakawa T. Possible protective action of neurotrophic factors and natural compounds against common neurodegenerative diseases. Neural. Regen. Res. 2014; 9 (16): 1506–1508. http://dx.doi.org/ 10.4103/1673-5374.139474. PMID: 25317165
- Yu H., Chen Z.Y. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. Acta Pharmacol. Sin. 2011; 32 (1): 3– 11. http://dx.doi.org/10.1038/aps.2010.184. PMID: 21131999
- Dugich-Djordjevic M.M., Peterson C., Isono F., Ohsawa F., Widmer H.R., Denton T.L., Bennett G.L., Hefti F. Immunohistochemical visualization of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. Eur. J. Neurosci. 1995; 7 (9): 1831–1839. http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568. 1995.tb00703.x. PMID: 8528456

The perspectives of BDNF use in clinics are commonly discussed. Currently different strategies are being developed to solve the problem of delivering neurotrophins to the brain (transfer systems with viral vectors, bone marrow stem cells, natural and synthetic polymers, synthetic peptide mimetics, etc) [6, 10].

Conclusion

Systemic circulatory arrest leads to significant damage to the cerebellar Purkinje cell population, i.e. reduction of the total number of neurons whereas BDNF-negative cells die. The ability to express the BDNF is indispensible for increasing the resistance of neurons to death in the postoperative period. The data open new perspectives of using BDNF as a main component when developing novel approaches to brain protection from the ischemia-reperfusion-induced damage.

References

- Schneider A., Böttiger B.W., Popp E. Cerebral resuscitation after cardiocirculatory arrest. Anesth. Analg. 2009; 108 (3): 971–979. http://dx.doi.org/10.1213/ane.0b013e318193ca99. PMID:19224811
- Huang L., Applegate P.M., Gatling J.W., Mangus D.B., Zhang J., Applegate R.L. A systematic review of neuroprotective strategies after cardiac arrest: from bench to bedside (part II-comprehensive protection). Med. Gas Res. 2014; 4: 10. http://dx.doi.org/10.1186/2045-9912-4-10. PMID: 25671079
- 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): 69–79. http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2012-4-69. [In Russ.]
- 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. http://dx.doi.org/ 10.15360/1813-9779-2011-6-28. [In Russ.]
- Avrushchenko M.Sh., Ostrova I.V., Volkov A.V. Postreanimatsionnye izmeneniya ekspressii glialnogo neirotroficheskogo faktora (GDNF): vzaimosvyaz s povrezhdeniem kletok Purkinye mozzhechka (eksperimentalnoe issledovanie). Obshchaya Reanimatologiya. [Postresuscitation changes in the expression of Glial-Derived Neurotrophic Factor (GDNF): association with cerebellar Purkinje cell damage (an experimental study). General Reanimatology]. 2014; 10 (5): 59–68. http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-5-59-68. [In Russ.]
- Chen A.I., Xiong L-J., Tong Y.U., Mao M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. Biomed. Rep. 2013; 1 (2): 167–176. http://dx.doi.org/10.3892/br.2012.48. PMID: 24648914
- Ishrat T., Sayeed I., Atif F., Hua F., Stein D.G. Progesterone is neuroprotective against ischemic brain injury through its effects on the PI3K/Akt signaling pathway. *Neuroscience*. 2012; 210: 442–450. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.03.008. PMID: 22450229
- Kim G., Kim E. The effects of antecedent exercise on motor function recovery and brain-derived neurotrophic factor expression after focal cerebral ischemia in rats. J. Phys. Ther. Sci. 2013; 25 (5): 553–556. http://dx.doi.org/10.1589/jpts.25.553. PMID: 24259800
- Singh M., Su C. Progesterone-induced neuroprotection: factors that may predict therapeutic efficacy. Brain Res. 2013; 1514: 98–106. http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.01.027. PMID: 23340161
- Géral C., Angelova A., Lesieur S. From molecular to nanotechnology strategies for delivery of neurotrophins: emphasis on brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmaceutics*. 2013; 5 (1): 127–167. http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics5010127. PMID: 24300402
- Numakawa T. Possible protective action of neurotrophic factors and natural compounds against common neurodegenerative diseases. Neural. Regen. Res. 2014; 9 (16): 1506–1508. http://dx. doi.org/10.4103/1673-5374.139474. PMID: 25317165
- Yu H., Chen Z.Y. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. Acta Pharmacol. Sin. 2011; 32 (1): 3–11. http://dx.doi.org/10.1038/aps.2010.184. PMID: 21131999

- Tapia-Arancibia L., Rage F., Givalois L., Arancibia S. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. Front. Neuroendocrinol. 2004; 25 (2): 77–107. PMID: 15571756
- Gobbo O.L., O'Mara S.M. Impact of enriched-environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia. *Behav. Brain Res.* 2004; 152 (2): 231–241. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2003.10.017. PMID: 15196790
- Ploughman M., Windle V., MacLellan C.L., White N., DoréJJ., Corbett D. Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. Stroke. 2009; 40 (4): 1490–1495. http://dx.doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.531806. PMID: 19164786
- Shih P.C., Yang Y.R., Wang R.Y. Effects of exercise intensity on spatial memory performance and hippocampal synaptic plasticity in transient brain ischemic rats. *PLoS One.* 2013; 8 (10): e78163. http://dx.doi. org/10.1371/journal.pone.0078163. PMID: 24205142
- Ведунова М.В., Сахарнова Т.А., Митрошина Е.В., Мухина И.В. Антигипоксические свойства нейротрофического фактора головного мозга при моделировании гипоксии в диссоциированных культурах гиппокампа. Соврем. технологии в медицине. 2012; 4: 17–23.
- Liu Z., Ma D., Feng G., Ma Y., Hu H. Recombinant AAV-mediated expression of human BDNF protects neurons against cell apoptosis in Abeta-induced neuronal damage model. J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci. 2007; 27 (3): 233–236. PMID: 17641830
- Takeshima Y., Nakamura M., Miyake H., Tamaki R., Inui T., Horiuchi K., Wajima D., Nakase H. Neuroprotection with intraventricular brainderived neurotrophic factor in rat venous occlusion model. Neurosurgery. 2011; 68 (5): 1334–1341. http://dx.doi.org/10.1227/ NEU.0b013e31820c048e. PMID: 21307800
- Schäbitz W.R., Sommer C., Zoder W., Kiessling M., Schwaninger M., Schwab S. Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. Stroke. 2000; 31 (9): 2212–2217. http://dx.doi.org/10.1161/01.STR.31.9.2212. PMID: 10978054
- Zhang Y., Pardridge W.M. Blood-brain barrier targeting of BDNF improves motor function in rats with middle cerebral artery occlusion. Brain Res. 2006; 1111 (1): 227–229. http://dx.doi.org/ 10.1016/j.brainres.2006.07.005. PMID: 16884698
- Kim D.H., Zhao X., Tu C.H., Casaccia-Bonnefil P., Chao M.V. Prevention of apoptotic but not necrotic cell death following neuronal injury by neurotrophins signaling through the tyrosine kinase receptor. J. Neurosurg. 2004; 100 (1): 79–87. PMID: 14743916
- D'Cruz B.J., Fertig K.C., Filiano A.J., Hicks S.D., DeFranco D.B., Callaway C.W. Hypothermic reperfusion after cardiac arrest augments brain-derived neurotrophic factor activation. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2002; 22 (7): 843-851. http://dx.doi.org/10.1097/00004647-200207000-00009. PMID: 12142569
- Ostrowski R.P., Graupner G., Titova E., Zhang J., Dach N., Corleone D., Tang J., Zhang J.H. The hyperbaric oxygen preconditioning-induced brain is mediated by a reduction of early apoptosis after transient cerebral ischemia. *Neurobiol. Dis.* 2008; 29 (1): 1–13. PMID: 17822911
- Lee T.H., Yang J.T., Ko Y.S., Kato H., Itoyama Y., Kogure K. Influence of ischemic preconditioning on levels of nerve growth factor, brainderived neurotrophic factor and their high-affinity receptors in hippocampus following forebrain ischemia. Brain Res. 2008; 1187: 1–11. PMID: 18036511
- Ставчанский В.В., Творогова Т.В., Боцина А.Ю., Скворцова В.И., Лимборская С.А., Мясоедов Н.Ф., Дергунова Л.В. Семакс и его Сконцевой фрагмент РGР влияют на экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов в условиях неполной глобальной ишемии мозга крыс. Молекулярная биология. 2011; 45 (6): 1026–1035. PMID: 22295573
- Shu X., Zhang Y., Xu H., Kang K., Cai D. Brain-derived neurotrophic factor inhibits glucose intolerance after cerebral ischemia. Neural. Regen. Res. 2013; 8 (25): 2370–2378. http://dx.doi.org/10.3969/ j.issn.1673-5374.2013.25.008. PMID: 25206547
- Miyake K., Yamamoto W., Tadokoro M., Takagi N., Sasakawa K., Nitta A., Furukawa S., Takeo S. Alterations in hippocampal GAP-43, BDNF, and L1 following sustained cerebral ischemia. Brain Res. 2002; 935 (1–2): 24–31. http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(02)02420-4. PMID: 12062469
- Uchida H., Yokoyama H., Kimoto H., Kato H., Araki T. Long-term changes in the ipsilateral substantia nigra after transient focal cerebral ischaemia in rats. Int. J. Exp. Pathol. 2010; 91 (3): 256–266. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2613.2010.00712.x. PMID: 20353427
- 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
- Ritter C., Miranda A.S., Giombelli V.R., Tomasi C.D., Comim C.M., Teixeira A.L., Quevedo J., Dal-Pizzol F. Brain-derived neurotrophic factor plasma levels are associated with mortality in critically ill patients even in the absence of brain injury. Crit. Care. 2012; 16 (6): R234. http://dx.doi.org/10.1186/cc11902. PMID: 23245494

- Dugich-Djordjevic M.M., Peterson C., Isono F., Ohsawa F., Widmer H.R., Denton T.L., Bennett G.L., Hefti F. Immunohistochemical visualization of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. Eur. J. Neurosci. 1995; 7 (9): 1831–1839. http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb00703.x. PMID: 8528456
- Tapia-Arancibia L., Rage F., Givalois L., Arancibia S. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. Front. Neuroendocrinol. 2004; 25 (2): 77–107. PMID: 15571756
- Gobbo O.L., O'Mara S.M. Impact of enriched-environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia. *Behav. Brain Res.* 2004; 152 (2): 231–241. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2003.10.017. PMID: 15196790
- Ploughman M., Windle V., MacLellan C.L., White N., Doré JJ., Corbett D. Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. Stroke. 2009; 40 (4): 1490–1495. http://dx.doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.531806. PMID: 19164786
- Shih P.C., Yang Y.R., Wang R.Y. Effects of exercise intensity on spatial memory performance and hippocampal synaptic plasticity in transient brain ischemic rats. *PLoS One.* 2013; 8 (10): e78163. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0078163. PMID: 24205142
- Vedunova M.V., Sakharnova T.A., Mitroshina E.V., Mukhina I.V. Antigipoksicheskie svoistva neirotroficheskogo faktora golovnogo mozga pri modelirovanii gipoksii v dissotsiirovannykh kulturakh gippokampa. [Antihypoxia properties of brain-derived neurotrophic factor in the simulation of hypoxia in dissociated hippocampal cultures]. Sovremennye Tekhnologii v Meditsine. 2012; 4: 17–23. [In Russ.]
- Liu Z., Ma D., Feng G., Ma Y., Hu H. Recombinant AAV-mediated expression of human BDNF protects neurons against cell apoptosis in Abeta-induced neuronal damage model. J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci. 2007; 27 (3): 233–236. PMID: 17641830
- Takeshima Y., Nakamura M., Miyake H., Tamaki R., Inui T., Horiuchi K., Wajima D., Nakase H. Neuroprotection with intraventricular brainderived neurotrophic factor in rat venous occlusion model. *Neurosurgery*. 2011; 68 (5): 1334–1341. http://dx.doi.org/10.1227/ NEU.0b013e31820c048e. PMID: 21307800
- Schäbitz W.R., Sommer C., Zoder W., Kiessling M., Schwaninger M., Schwab S. Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. Stroke. 2000; 31 (9): 2212–2217. http://dx.doi.org/10.1161/01.STR.31.9.2212. PMID: 10978054
- Zhang Y., Pardridge W.M. Blood-brain barrier targeting of BDNF improves motor function in rats with middle cerebral artery occlusion. Brain Res. 2006; 1111 (1): 227–229. http://dx.doi.org/10.1016/ j.brainres.2006.07.005. PMID: 16884698
- Kim D.H., Zhao X., Tu C.H., Casaccia-Bonnefil P., Chao M.V. Prevention of apoptotic but not necrotic cell death following neuronal injury by neurotrophins signaling through the tyrosine kinase receptor. J. Neurosurg. 2004; 100 (1): 79–87. PMID: 14743916
- D'Cruz B.J., Fertig K.C., Filiano A.J., Hicks S.D., DeFranco D.B., Callaway C.W. Hypothermic reperfusion after cardiac arrest augments brain-derived neurotrophic factor activation. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2002; 22 (7): 843–851. http://dx.doi.org/10.1097/00004647-200207000-00009. PMID: 12142569
- Ostrowski R.P., Graupner G., Titova E., Zhang J., Dach N., Corleone D., Tang J., Zhang J.H. The hyperbaric oxygen preconditioning-induced brain is mediated by a reduction of early apoptosis after transient cerebral ischemia. *Neurobiol. Dis.* 2008; 29 (1): 1–13. PMID: 17822911
- Lee T.H., Yang J.T., Ko Y.S., Kato H., Itoyama Y., Kogure K. Influence of ischemic preconditioning on levels of nerve growth factor, brainderived neurotrophic factor and their high-affinity receptors in hippocampus following forebrain ischemia. Brain Res. 2008; 1187: 1–11. PMID: 18036511
- Stavchansky V.V., Tvorogova T.V., Botsina A.Yu., Skvortsova V.I., Limborskaya S.A., Myasoedov N.F., Dergunova L.V. Semaks i ego Ckontsevoi fragment PGP vliyayut na ekspressiyu genov neirotrofinov i ikh retsepterov v usloviyakh nepolnoi globalnoi ishemii mozga krys. [The effect of semax and its C-end peptide PGP on expression of the neurotrophins and their receptors in the rat brain during incomplete global ischemia]. Molekulyarnaya Biologiya. 2011; 45 (6): 1026–1035. PMID: 22295573. [In Russ.]
- Shu X., Zhang Y., Xu H., Kang K., Cai D. Brain-derived neurotrophic factor inhibits glucose intolerance after cerebral ischemia. Neural. Regen. Res. 2013; 8 (25): 2370–2378. http://dx.doi.org/10.3969/ j.issn.1673-5374.2013.25.008. PMID: 25206547
- Miyake K., Yamamoto W., Tadokoro M., Takagi N., Sasakawa K., Nitta A., Furukawa S., Takeo S. Alterations in hippocampal GAP-43, BDNF, and L1 following sustained cerebral ischemia. Brain Res. 2002; 935 (1–2): 24–31. http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(02)02420-4. PMID: 12062469
- Uchida H., Yokoyama H., Kimoto H., Kato H., Araki T. Long-term changes in the ipsilateral substantia nigra after transient focal cerebral ischaemia in rats. Int. J. Exp. Pathol. 2010; 91 (3): 256–266. http://dx.doi.org/ 10.1111/j.1365-2613.2010.00712.x. PMID: 20353427

- 33. Живолупов С.А., Самарцев И.Н., Марченко А.А., Пуляткина О.В. Прогностическое значение содержания в крови нейротрофического фактора мозга (BDNF) при терапии некоторых функциональных и органических заболеваний нервной системы с применением адаптола. Жирн. неерологии и психиатрии им. С.С.Корсакова. 2012; 112 (4): 37–41. PMID: 22810739
- 34. Pikula A., Beiser A.S., Chen T.C., Preis S.R., Vorgias D., DeCarli C., Au R., Kelly-Hayes M., Kase C.S., Wolf P.A., Vasan R.S., Seshadri S. Serum brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor levels are associated with risk of stroke and vascular brain injury: framingham study. Stroke. 2013; 44 (10): 2768–2775. http://dx. doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.001447. PMID: 23929745
- Голосная Г.С., Петрухин А.С., Терентьев А.А., Дуленков А.Б. Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) в ранней диагностике внутрижелудочковых кровоизлияний и перивентрикулярной лейкомаляции у новорожденных детей. Вопросы соврем. neduampuu. 2005; 4 (3): 13–18.
- Попова Ю.Ю., Желев В.А., Михалев Е.В., Филиппов Г.П., Барановская С.В., Ермоленко С.П. Характеристика нейроспецифических маркеров у глубоконедоношенных новорожденных с гипоксическим поражением центральной нервной системы. Сибирский мед. журнал (Томск). 2007; 22 (4): 5–10.
- Kiprianova I., Freiman T.M., Desiderato S., Schwab S., Galmbacher R., Gillardon F., Spranger M. Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death and glial activation after global ischemia in the rat. J. Neurosci. Res. 1999; 56 (1): 21–27. http://dx.doi.org/10.1002/(SICI) 1097-4547(1990401)56:1%3C21::AID-JNR3%3E3.0.CO;2-Q. PMID: 10213471
- Narantuya D., Nagai A., Sheikh A.M., Masuda J., Kobayashi S., Yamaguchi S., Kim S.U. Human microglia transplanted in rat focal ischemia brain induce neuroprotection and behavioral improvement. PLoS One. 2010; 5 (7): e11746. http://dx.doi.org/10.1371/ journal.pone.0011746. PMID: 20668522

Поступила 18.02.2015

- 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.]
- Ritter C., Miranda A.S., Giombelli V.R., Tomasi C.D., Comim C.M., Teixeira A.L., Quevedo J., Dal-Pizzol F. Brain-derived neurotrophic factor plasma levels are associated with mortality in critically ill patients even in the absence of brain injury. Crit. Care. 2012; 16 (6): R234. http://dx.doi.org/10.1186/cc11902. PMID: 23245494
- 33. Zhivolupov S.A., Samartsev I.N., Marchenko A.A., Pulyatkina O.V. Prognosticheskoe znachenie soderzhaniya v krovi neirotroficheskogo faktora mozga (BDNF) pri terapii nekotorykh funktsionalnykh i organicheskikh zabolevanii nervnoi sistemy s primeneniem adaptola. [The prognostic significance of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) for phobic anxiety disorders, vegetative and cognitive impairments during conservative treatment including adaptol of some functional and organic diseases of nervous system]. Zhurnal Nevrologii i Psikhiatrii Imeni S.S.Korsakova. 2012; 112 (4): 37–41. PMID: 22810739. [In Russ.]
- 34. Pikula A., Beiser A.S., Chen T.C., Preis S.R., Vorgias D., DeCarli C., Au R., Kelly-Hayes M., Kase C.S., Wolf P.A., Vasan R.S., Seshadri S. Serum brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor levels are associated with risk of stroke and vascular brain injury: framingham study. Stroke. 2013; 44 (10): 2768–2775. http://dx. doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.001447. PMID: 23929745
- 35. Golosnaya G.S., Petrukhin A.S., Terentyev A.A., Dulenkov A.B. Neirotrofichesky faktor golovnogo mozga (BDNF) v rannei diagnostike vnutrizheludochkovykh krovoizliyanii i periventrikulyarnoi leikomalyatsii u novorozhdennykh detei. [The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in early diagnostics of intraventricular hemorrhages and periventricular leukomalacia in neonates]. Voprosy Sovremennoi Pediatrii. 2005; 4 (3): 13–18. [In Russ.]
- Popova Yu.Yu., Zhelev V.A., Mikhalev E.V., Filippov G.P., Baranovskaya S.V., Ermolenko S.P. Kharakteristika neirospetsificheskikh markerov u glubokonedonoshennykh novorozhdennykh s gipoksicheskim porazheniem tsentralnoi nervnoi sistemy. [Characteristics of neurospecific markers in premature newborns having hypoxic injury of central nervous system]. Sibirsky Meditsinsky Zhurnal (Tomsk). 2007; 22 (4): 5– 10. [In Russ.]
- Kiprianova I., Freiman T.M., Desiderato S., Schwab S., Galmbacher R., Gillardon F., Spranger M. Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death and glial activation after global ischemia in the rat. J. Neurosci. Res. 1999; 56 (1): 21–27. http://dx.doi.org/10.1002/(SICI) 1097-4547(19990401)56:1%3C21::AID-JNR3%3E3.0.CO;2-Q. PMID: 10213471
- Narantuya D., Nagai A., Sheikh A.M., Masuda J., Kobayashi S., Yamaguchi S., Kim S.U. Human microglia transplanted in rat focal ischemia brain induce neuroprotection and behavioral improvement. PLoS One. 2010; 5 (7): e11746. http://dx.doi.org/10.1371/ journal.pone.0011746. PMID: 20668522

Submited 18.02.2015