

Роль мозгового нейротрофического фактора BDNF и его рецептора TrkB в устойчивости нейронов гиппокампа к ишемии-реперфузии (экспериментальное исследование)

И. В. Острова, М. Ш. Аврущенко, А. М. Голубев, Н. В. Голубева

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

The Contribution of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and its TrkB Receptor to Hippocampal Neuron Resistance to Ischemia-Reperfusion (Experimental Study)

Irina V. Ostrova, Maria Sh. Avrushchenko, Arkady M. Golubev, Nataliya V. Golubeva

V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation,
25 Petrovka Str., Bldg. 2, 107031 Moscow, Russia

Мозговой нейротрофический фактор (BDNF) и его рецептор TrkB играют важную роль в восстановлении функции мозга при различных патологических воздействиях, включая ишемию.

Цель исследования: оценка содержания BDNF и его рецептора TrkB в популяциях пирамидных нейронов гиппокампа в постреанимационном периоде и выявление роли этих факторов в устойчивости нейронов к ишемии.

Материал и методы. У белых половозрелых крыс-самцов, перенесших 10-минутную остановку сердца, на разных сроках постреанимационного периода (1-е, 4-е, 7-е, 14-е сутки) исследовали состояние популяций пирамидных нейронов полей CA1 и CA4 гиппокампа. Контролем служили ложнопереворованные животные. С помощью иммуноцитохимических методов выявляли имmunoreактивность к белкам BDNF и TrkB. На основании визуальной оценки и анализа оптической плотности выделяли типы нейронов с разной интенсивностью окраски: слабой (BDNF⁻, TrkB⁻), умеренной (BDNF⁺, TrkB⁺) и сильной (BDNF⁺⁺, TrkB⁺⁺). Определяли общую плотность нейронов и число клеток с разной имmunoreактивностью к исследуемым белкам на 1 мм длины. В работе использовали микроскоп Olympus BX-41, программы Image Scope M, ImageJ 1,48v, MS Excel. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 7.0.

Результаты. У реанимированных животных в сравнении с контролем в обоих исследованных полях гиппокампа наблюдали снижение общей плотности популяции пирамидных нейронов: в поле CA1 – на 4-е сутки после остановки сердца (на 26%), в поле CA4 – на 7-е сутки (на 38,5%). Выявили, что в поле CA4 на 4-е сутки в 2 раза возрастало число BDNF⁺-нейронов, а число BDNF⁺⁺-нейронов снижалось. На 7-е сутки резко снижалось число BDNF⁻-клеток, число BDNF⁺-клеток уменьшалось до контрольного уровня, а число BDNF⁺⁺-нейронов оставалось сниженным относительно контроля. В поле CA1 на 4-е сутки наблюдали снижение числа BDNF⁻ и BDNF⁺-клеток при сохранении числа BDNF⁺⁺-нейронов. На 14-е сутки выявленные изменения сохранялись.

При анализе имmunoreактивности к белку TrkB в поле CA4 на 7-е сутки постреанимационного периода выявили уменьшение числа TrkB⁻-клеток по сравнению с контролем. К 14-м суткам было снижено число не только TrkB⁻-нейронов, но и TrkB⁺-клеток при сохранении числа TrkB⁺⁺-нейронов на уровне контроля. В поле CA1 на 4-е сутки после реанимации наблюдали уменьшение числа TrkB⁻-нейронов, на 7-е сутки – уменьшение числа как TrkB⁺, так и TrkB⁻-нейронов. К 14-м суткам число TrkB⁻-нейронов оставалось сниженным. Число TrkB⁺⁺-нейронов при этом сохранялось на контрольном уровне за все время наблюдения.

Заключение. Полученные результаты указывают на то, что устойчивость нейронов к ишемии-реперфузии ассоциирована с содержанием в них белков BDNF и TrkB. Снижение общей плотности нейронов в постреанимационном периоде происходило как в поле CA1, так и в поле CA4 гиппокампа, при этом гибели подвергались только клетки с минимальным и умеренным содержанием исследуемых белков. Нейроны с наибольшим содержанием белков BDNF и TrkB выживали.

Ключевые слова: гиппокамп; пирамидные нейроны; поле CA1; поле CA4; остановка сердца; постреанимационный период; ишемия; иммуногистохимия; BDNF; TrkB; нейропротекция

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its TrkB receptor contribute greatly to restoration of brain function in various pathological conditions, including ischemia.

Адресс для корреспонденции:

Ирина Острова
E-mail: irinaostrova@mail.ru

Correspondence to:

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

The purpose of the study: to assess the content of BDNF and its TrkB receptor in the populations of hippocampal pyramidal neurons in the post-resuscitation period and to identify the contribution of these factors to the neuron resistance to ischemia.

Material and methods. The condition of populations of pyramidal neurons of the CA1 and CA4 hippocampus fields was investigated in white mature male rats that underwent a 10-minute cardiac arrest at different periods of the post-resuscitation period (1st, 4th, 7th, 14th day). Animals after a sham surgery served as a reference group. Immunocytochemical methods were used to determine immunoreactivity to BDNF and TrkB proteins. Based on the visual inspection and analysis of the optical density, the following types of neurons with different color intensity were distinguished: weak (BDNF⁻, TrkB⁻), moderate (BDNF⁺, TrkB⁺) and strong (BDNF⁺⁺, TrkB⁺⁺). The total density of neurons and the number of cells with different immunoreactivity to the studied proteins per 1 mm of length were determined. We used the Olympus BX-41 microscope and Image Scope M, ImageJ 1.48 v, MS Excel software. Statistical data processing was performed using Statistica 7.0 software.

Results. There was a decrease in the overall density of the population of pyramidal neurons in both studied fields of the hippocampus of the resuscitated animals as compared to the reference group: in the CA1 field, on the 4th day after cardiac arrest (26%); in the CA4 field, on the 7th day (38.5%). It was found that the number of BDNF⁺ neurons doubled in the CA4 field on the 4th day, and the number of BDNF⁺⁺ neurons decreased. On the 7th day, the number of BDNF⁻ cells decreased sharply, the number of BDNF⁺ cells decreased to the reference level, and the number of BDNF⁺⁺ neurons remained reduced vs. the reference group. There was a decrease in the number of BDNF⁻ and BDNF⁺ cells in the CA1 field on the 4th day, while the number of BDNF⁺⁺ neurons remained the same. The observed changes remained on Day 14.

The analysis TrkB protein expression in the CA4 field on the 7th day of the post-resuscitation period as revealed by reactivity with anti-TrkB antibody demonstrated a decrease in the number of TrkB⁻ cells as compared to the reference group. By the 14th day, the number of not only TrkB⁻ neurons, but also TrkB⁺ cells was reduced, while the number of TrkB⁺⁺ neurons remained at the level of the reference group. There was a decrease in the number of TrkB⁺ neurons was observed in the CA1 field on the 4th day after resuscitation. On day 7, there was a decreased numbers of both TrkB⁺ and TrkB⁻-neurones. The number of TrkB⁻-neurones remained decreased up to day 14. At that, the number of TrkB⁺⁺ neurons persisted at the reference level throughout the observation period.

Conclusion. The obtained results demonstrate that the resistance of neurons to ischemia-reperfusion is associated with the intracellular expression of BDNF and TrkB proteins. The reduction of the overall density of neurons in the post-resuscitation period was observed both in hippocampal fields CA1 and CA4; only cells with minimal and moderate content of the studied proteins died. Neurons with the highest BDNF and TrkB protein content survived.

Keywords: hippocampus; pyramidal neurons; CA1 field; CA4 field; cardiac arrest; post-resuscitation period; ischemia; immunohistochemistry; BDNF; TrkB; neuroprotection

Введение

В последние годы значительно вырос интерес к ростовым факторам как потенциальным терапевтическим агентам для борьбы с постишемическими нарушениями мозга [1, 2]. Активно изучается эффективность терапии, которая стимулирует локальную выработку этих факторов и их рецепторов в поврежденной ткани мозга [3, 4].

Нейротрофические факторы — это полипептиды, которые играют важную роль в поддержании функции нейронов, участвуя в процессах выживания, роста, дифференцировки клеток нервной системы, а также в механизмах нейрональной пластичности, обучения и памяти. Среди членов этого семейства наиболее изученным является мозговой нейротрофический фактор (BDNF), который обладает свойствами нейропротектора и играет важную роль в восстановлении функции мозга при различных нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, хорея Гентингтона [3, 5].

BDNF опосредует свое положительное действие через тропомиозинкиназный receptor — TrkB [6], связывание с которым запускает каскады внутриклеточных сигнальных молекул, направлен-

Introduction

The interest in growth factors as potential therapeutic agents to combat post-ischemic brain disorders has increased significantly over recent years [1, 2]. The efficacy of a therapy that stimulates local production of these factors and their receptors in the damaged brain tissue is actively studied [3, 4].

Neurotrophic factors are polypeptides that play an important role in maintaining the function of neurons that are involved in the survival processes, growth, differentiation of neurons, as well as in the mechanisms of neural plasticity, learning and memory. The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is the most studied member of this group, which has neuroprotective properties and plays an important role in restoring brain function in various neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Huntington's chorea [3, 5].

BDNF mediates its positive action through a tropomyosin receptor called TrkB [6], binding to which triggers cascades of intracellular signaling molecules aimed to the proliferation, neuron survival and the maintenance of normal synaptic plasticity. TrkB signaling is considered to be the most important pro-

ные на пролиферацию, выживание нейронов и поддержание нормальной синаптической пластичности. TrkB-сигналинг рассматривают в качестве важнейшего защитного механизма, запускаемого повреждением мозга, и ключевого регулятора выживания нейронов [7, 8].

Однако, в литературе недостаточно сведений об уровне и характере экспрессии TrkB в наиболее чувствительных к гипоксии областях головного мозга, в частности, в гиппокампе, в норме и при ишемии, вызванной временной остановкой сердца. Учитывая тот факт, что нейропротективный эффект BDNF и его миметиков опосредован именно TrkB, и его тесную взаимосвязь с функциональным состоянием ЦНС, целесообразно исследовать динамику содержания BDNF и TrkB в нейрональных популяциях головного мозга в постреанимационном периоде. Это даст возможность оценить, как реализуются нейропротективные свойства BDNF в высокочувствительных к гипоксии нервных клетках. Известно, что пирамидные нейроны гиппокампа — отдела мозга, связанного с процессами обучения и памяти, — в наибольшей степени подвержены действию ишемии [9].

Цель исследования — оценка содержания BDNF и его рецептора TrkB в популяциях пирамидных нейронов гиппокампа в постреанимационном периоде и выявление роли этих факторов в устойчивости нейронов к ишемии-реперфузии.

Материал и методы

Исследовали мозг белых нелинейных половозрелых крыс-самцов массой 190–250 г, перенесших 10-минутную остановку сердца ($n=21$) (внутриторакальное пережатие сосудистого пучка сердца) [10]. Через 1, 4, 7, 14 суток после реанимации (непрямой массаж 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) животных выводили из эксперимента декапитацией под наркозом (по 5–7 животных на каждый срок постреанимационного периода). Контролем служили ложнопереведенные крысы ($n=5$). Эксперименты проводили согласно рекомендациям Этического комитета ФГБНУ 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).

Сразу после декапитации выделяли мозг и фиксировали его в 4% растворе параформальдегида на 0,1М фосфатном буфере pH 7,4 (PBS) 1 сутки при 4°C. После стандартной обработки образцы мозга заливали в парафин. С парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 5–6 мкм. Исследовали постреанимационные изменения нейрональных популяций пирамидных нейронов полей CA1 и CA4 гиппокампа.

Депарафинизированные срезы обрабатывали 1% перекисью водорода в течение 15 минут для блокирования эндогенной пероксидазной активности. Затем срезы промывали в дистilledированной воде и проводили демаскирование антигенов в цитратном буфере pH 6.0

tective mechanism triggered by brain damage and a key regulator of neuronal survival [7, 8].

However, the literature lacks data on the level and nature of TrkB protein expression in areas of the brain that are most sensitive to hypoxia, in particular, in the hippocampus, under normal conditions and in ischemia caused by temporary cardiac arrest. Since the neuroprotective effect of BDNF and its mimetics is mediated by TrkB and there is a close relationship with the functional state of the central nervous system, it is recommended to study the dynamics of the BDNF and TrkB content in neuronal populations of the brain in the post-resuscitation period. This will provide an opportunity to assess how neuroprotective properties of BDNF are implemented in neurons with high sensitivity to hypoxia. It is known that the pyramidal neurons of the hippocampus, the part of the brain associated with learning and memory, are most susceptible to ischemia [9].

The purpose of this study is to assess the content of BDNF and its TrkB receptor in the populations of hippocampal pyramidal neurons in the post-resuscitation period and to identify the contribution of these factors to the neuron resistance to ischemia.

Materials and Methods

The brains of white nonlinear mature male rats weighing 190–250 g who underwent a 10-minute cardiac arrest ($n=21$) (intra-thoracic clamping of the vascular bundle) were studied [10]. 1, 4, 7, 14 days after resuscitation (indirect cardiac massage in combination with mechanical ventilation in the hyperventilation mode using «Animal Respirator» device manufactured by «SMT Geratehandel», with intra-tracheal injection of epinephrine solution at a dose of 0.1 mg/kg), the animals were withdrawn from the experiment by decapitation under anesthesia (5–7 animals for each term of the post-resuscitation period). Rats after a sham surgery served as a reference group ($n=5$). Experiments were carried out in accordance with the recommendations of the Ethics Committee of the V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, in accordance with the «Guidelines for works involving experimental animals» (Order No. 755 of the Ministry of Health of the USSR dated 12.08.1977).

Immediately after decapitation, the brain was isolated and fixed in 4% paraformaldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 (PBS) for 1 day at 4°C. After standard treatment, brain samples were embedded into paraffin. 5–6 μm sections were made from paraffin blocks. Post-resuscitation changes in populations of pyramidal neurons of the CA1 and CA4 hippocampal fields were investigated.

The deparaffinized tissue section were treated with 1% hydrogen peroxide for 15 minutes to block endogenous peroxidase activity. Then the sections were washed in distilled water and antigens were unmasked in citrate buffer pH 6.0 (DAKO, Glostrup, Denmark) in a water bath for 15 minutes to block endogenous peroxidase activity. The sections were cooled for a half an hour, washed in water and PBS; Protein Block Serum-free (DAKO, Glostrup, Denmark) was used to prevent nonspecific binding of primary or secondary antibodies to tissue proteins for 15 minutes. After washing in the phosphate buffer, the slices were incubated at room temper-

(DAKO, Glostrup, Denmark) на водяной бане 15 минут. Срезы охлаждали полчаса, промывали в воде и PBS, для предотвращения неспецифического связывания первичных или вторичных антител с белками ткани использовали Protein Block Serum-free (DAKO, Glostrup, Denmark) в течение 15 минут. После промывания в фосфатном буфере срезы инкубировали 1 ч при комнатной температуре с первичными поликлональными антителами против BDNF (разведение 1:50) (Santa Cruz, USA) или против TrkB (разведение 1:100) (Santa Cruz., USA). Промыв срезы в фосфатном буфере (5 минут), их инкубировали 1 час при комнатной температуре с вторичными антителами LSAB Kit (LSAB (DAKO, Glostrup, Denmark)). Далее срезы промывали в фосфатном буфере. Иммунную реакцию выявляли после 10-минутной инкубации в растворе 3,3-диаминонебензидина (DAKO, Glostrup, Denmark). После промывки срезов в фосфатном буфере их докрашивали гематоксилином (Shandon, Pittsburgh, PA, USA) и заключали в водорастворимую среду ImmuMount (Shandon, Pittsburgh, PA, USA). Иммуногистохимическую реакцию контролировали инкубацией срезов со всеми реагентами кроме первичных антител.

С помощью микроскопа Olympus BX-41 и программы ImageScopeM получали изображения. Интенсивность иммуногистохимической реакции в цитоплазме нейронов оценивали с помощью программы анализа изображений ImageJ 1,48v. Определяли «среднее значение серого» (Mean Gray Value) и рассчитывали оптическую плотность (в условных единицах — у. е.) по формуле: $OD=\log_{10}(255/\text{Mean Gray Value})$. Для визуальной оценки интенсивности окраски срезы докрашивали гематоксилином. На основании анализа гистограмм распределения нейронов по их оптической плотности и визуальной оценки выделяли соответствующие ранги для нейронов с разной степенью окраски: слабой, умеренной и сильной (рис. 1). Ранги оптической плотности были следующими: для TrkB-слабопозитивных клеток (TrkB^-) — $OD<0,3$; для TrkB-умереннопозитивных (TrkB^+) — $0,30\leq OD<0,34$; для TrkB-сильнопозитивных (TrkB^{++}) — $OD\geq 0,34$; для BDNF-слабопозитивных клеток (BDNF^-) — $OD<0,24$; для BDNF-умереннопозитивных (BDNF^+) — $0,24\leq OD<0,28$; BDNF-сильнопозитивных (BDNF^{++}) — $OD\geq 0,28$. Определяли общую плотность популяции нейронов, а также число нейронов с разной иммунореактивностью к исследуемым белкам на 1 мм длины клеточного слоя.

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 7.0 с использованием метода ANOVA для множественных сравнений (Post-hoc comparisons of means).

Результаты и обсуждение

Установили, что 10-мин остановка сердца приводит к снижению общей плотности нейронов: в поле CA4 — на 7-е сутки после реанимации (на 38,5% в сравнении с контролем), в поле CA1 — на 4-е сутки (на 26% в сравнении с контролем), что свидетельствует о гибели пирамидных клеток (рис. 2). Таким образом, выпадение нейронов в поле CA1 происходит раньше, чем в поле CA4, что согласуется с данными других исследователей о высокой ранимости нейронов CA1 в постишемическом периоде [9, 11]. На 14-е сутки постреани-

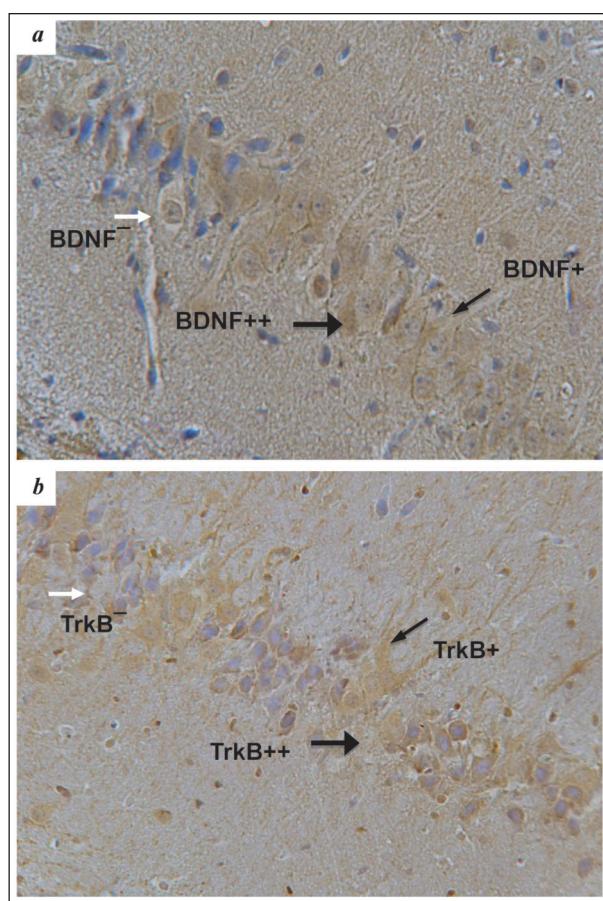


Рис. 1. Нейроны поля CA4 с разной иммунореактивностью к BDNF (a) и TrkB (b).

Fig. 1a. Neurons of the CA4 field with different immunoreactivity to BDNF (a) and TrkB (b).

Note. For Fig. 1, 3: the immunoreactivity to BDNF and TrkB — $^-$ mild positive, $^+$ moderately positive, $^{++}$ strongly positive. Indirect peroxidase-antiperoxidase method, additional staining with hematoxylin. $\times 400$ (a), $\times 200$ (b).

Примечание. Для рис. 1, 3: иммунореактивность к белкам BDNF и TrkB — $^-$ слабая, $^+$ умеренная, $^{++}$ сильная. Непрямой пероксидазно-антiperоксидазный метод, докраска гематоксилином. $\times 400$ (a), $\times 200$ (b).

ature with primary polyclonal antibodies against BDNF (dilution 1:50) (Santa Cruz, USA) or against TrkB (dilution 1:100) (Santa Cruz., USA) for 1 h. After washing the sections in phosphate buffer (5 minutes), they were incubated at room temperature with secondary LSAB Kit antibodies (LSAB (DAKO, Glostrup, Denmark) for 1 h. Then the sections were washed in phosphate buffer. The immune response was detected after a 10-minute incubation in 3,3-diaminobenzidine solution (DAKO, Glostrup, Denmark). After washing the sections in the phosphate buffer, they were stained with hematoxylin (Shandon, Pittsburgh, PA, USA) and enclosed in a water-soluble medium Immu-Mount (Shandon, Pittsburgh, PA, USA). The immunohistochemical reaction was controlled by incubation of sections with all reagents except primary antibodies.

Images were obtained using the Olympus BX-41 microscope and ImageScopeM software. The intensity of the immunohistochemical reaction in the neuronal cytoplasm was evaluated using the ImageJ 1.48 v imaging software. The «Mean Gray Value» was determined and the optical density

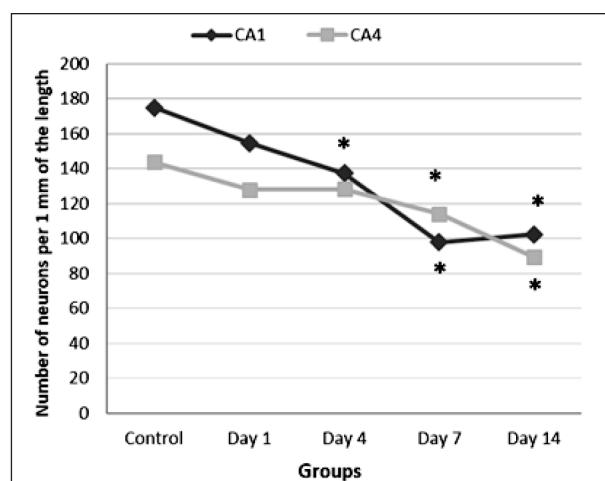


Рис. 2. Изменение общей плотности популяций пирамидных нейронов полей CA1 и CA4 гиппокампа в постреанимационном периоде.

Fig. 2. The change in the total density of pyramidal neuron populations in hippocampal fields CA1 and CA4 in the post-resuscitation period.

Note. * – $P<0.05$ c vs. the reference group.

Примечание. Для рис. 2, 3: Groups – группы; Number of neurons per 1 mm of the length – число нейронов на 1 мм длины. * – $p<0,05$ по сравнению с контролем.

мационного периода общая плотность обеих нейрональных популяций оставалась сниженной.

Иммуногистохимическое исследование показало, что в норме (у контрольных животных) в поле CA4 преобладают нейроны с умеренной и сильной имmunoreактивностью к белку BDNF (рис. 3, a), а в поле CA1 – нейроны с умеренной имmunoreактивностью к белку BDNF (рис. 3, b).

Установили, что в поле CA4 на 4-е сутки после реанимации число BDNF⁺-нейронов возрастало, число BDNF⁺⁺ клеток снижалось, а число BDNF⁻ нейронов не изменялось по сравнению с контролем (рис. 3, a). Полученные данные свидетельствуют о снижении имmunoreактивности к BDNF в данной нейрональной популяции.

На 7-е сутки постреанимационного периода в поле CA4 резко уменьшилось число BDNF⁻-нейронов, число BDNF⁺-нейронов снизилось до контрольного уровня, а число BDNF⁺⁺-нейронов оставалось сниженным относительно контроля (рис. 3, a). Поскольку именно к 7-м суткам развивался процесс гибели нейронов в данной области, можно полагать, что дегенерации подвергались клетки со слабой и умеренной имmunoreактивностью к BDNF. В дальнейшем между 7-ми и 14-ми сутками постреанимационного периода изменений числа нейронов с разной BDNF-имmunoreактивностью в поле CA4 не выявлено.

В поле CA1 гиппокампа на 4-е сутки после реанимации наблюдалось уменьшение числа как BDNF⁻-нейронов, так и BDNF⁺-нейронов по сравнению с контрольным уровнем, при сохранении числа BDNF⁺⁺-клеток. Учитывая тот факт, что

(in arbitrary units) was calculated according to the formula: $OD = \log_{10} (255 / \text{Mean Gray Value})$. The sections were additionally stained with hematoxylin for visual inspection of the staining intensity. Based on the analysis of histograms of the distribution of neurons by their optical density and visual assessment, the corresponding ranks for neurons with different degrees of staining were distinguished: weak, moderate and strong (fig. 1). Optical density grades were as follows: for TrkB mild positive cells ($TrkB^-$), $OD < 0.3$; for TrkB moderately positive cells ($TrkB^+$), $0.30 \leq OD < 0.34$; for TrkB strongly positive cells ($TrkB^{++}$), $OD \geq 0.34$; for BDNF mild positive cells ($BDNF^-$), $OD < 0.24$; for BDNF moderately positive cells ($BDNF^+$), $0.24 \leq OD < 0.28$; BDNF strongly positive cells ($BDNF^{++}$) – $OD \geq 0.28$. The total density of neurons and the number of cells with different immunoreactivity to the studied proteins per 1 mm of cellular layer length were determined.

Statistical data processing was performed in the Statistica 7.0 software using the ANOVA method for multiple comparisons (post-hoc comparisons of means).

Results and Discussion

It was found that a 10-minute cardiac arrest resulted in a decrease in the total density of neurons in the CA4 field (on 7th day after resuscitation, 38.5% vs. the reference group) and in the CA1 field (on 4th day post-resuscitation, 26% vs. the reference group), indicating the death of pyramidal cells (fig. 2). Therefore, neuronal loss in the CA1 field occurs earlier than in the CA4 field, which is consistent with the data of other researchers on the high vulnerability of CA1 neurons in the post-ischemic period [9, 11]. On the 14th day of the post-resuscitation period, the total density of both neuronal populations remained reduced.

The immunohistochemical assay showed that neurons with moderate and strong immunoreactivity to the BDNF protein prevail in the CA4 field (fig. 3, a), and neurons with moderate immunoreactivity to the BDNF protein prevail in the CA1 field under normal conditions (in the reference group animals) (fig. 3, b).

It was found that the number of BDNF⁺ neurons increased in the CA4 field on the 4th day after resuscitation; the number of BDNF⁺⁺ cells decreased, and the number of BDNF⁻ neurons did not change compared to the reference group (fig. 3, a). The data indicate a decreased BDNF protein expression in this neuronal population.

On the 7th day of the post-resuscitation period, the number of BDNF⁻ neurons decreased sharply in the CA4 field; the number of BDNF⁺ neurons decreased to the reference level, and the number of BDNF⁺⁺ neurons remained reduced vs. the reference group (fig. 3, a). Since the process of neuronal death in this area developed on the 7th day, it can be assumed that cells with mild and moderate expression of BDNF protein were exposed to degeneration. Then no changes in the number of neurons with different BDNF-immunoreactivity in the CA4 field were detected between 7 and 14 days of the post-resuscitation period.

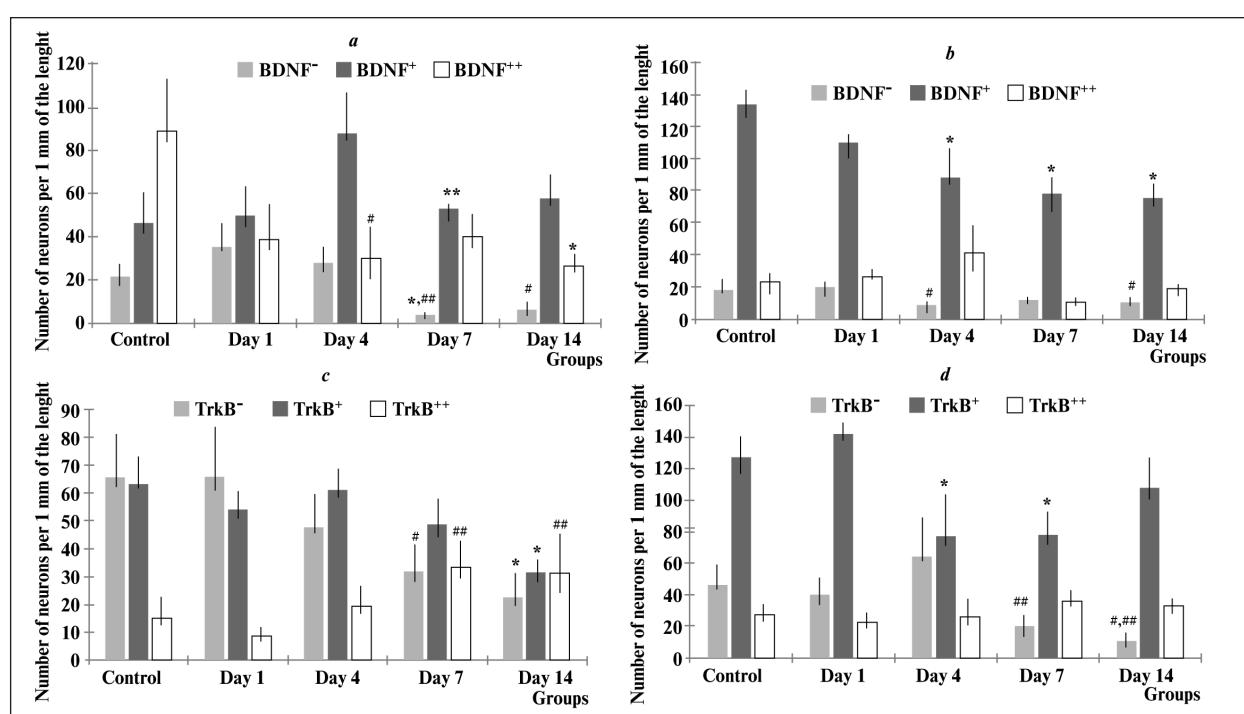


Рис. 3. Изменение числа нейронов с разным уровнем экспрессии BDNF (a, b) и TrkB (c, d) в популяции пирамидных нейронов поля CA4 и CA1 гиппокампа в постреанимационном периоде, $M \pm m$.

Fig. 3. Changes in the number of neurons with different levels of BDNF (a, b) and TrkB (c, d) protein expression in the population of pyramidal neurons of the CA4 and CA1 hippocampal fields in the post-resuscitation period, $M \pm m$.

Note. a, b – the data for the CA4 field; c, d – the data for the CA1 field.

Примечание. a, b – данные для поля CA4; c, d – данные для поля CA1.

в поле CA1 снижение общей плотности нейрональной популяции происходило именно на 4-е сутки постреанимационного периода, можно говорить о гибели пирамидных клеток со слабой и умеренной BDNF-имmunoreактивностью. На 7-е и 14-е сутки выявленные изменения сохранялись (рис. 3, б).

Анализ содержания белка TrkB показал, что у контрольных животных в обоих исследованных полях гиппокампа преобладают нейроны со слабой и умеренной иммунореактивностью (рис. 3, с, д).

В поле CA4 в постреанимационном периоде происходило уменьшение числа TrkB⁻-клеток на 7-е сутки. При этом число TrkB⁺- и TrkB⁺⁺-нейронов не изменилось по сравнению с контролем. К 14-м суткам было снижено число не только TrkB⁻-нейронов, но и TrkB⁺-клеток при сохранении числа TrkB⁺⁺-нейронов (рис. 3, с). Очевидно, что гибнут клетки, характеризующиеся слабой и умеренной иммунореактивностью к TrkB.

В поле CA1 у реанимированных крыс наблюдали уменьшение числа TrkB⁺-клеток на 4-е сутки после реанимации по сравнению с группой контрольных животных. При этом не выявлено достоверных отличий от контроля по числу TrkB⁻- и TrkB⁺⁺-нейронов. Полученные данные свидетельствуют о гибели нейронов с умеренной иммунореактивностью к TrkB. На 7-е сутки после реанимации было выявлено снижение числа не только TrkB⁺-клеток, но и TrkB⁻-нейронов. На 14-е сутки

There was a decrease in the number of both BDNF⁻ neurons and BDNF⁺ neurons in the CA1 field of the hippocampus on the 4th day after resuscitation compared to the reference level, while the number of BDNF⁺⁺ cells remained the same. Since the total density of the neuronal population in the CA1 field decreased on the 4th day of the post-resuscitation period, we can conclude on the death of pyramidal cells with mild and moderate expression of BDNF protein. The changes persisted on the 7th and 14th days (fig. 3, б).

Analysis of the TrkB protein content showed that neurons with mild and moderate immunoreactivity prevail in the reference group animals in both studied hippocampal fields (fig. 3 с, д).

There was a decrease in the number of TrkB⁻ cells in the CA4 field on the 7th day of the post-resuscitation period. At that, the number of TrkB⁺ and TrkB⁺⁺ neurons did not change in comparison with the reference group. By the 14th day, the number of not only TrkB⁻ neurons, but also TrkB⁺ cells was reduced, while the number of TrkB⁺⁺ neurons remained unchanged (fig. 3, с). It is obvious that cells with mild and moderate immunoreactivity to TrkB die.

In the CA1 field, the number of TrkB⁺ cells decreased on the 4th day after resuscitation in the resuscitated rats compared to the reference group animals. There were no significant differences from the reference group in the number of TrkB⁻ and TrkB⁺⁺ neurons. The obtained data indicate the death of neurons

число TrkB⁺-нейронов оставалось сниженным. Число нейронов с сильной иммунореактивностью к TrkB сохранялось на контролльном уровне в течение всего исследованного периода (рис. 3, d). Очевидно, что, также как и в CA4, в поле CA1 гиппокампа гибели подвергаются только нейроны со слабой и умеренной иммунореактивностью к TrkB.

Таким образом, уменьшение общей плотности популяций пирамидных нейронов гиппокампа в исследованном постреанимационном периоде (в течение 14-ти суток) происходило за счет клеток с низким и умеренным содержанием как белка TrkB, так и BDNF.

Согласно полученным результатам, в нейрональных популяциях гиппокампа происходило снижение иммунореактивности к белкам BDNF и TrkB на 4–7 сутки после остановки сердца, что, возможно, связано с уменьшением уровня их экспрессии в постишемическом периоде. Это предположение подтверждается рядом исследований. Так, уменьшение экспрессии BDNF и его рецептора TrkB выявлено в поле CA1 гиппокампа через 4 часа – 1 сутки после изолированной ишемии мозга у песчанок [12], а также в коре мозга и гиппокампе через 1 день после окклюзии средней мозговой артерии у мышей [13]. В экспериментах *in vitro* было показано, что гипоксия–гипогликемия вызывает снижение экспрессии BDNF и TrkB в гиппокампальных нейронах [14]. С помощью методов ПЦР-анализа и ELISA было показано, что после временной окклюзии средней мозговой артерии у крыс происходит снижение содержания BDNF мРНК и белка в области CA1 гиппокампа, что сопровождается нейрональной дегенерацией [9]. На модели глобальной ишемии головного мозга наблюдали аналогичные изменения в гиппокампе [15]. Несколько иные данные были получены в исследовании Ferrer et al., 1998 [16]. Так, 5 мин ишемия мозга у песчанок приводила к снижению числа BDNF-иммунореактивных нейронов в области CA1, однако TrkB-иммунореактивные клетки выживали. При этом авторы отмечали, что 95% выживших нейронов, экспрессирующих BDNF, вырабатывали также и TrkB [16].

Существенное значение TrkB для нейропротекции подтверждено на модели ишемического инсульта *in vitro* [11]. Так, на переживающих срезах гиппокампа было показано, что кислородная глюкозная депривация повышает уровень фосфорилирования TrkB в поле CA3, но не в более чувствительной области CA1, где ишемия приводила к угнетению электрической активности нейронов [11]. Предполагается, что активация TrkB представляет эндогенный механизм, отвечающий за устойчивость нейронов к ишемическому повреждению. В эксперименте Huang W. et al., 2017 было показано, что экзогенный BDNF значительно усиливает экспрессию TrkB, что приводило к повышению выживаемости нейронов, а также к снижению уровня

with moderate immunoreactivity to TrkB. On the 7th day after resuscitation, a decrease in the number of not only TrkB⁺ cells, but also TrkB⁻ neurons was found. On the 14th day, the number of TrkB⁻ neurons remained reduced. The number of neurons with strong immunoreactivity to TrkB remained at the reference level throughout the study period (fig. 3, d). As with CA4 field, data show that only neurons with mild and moderate expression of TrkB protein die in the CA1 field of the hippocampus.

Therefore, the decrease in the total density of hippocampal pyramidal neurons in the post-resuscitation period (within 14 days) was due to cells with low and moderate content of both TrkB and BDNF protein.

According to the obtained results, there was a decrease in expression of both BDNF and TrkB proteins in the neuronal populations of the hippocampus 4–7 days after the cardiac arrest, which was probably related to the decrease in their expression level in the post-ischemic period. This assumption is confirmed by a number of studies. For instance, a decrease in the expression of BDNF and its TrkB receptor was found in the CA1 field of the hippocampus 4 hours to 1 day after isolated cerebral ischemia in gerbils [12], as well as in the cerebral cortex and hippocampus 1 day after occlusion of the middle cerebral artery in mice [13]. *In vitro* experiments demonstrated that hypoxia-hypoglycemia caused a decrease in the BDNF and TrkB expression in hippocampal neurons [14]. By means of PCR-analysis and ELISA techniques it was shown that there was a decrease in the content of BDNF mRNA and protein in the CA1 hippocampal field after temporary occlusion of the middle cerebral artery in rats, which was accompanied by neuronal degeneration [9]. Similar changes in the hippocampus were observed on the model of global cerebral ischemia [15]. Slightly different data were obtained in a study by Ferrer et al., 1998 [16]. For instance, a 5-minute brain ischemia in gerbils led to a decrease in the number of BDNF-immunoreactive neurons in the CA1 field, but TrkB-immunoreactive cells survived. At that, the authors noted that 95% of surviving neurons expressing BDNF also produced TrkB [16].

The significant value of TrkB for neuroprotection was confirmed on the *in vitro* model of ischemic stroke [11]. For instance, it was shown on survivors' sections of the hippocampus that oxygen glucose deprivation increases the level of TrkB phosphorylation in the CA3 field, but not in the more sensitive area of CA1, where ischemia led to inhibition of neuronal electrical activity [11]. It is assumed that the TrkB activation is an endogenous mechanism responsible for the resistance of neurons to ischemic damage. In the experiment carried out by Huang W. et al., 2017, it was shown that exogenous BDNF significantly increased TrkB expression, leading to increased neuronal survival as well as decreased apoptosis. At that, the TrkB inhibition weakened the neuroprotective effect of BDNF [14].

апоптоза. При этом ингибирование TrkB ослабляло нейропротективное действие BDNF [14].

Мы обнаружили, что в норме только небольшая часть пирамидных нейронов гиппокампа крыс характеризовалась сильной иммунореактивностью к белку TrkB. Это наблюдение было характерно как для поля CA1, так и для CA4. В отношении содержания BDNF выявили некоторые отличия между этими областями. Так, если в поле CA1 у контрольных животных число нейронов с высоким содержанием BDNF ($BDNF^{++}$) было относительно невелико, то в поле CA4 таких клеток — значительно больше, чем нейронов с низким и умеренным содержанием BDNF ($BDNF^-$ и $BDNF^+$). В исследованиях на песчанках было также обнаружено незначительное содержание TrkB-иммунореактивных нейронов в поле CA1 в норме, однако большинство клеток экспрессировало BDNF [16]. Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что в процесс постстреанимационной гибели нейронов в поле CA1 развивается несколько раньше, чем в поле CA4. Возможно, это связано с разницей в начальном уровне экспрессии BDNF.

Во многих исследованиях было показано, что BDNF является потенциальным терапевтическим агентом для борьбы с ишемическим повреждением головного мозга [1, 3, 4]. Одно из наиболее перспективных направлений при разработке методов защиты мозга — активация эндогенных нейротрофических факторов и их рецепторов [2]. В настоящее время предложены самые разные способы стимуляции эндогенной выработки BDNF [4, 9, 12]. Например, в работе Mokhtary 2017 показано, что внутрижелудочковая инъекция трийодтиронина через 24 часа после ишемии мозга приводит к повышению содержания BDNF в гиппокампе [9]. Получены положительные результаты в экспериментальных работах по исследованию нейропротективного действия миметиков BDNF синтетического и растительного происхождения, агонистов TrkB рецептора [7, 17–19]. В качестве способов повышения уровня содержания BDNF рассматривают физические упражнения [4, 20], а также методы неинвазивной стимуляции головного мозга переменными токами [21].

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что устойчивость нейронов к ишемии-реперфузии ассоциирована с содержанием в них белков BDNF и TrkB. Наименьшей устойчивостью к гибели в течение 14 дней после остановки сердца обладали нейроны с минимальным и умеренным содержанием исследуемых белков. При этом лучшую выживаемость продемонстрировали нейроны с наибольшим содержанием BDNF и TrkB. Выявленные факты раскрывают перспективность исследо-

We found that normally only a small number of the pyramidal neurons in rat's hippocampus highly express the TrkB protein. This observation was typical for both CA1 and CA4 fields. Some differences between these areas were found in the BDNF content. For instance, while the number of neurons with a high BDNF content ($BDNF^{++}$) was relatively small in the CA1 field of the reference group animals, the number of such cells in the CA4 field was much higher than that of neurons with a low and moderate BDNF content ($BDNF^-$ and $BDNF^+$). In gerbil studies, a small content of TrkB immunoreactive neurons in the CA1 field was also found under normal conditions, but most cells expressed BDNF [16]. Data obtained in this study show that the process the post-resuscitation neuronal death in field CA1 develops a little bit earlier than in field CA4. It may be due to the difference in the baseline level of BDNF expression.

Many studies have shown that BDNF is a potential therapeutic agent for managing the ischemic brain damage [1, 3, 4]. Activation of endogenous neurotrophic factors and their receptors is one of the most promising areas in the development of brain protection techniques [2]. At present, a variety of ways to stimulate endogenous BDNF production are proposed [4, 9, 12]. For example, Mokhtary (2017) showed that intraventricular injection of triiodothyronine 24 hours after brain ischemia led to an increase in the BDNF content in the hippocampus [9]. Positive results were obtained in experimental studies of neuroprotective action of synthetic and herbal BDNF mimetics and TrkB receptor agonists [7, 17–19]. Physical exercises [4, 20], as well as methods of non-invasive stimulation of the brain by alternating currents are also considered as ways to increase the BDNF level [21].

Conclusion

The obtained results indicate that the resistance of neurons to ischemia-reperfusion is associated with the expression of BDNF and TrkB proteins. Neurons with minimal and moderate content of the studied proteins had the least resistance to death within 14 days after cardiac arrest. At the same time, neurons with the highest expression of BDNF and TrkB demonstrated the best survival rate. These facts demonstrate that studies of various ways to increase the BDNF expression and the activation of its TrkB receptor in neurons for its protection against ischemic damage are promising.

ваний различных способов повышения экспрессии BDNF и активации его рецептора TrkB в нервных клетках головного для его защиты ишемического повреждения.

Литература

- Larpilaveesarp A., Ferriero D.M., Gonzalez F.F. Growth factors for the treatment of ischemic brain injury (growth factor treatment). *Brain Sci.* 2015; 5 (2): 165–177. DOI: 10.3390/brainsci5020165. PMID: 25942688
- Zhao H., Alam A., San C.Y., Eguchi S., Chen Q., Lian Q., Ma D. Molecular mechanisms of brain-derived neurotrophic factor in neuro-protection: recent developments. *Brain Res.* 2017; 1665: 1–21. DOI: 10.1016/j.brainres.2017.03.029. PMID: 28396009
- Chen A., Xiong L.J., Tong Y., Mao M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomed. Rep.* 2013; 1 (2): 167–176. DOI: 10.3892/br.2012.48. PMID: 24648914
- Berretta A., Tzeng Y.C., Clarkson A.N. Post-stroke recovery: the role of activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor. *Expert. Rev. Neurother.* 2014; 14 (11): 1335–1344. DOI: 10.1586/14737175.2014.969242. PMID: 25319267
- Дмитриева В.Г., Ставчанский В.В., Поварова О.В., Скворцова В.И., Лимбурская С.А., Дергунова Л.В. Влияние ишемии на экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов в структурах мозга крыс вне очага повреждения, включая противоположное полушарие. *Молекулярная биология.* 2016; 50 (5): 775–784. DOI: 10.7868/S002689841603006X. PMID: 27830679
- Kimura A., Namekata K., Guo X., Harada C., Harada T. Neuroprotection, growth factors and BDNF-TrkB signaling in retinal degeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17 (9): pii: E1584. PMID: 27657046. DOI: 10.3390/ijms17091584. PMID: 27657046
- Wu C.H., Hung T.H., Chen C.C., Ke C.H., Lee C.Y., Wang P.Y., Chen S.F. Post-injury treatment with 7,8-dihydroxyflavone, a TrkB receptor agonist, protects against experimental traumatic brain injury via PI3K/Akt signaling. *PLoS One.* 2014; 9 (11): e113397. DOI: 10.1371/journal.pone.0113397. PMID: 25415296
- Vilar M., Mira H. Regulation of neurogenesis by neurotrophins during adulthood: expected and unexpected roles. *Front Neurosci.* 2016; 10: 26. DOI: 10.3389/fnins.2016.00026. PMID: 26903794
- Mokhtari T., Akbari M., Malek F., Kashani I.R., Rastegar T., Noorbakhsh F., Ghazi-Khansari M., Attari F., Hassanzadeh G. Improvement of memory and learning by intracerebroventricular microinjection of T3 in rat model of ischemic brain stroke mediated by upregulation of BDNF and GDNF in CA1 hippocampal region. *Daru.* 2017; 25 (1): 4. DOI: 10.1186/s40199-017-0169-x. PMID: 28202057
- Корпачев В.Г., Лысенков С.П., Тель Л.Д. Моделирование клинической смерти и постстреанимационной болезни у крыс. *Патол. физиол. и эксперим. терапия.* 1982; 26 (3): 78–80. PMID: 7122145
- Tecuati C., Herrera-López G., Martín-Ávila A., Yin B., Weber S., Barrionuevo G., Galván E.J. TrkB-mediated activation of the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt cascade reduces the damage inflicted by oxygen-glucose deprivation in area CA3 of the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 2018; 47 (9): 1096–1109. DOI: 10.1111/ejn.13880. PMID: 29480936
- 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, brain-derived neurotrophic factor and their high-affinity receptors in hippocampus following forebrain ischemia. *Brain Res.* 2008; 1187: 1–11. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.09.078. PMID: 18036511
- 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. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.25.008. PMID: 25206547
- Huang W., Meng F., Cao J., Liu X., Zhang J., Li M. Neuroprotective role of exogenous brain-derived neurotrophic factor in hypoxia-hypoglycemia-induced hippocampal neuron injury via regulating Trkb/Mir134 signaling. *J. Mol. Neurosci.* 2017; 62 (1): 35–42. DOI: 10.1007/s12031-017-0907-z. PMID: 28343294
- de la Tremblaye P.B., Benoit S.M., Schock S., Plamondon H. CRHR1 exacerbates the glial inflammatory response and alters BDNF/TrkB/pCREB signaling in a rat model of global cerebral ischemia: implications for neuroprotection and cognitive recovery. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2017; 79 (Pt B): 234–248. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2017.06.021. PMID: 28647536
- Ferrer I., López E., Pozas E., Ballabriga J., Martí E. Multiple neurotrophic signals converge in surviving CA1 neurons of the gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *J. Comp. Neurol.* 1998; 394 (4): 416–430. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9861(19980518)394:4<416::AID-CNE2>3.0.CO;2-4. PMID: 9590552
- Liu C., Chan C.B., Ye K. 7,8-dihydroxyflavone, a small molecular TrkB agonist, is useful for treating various BDNF-implicated human disorders. *Transl. Neurodegener.* 2016; 5: 2. DOI: 10.1186/s40035-015-0048-7. PMID: 26740873
- Povarnina P., Gudasheva T.A., Seredenin S.B. Dimeric dipeptide mimetics of NGF and BDNF are promising agents for post-stroke therapy. *JBSE.* 2018; 11 (5): 100–107. DOI: 10.4236/jbise.2018.115009
- Sangiovanni E., Brivio P., Dell'Agli M., Calabrese F. Botanicals as modulators of neuroplasticity: focus on BDNF. *Neural. Plast.* 2017; 2017: 5965371. DOI: 10.1155/2017/5965371. PMID: 29464125

References

- Larpilaveesarp A., Ferriero D.M., Gonzalez F.F. Growth factors for the treatment of ischemic brain injury (growth factor treatment). *Brain Sci.* 2015; 5 (2): 165–177. DOI: 10.3390/brainsci5020165. PMID: 25942688
- Zhao H., Alam A., San C.Y., Eguchi S., Chen Q., Lian Q., Ma D. Molecular mechanisms of brain-derived neurotrophic factor in neuro-protection: recent developments. *Brain Res.* 2017; 1665: 1–21. DOI: 10.1016/j.brainres.2017.03.029. PMID: 28396009
- Chen A., Xiong L.J., Tong Y., Mao M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomed. Rep.* 2013; 1 (2): 167–176. DOI: 10.3892/br.2012.48. PMID: 24648914
- Berretta A., Tzeng Y.C., Clarkson A.N. Post-stroke recovery: the role of activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor. *Expert. Rev. Neurother.* 2014; 14 (11): 1335–1344. DOI: 10.1586/14737175.2014.969242. PMID: 25319267
- Dmitrieva V.G., Stavchansky V.V., Rosanova O.V., Skvortsova V.I., Limborska S.A., Dergunova L.V. Effects of ischemia on the expression of neurotrophins and their receptors in rat brain structures outside the lesion site, including on the opposite hemisphere. *Mol. Biol. (Mosk.).* 2016; 50 (5): 775–784. DOI: 10.7868/S002689841603006X. PMID: 27830679. [In Russ.]
- Kimura A., Namekata K., Guo X., Harada C., Harada T. Neuroprotection, growth factors and BDNF-TrkB signaling in retinal degeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17 (9): pii: E1584. PMID: 27657046. DOI: 10.3390/ijms17091584. PMID: 27657046
- Wu C.H., Hung T.H., Chen C.C., Ke C.H., Lee C.Y., Wang P.Y., Chen S.F. Post-injury treatment with 7,8-dihydroxyflavone, a TrkB receptor agonist, protects against experimental traumatic brain injury via PI3K/Akt signaling. *PLoS One.* 2014; 9 (11): e113397. DOI: 10.1371/journal.pone.0113397. PMID: 25415296
- Vilar M., Mira H. Regulation of neurogenesis by neurotrophins during adulthood: expected and unexpected roles. *Front Neurosci.* 2016; 10: 26. DOI: 10.3389/fnins.2016.00026. PMID: 26903794
- Mokhtari T., Akbari M., Malek F., Kashani I.R., Rastegar T., Noorbakhsh F., Ghazi-Khansari M., Attari F., Hassanzadeh G. Improvement of memory and learning by intracerebroventricular microinjection of T3 in rat model of ischemic brain stroke mediated by upregulation of BDNF and GDNF in CA1 hippocampal region. *Daru.* 2017; 25 (1): 4. DOI: 10.1186/s40199-017-0169-x. PMID: 28202057
- Korpachev V.G., Lysenkov S.P., Tel L.Z. Modeling clinical death and postresuscitation disease in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Ekspериментальная Terapiya.* 1982; 26 (3): 78–80. PMID: 7122145. [In Russ.]
- Tecuati C., Herrera-López G., Martín-Ávila A., Yin B., Weber S., Barrionuevo G., Galván E.J. TrkB-mediated activation of the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt cascade reduces the damage inflicted by oxygen-glucose deprivation in area CA3 of the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 2018; 47 (9): 1096–1109. DOI: 10.1111/ejn.13880. PMID: 29480936
- 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, brain-derived neurotrophic factor and their high-affinity receptors in hippocampus following forebrain ischemia. *Brain Res.* 2008; 1187: 1–11. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.09.078. PMID: 18036511
- 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. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.25.008. PMID: 25206547
- Huang W., Meng F., Cao J., Liu X., Zhang J., Li M. Neuroprotective role of exogenous brain-derived neurotrophic factor in hypoxia-hypoglycemia-induced hippocampal neuron injury via regulating Trkb/Mir134 signaling. *J. Mol. Neurosci.* 2017; 62 (1): 35–42. DOI: 10.1007/s12031-017-0907-z. PMID: 28343294
- de la Tremblaye P.B., Benoit S.M., Schock S., Plamondon H. CRHR1 exacerbates the glial inflammatory response and alters BDNF/TrkB/pCREB signaling in a rat model of global cerebral ischemia: implications for neuroprotection and cognitive recovery. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2017; 79 (Pt B): 234–248. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2017.06.021. PMID: 28647536
- Ferrer I., López E., Pozas E., Ballabriga J., Martí E. Multiple neurotrophic signals converge in surviving CA1 neurons of the gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *J. Comp. Neurol.* 1998; 394 (4): 416–430. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9861(19980518)394:4<416::AID-CNE2>3.0.CO;2-4. PMID: 9590552
- Liu C., Chan C.B., Ye K. 7,8-dihydroxyflavone, a small molecular TrkB agonist, is useful for treating various BDNF-implicated human disorders. *Transl. Neurodegener.* 2016; 5: 2. DOI: 10.1186/s40035-015-0048-7. PMID: 26740873
- Povarnina P., Gudasheva T.A., Seredenin S.B. Dimeric dipeptide mimetics of NGF and BDNF are promising agents for post-stroke therapy. *JBSE.* 2018; 11 (5): 100–107. DOI: 10.4236/jbise.2018.115009
- Sangiovanni E., Brivio P., Dell'Agli M., Calabrese F. Botanicals as modulators of neuroplasticity: focus on BDNF. *Neural. Plast.* 2017; 2017: 5965371. DOI: 10.1155/2017/5965371. PMID: 29464125

20. Fahimi A., Baktir M.A., Moghadam S., Mojabi F.S., Sumanth K., McNerney M.W., Ponnusamy R., Salehi A. Physical exercise induces structural alterations in the hippocampal astrocytes: exploring the role of BDNF-TrkB signaling. *Brain Struct. Funct.* 2017; 222 (4): 1797–1808. DOI: 10.1007/s00429-016-1308-8. PMID: 27686571
21. Luo J., Zheng H., Zhang L., Zhang Q., Li L., Pei Zh., Hu X. High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) improves functional recovery by enhancing neurogenesis and activating BDNF/TrkB signaling in ischemic rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18 (2): pii: E455. DOI: 10.3390/ijms18020455. PMID: 28230741

Поступила 28.09.18

20. Fahimi A., Baktir M.A., Moghadam S., Mojabi F.S., Sumanth K., McNerney M.W., Ponnusamy R., Salehi A. Physical exercise induces structural alterations in the hippocampal astrocytes: exploring the role of BDNF-TrkB signaling. *Brain Struct. Funct.* 2017; 222 (4): 1797–1808. DOI: 10.1007/s00429-016-1308-8. PMID: 27686571
21. Luo J., Zheng H., Zhang L., Zhang Q., Li L., Pei Zh., Hu X. High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) improves functional recovery by enhancing neurogenesis and activating BDNF/TrkB signaling in ischemic rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18 (2): pii: E455. DOI: 10.3390/ijms18020455. PMID: 28230741

Received 28.09.18

МЕЖДУНАРОДНЫЙ КАЛЕНДАРЬ КОНФЕРЕНЦИЙ АНЕСТЕЗИОЛОГОВ-РЕАНИМАТОЛОГОВ 2019

20–25 января

The 37th Annual International Symposium:
Clinical Update in Anesthesiology, Surgery and Perioperative Medicine
Oranjestad, Aruba • icahn.mssm.edu

Март

XX Выездная Сессия Московского Научного Общества Анестезиологов-Реаниматологов (МНОАР)
Голицыно, Московская обл. • tnoar.med.ru

19–22 марта39th ISICEM

Международный симпозиум по интенсивной терапии и экстренной помощи
Брюссель, Бельгия • intensive.org

14–16 апреля

ESICM: 3rd EuroAsia Conference
Тайпей • esicm.org

14–16 апреля

ESICM Live: 32nd Annual Congress
Берлин, Германия • esicm.org

13–17 мая

Anesthesiology Update 2019
Бостон, США • anesthesiology.hmscme.com

Уважаемые Авторы журнала «Общая реаниматология»!

Обращаем ваше внимание на обновление Правил для авторов.

Обновленные Правила для авторов в редакции 25 сентября 2018 г. содержат разъяснения по оформлению аффилиации авторов, рисунков и таблиц; дополнения в разделах «правовые и этические аспекты публикации рукописи», «отправка материалов для публикации», «структурные разделы статей и рекомендации по их описанию», «библиография».

Обновленные Правила для авторов размещены на сайте журнала: www.reanimatology.com