

ANDRZEJ BACIA, WOJCIECH JEGLIŃSKI I BARBARA ODERFELD-NOWAK

Zakład Neurofizjologii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Warszawa

ROLA CZYNNIKA WZROSTU NERWÓW W MÓZGU

WSTĘP

Czynnik wzrostu nerwów (nerve growth factor — NGF) został odkryty w 1951 roku przez Ritę Levi-Montalcini. Było to jedno z największych odkryć współczesnej neurobiologii, udowodniło ono bowiem, iż w rozwoju neuronów a także w podtrzymaniu ich dalszego funkcjonowania uczestniczy czynnik dyfuzyjny o działaniu troficznym. Doniosłość tego odkrycia, które zaowocowało szeregiem kolejnych odkryć z dziedziny czynników neurotroficznych, została w pełni oceniona dopiero w wiele lat później i w roku 1986 ukoronowano je Nagrodą Nobla.

Pierwsze prace Rity Levi-Montalcini i następnych badaczy o NGF dotyczyły głównie roli tego czynnika w obwodowym układzie nerwowym. Stwierdzono, iż NGF działa swoiście na neurony tego układu, zapobiegając śmierci komórek współczulnych i czuciowych, zarówno naturalnie występującej w trakcie rozwoju, jak i wywołanej doświadczalnie. Nie będziemy tu szczegółowo omawiać tych fascynujących prac, polecając czytelnikowi zapoznanie się z ostatnimi niezwykle interesującymi artykułami przeglądowymi Rity Levi-Montalcini, z których jeden (Levi-Montalcini 1982) opisuje „historię naturalną NGF”, o której sama autorka pisze, że „...przypomina bardziej historię detektywistyczną aniżeli historię badania naukowego”. Drugi artykuł (Levi-Montalcini 1987), zatytułowany „NGF — 35 lat później” opublikowany został wkrótce po przyznaniu Nagrody Nobla.

Do wczesnych lat osiemdziesiątych nie podejrzewano nawet istnienia NGF w ośrodkowym układzie nerwowym. Stwierdzenie jego obecności i poznanie roli w mózgu — to owoc badań przeprowadzonych między innymi przez Crutchera, Collinsa, Thoenena, Whittemora, Heftiego i ich współpracowników

*Praca wykonana w ramach grantu Komitetu Badań Naukowych nr PB 0526/P2/93/04

¹Skróty: ACh — acetylcholina, ChAT — transferaza acetylcholiny, NGF — czynnik wzrostu nerwów, NGF-R — receptor czynnika wzrostu nerwów, NGF mRNA — messenger RNA czynnika wzrostu nerwów

(Thoenen i in. 1987, Whittemore i Seiger 1987, Lapchak 1992, Vantini i Skaper 1992).

Z wielu badań *in vitro* i *in vivo* wynika, że NGF ma istotne znaczenie tak w rozwoju komórek cholinergicznym mózgu, jak i w ciągu ich dalszego życia, a szczególnie dla ich przeżywalności po uszkodzeniach mózgu. Fakt, że NGF podtrzymuje funkcje neuronów cholinergicznym, w powiązaniu ze zjawiskiem zaniku tych neuronów spotykanym u pacjentów z chorobą Alzheimer, spowodował szczególne zainteresowanie badaniami nad NGF w nadziei na nowy skuteczny lek w tej dewastującej chorobie (Hefti i Weiner 1986, Tuszyński i Gage 1990, Lapchak 1992).

Badania ostatnich dwu lat przyniosły nowe atrakcyjne dane na temat prawdopodobnej ochronnej roli NGF w stosunku do neuronów niecholinergicznym hipokampa podlegających zmianom zwyrodnieniowym po okresowym niedotlenieniu (ischemii), z czym również zaczyna się wiązać zrozumiałe nadzieje na terapię (Shigeno i in. 1991, Yamamoto i in. 1992).

Inne prace zaowocowały odkryciem w mózgu szeregu nowych czynników neurotroficznym, których prototypem jest NGF. Wszystkie z nich wykazują znaczną homologię z NGF i tworzą wraz z nim rodzinę tak zwanych neurotrofin (Vantini i Skaper 1992). Obecne prace idą w kierunku wyjaśnienia roli tych czynników oraz poznania ich łącznego wpływu na neurony mózgu posiadające swoiste receptory dla tych czynników.

W niniejszym artykule ograniczymy się do przedstawienia niektórych ze wspomnianym aspektów badań nad rolą NGF w mózgu na różnych modelach eksperymentalnym. Omówimy także niektóre aspekty badań związanych z możliwą rolą NGF w schorzeniach neurodegeneracyjnym takich, jak choroba Alzheimer i wynikających z tego implikacji terapeutycznym.

BIOCHEMICZNE WŁASNOŚCI NGF I JEGO RECEPTORA

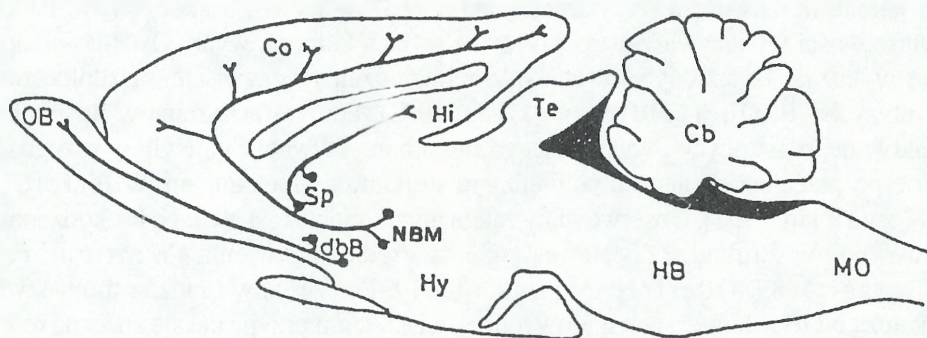
NGF został wyizolowany jako białko 130 kD (7S NGF) o budowie podjednostkowej: α , β , γ (stechiometrycznie: 2 jednostki α , 1 β , 2 γ) lub jako 26,5 kD podjednostka (β -NGF, 2,5 S NGF) składająca się z dwóch identycznych łańcuchów polipeptydowym połączonych wiązaniem dwusiarczkowym. Aktywność biologiczną wykazuje podjednostka β -NGF. Sekwencja nukleotydowa DNA kodującego podjednostkę β -NGF u różnych gatunków wykazuje wysoki stopień homologii świadcząc o dużym konserwatyzmie ewolucyjnym tego białka. Głównym źródłem naturalnym, z którego izoluje się i oczyszcza NGF, są podżuchwowe ślinianki samców myszy. Obecnie dzięki zdobyczom inżynierii genetycznej źródłem NGF mogą być komórki hodowane *in vitro*.

Receptor NGF o wysokim powinowactwie składa się z dwóch białek: transbłonowej glikoproteiny, która stanowi receptor o niskim powinowactwie do NGF

(p75) i transbłonowego białka o aktywności kinazy tyrozynowej — produktu protoonkogenu *trk* (p140).

ROZMIESZCZENIE, LOKALIZACJA I ROLA SYSTEMU ENDOGENNEGO NGF W MÓZGU

System endogennego NGF obejmuje białko NGF, mRNA NGF i receptor NGF. Najwięcej NGF i mRNA kodującego NGF znajduje się w strukturach docelowych włókien cholinergiczných pochodzących z wielkokomórkowych neuronów cholinergiczných podstawnego przodomózgowia (rys. 1) a zatem w hipokampie,



Rys. 1. Schemat dróg cholinergiczných wychodzących z jąder podstawných mózgu szczura.

Oznaczenia: NBM — nucleus basalis magnocellularis, jądro podstawne wielkokomórkowe; Cb — cerebellum, mózdzek; Co — cortex, kora; dbB — nucleus tractus diagonalis (Broca), jądro pasma przekątnego; HB — hindbrain, rhombencephalon, tyłomózgowie; Hi — hippocampus, hipokamp; Hy — hypothalamus, podwzgórze; MO — medulla oblongata, rdzeń przedłużony; OB — bulbus olfactorius, opuszka węchowa; Sp — septum, przegroda; Te — tectum, pokrywa.

nowej korze oraz opuszcze węchowej. NGF jest również obecny, lecz w mniejszych stężeniach, w rejonach mózgu zawierających ciała komórkowe tych neuronów, to jest w przegrodzie, jądrze pasma przekątnego oraz wielkokomórkowym jądrze podstawnym (NBM). Jeszcze mniej NGF występuje w rejonach zawierających inne typy neuronów cholinergiczných, jak prążkowie czy podwzgórze, a najmniej w rejonach nie zawierających neuronów cholinergiczných, takich jak mózdzek czy nakrywa (Thoenen i in. 1987, Whittemore i Seiger 1987). Ta lokalizacja endogennego NGF w mózgu stanowi jeden z argumentów za tym, iż NGF jest czynnikiem troficznym dla układu cholinergicznego, zwłaszcza wielkokomórkowego.

Na ogół istnieje dobra korelacja pomiędzy obecnością i rozmieszczeniem białka NGF i mRNA NGF w rejonach mózgu unerwianych przez włókna cholinergiczne. Natomiast fakt, iż mRNA NGF jest praktycznie niewykrywalny w obszarach skupisk ciał neuronów cholinergiczných stanowi argument za tym, iż w normalnym mózgu NGF jest syntetyzowany w strukturach docelowych i prze-

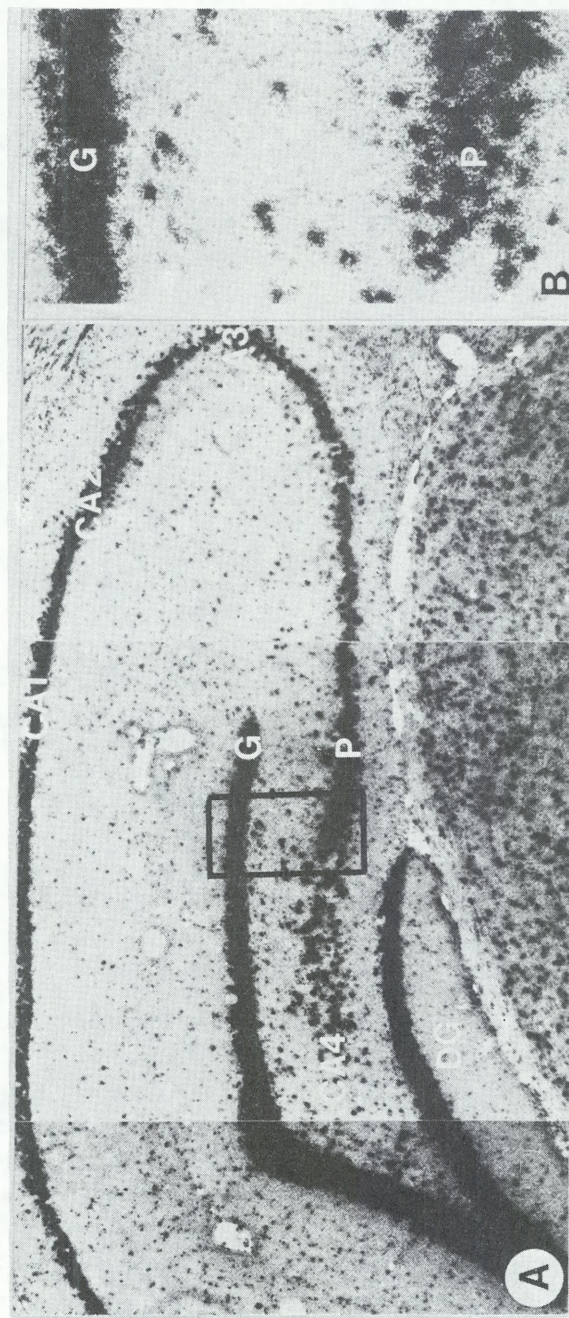
noszony wstecznym transportem do ciał komórkowych (co zostało wykazane za pomocą różnych technik).

Do niedawna sądzono, że jedynym źródłem endogennego NGF dla cholinergiczných jąder podstawnych przodomózgowia jest dopływ wsteczny ze struktur unerwianych przez te jądra, a synteza odbywa się tylko w neuronach (porównaj dyskusję w pracy Bacia i in. 1992). Fotografia 1 przedstawia typowy obraz lokalizacji mRNA NGF w warstwie komórek piramidalnych i ziarnistych hipokampa uzyskany metodą hybrydyzacji *in situ* (Whittemore i in. 1988). Identyfikacyjny wzorzec rozmieszczenia białka NGF uzyskano ostatnio stosując metody immunocytochemiczne (Bacia i in. 1992). Szereg danych pośrednich sugerowało jednak możliwość astrocytarnej syntezy NGF w mózgu uszkodzonym; takie właściwości wykazywały astrocyty w hodowlach komórkowych. Ostatnio udało się wykazać, iż astrocyty w uszkodzonym mózgu rzeczywiście są zdolne do syntezy NGF (Oderfeld-Nowak i in. 1992). Fotografia 2 stanowi ilustrację „aktywnego astrocyta” wykazującego immunoreaktywność na NGF w przegrodzie po przecięciu połączeń pomiędzy tą strukturą a hipokampem (Oderfeld-Nowak i in. 1992). Obserwowany zatem uprzednio wzrost NGF po uszkodzeniu zarówno w strukturze docelowej jak i w źródle unerwienia (Whittemore i Seiger 1987, Oderfeld-Nowak i in. 1992), częściowo można tłumaczyć syntezą NGF w komórkach glejowych; zjawisku temu przypisuje się znaczną rolę w procesach reparacyjnych po różnych uszkodzeniach mózgu (Shigeno i in. 1991, Oderfeld-Nowak i in. 1992).

Badania immunocytochemiczne pozwoliły na zidentyfikowanie białka receptora NGF o niskim powinowactwie. Największe jego skupiska znajdujemy w rejonach ciał neuronów cholinergiczných, w szczególności systemu neuronów wielkokomórkowych, a zatem w jądrze wielkokomórkowym podstawnym i w przegrodzie; skupiska receptorów NGF znajdujemy też w prążkowie i podwzgórzu (Vantini i Skaper 1992). Dane te przemawiają za rolą endogennego NGF w stosunku do neuronów cholinergiczných. Ostatnie doniesienia podają, iż receptor NGF o niskim powinowactwie obecny jest także na niecholinergiczných neuronach hipokampa (Lapchak 1992, Shigeno i in. 1991).

Warto tu wspomnieć jeszcze o ważnych wynikach świadczących o troficzných roli NGF w stosunku do wielkokomórkowych neuronów cholinergiczných. Wykazano mianowicie, iż podanie przeciwciał przeciw NGF wpływa destrukcyjnie na te neurony (Vantini i Skaper 1992).

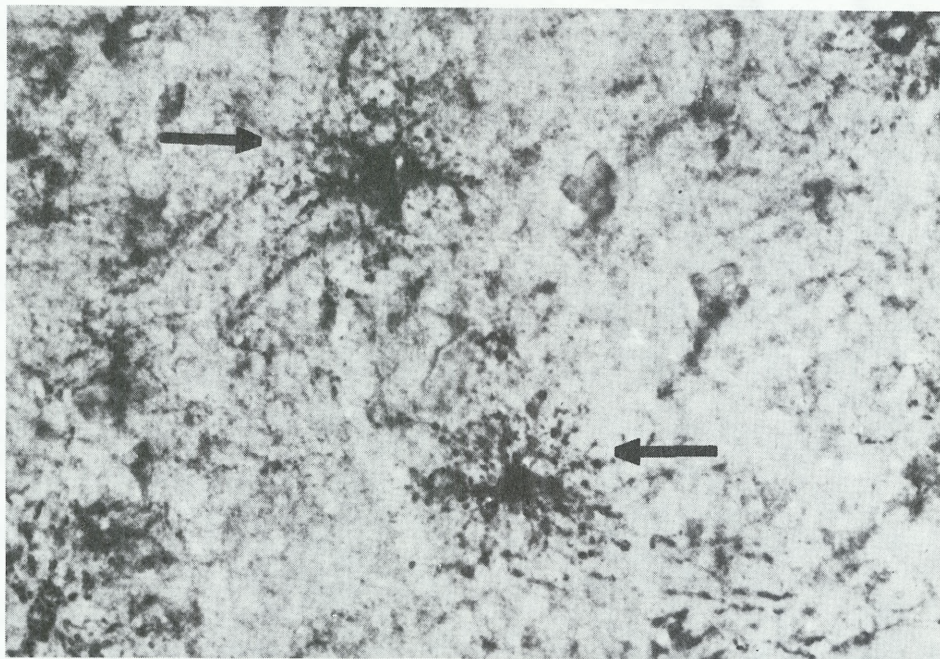
Z przedstawionych danych wynika, iż endogenny NGF ma istotne znaczenie dla funkcjonowania neuronów cholinergiczných w mózgu. Konsekwencją tych obserwacji było przypuszczenie, że podanie egzogennego NGF będzie miało znaczenie troficzne dla uszkodzonych neuronów cholinergiczných. Stało się to bodźcem do rozwoju badań nad wpływem egzogennego NGF w różnych modelach eksperymentalnych. Poniżej opisujemy najważniejsze wyniki uzyskane na modelach zwierzęcych, w których albo celowo w różny sposób uszkadza się neurony



Fot. 1. Lokalizacja NGF mRNA w hipokampie dorosłego szczura (hybrydyzacja *in situ*) związana z warstwami neuronalnymi. Obszar oznaczony na fot. A prostokątem przedstawiony jest w większym powiększeniu na fot. B.

B. Skróty: CA1-4 — *cornu Ammonis* (róg Ammona) 1-4; DG — *gyrus dentatus* (zakręt zębaty); G — *zona granularis* (warstwa komórek ziarnistych); P — *zona pyramidalis* (warstwa komórek piramidalnych). Powiększenie: A — 43x, B — 170x (Whittemore i in. 1988)

cholinergiczne, albo wykorzystuje się naturalnie zachodzące w nich procesy zwyrodnieniowe (jak w przebiegu starzenia się).



Fot. 2. Reaktywne astrocyty wykazujące immunoreaktywność na NGF (ziarnistości wskazane strzałkami) w obrębie przegrody mózgu szczura siedem dni po uszkodzeniu jej połączenia z hipokampem. Astrocyty w nieuszkodzonym mózgu nie wykazują immunoreaktywności na NGF (nie pokazano). Powiększenie 720x (Oderfeld-Nowak i in. 1992).

DZIAŁANIE EGZOGENNEGO NGF NA NEURONY CHOLINERGICZNE W MÓZGU

BADANIA NA MODELU USZKODZONEGO MÓZGU

Najczęściej stosowanym modelem badawczym używanym w pracach nad wpływem egzogenneho NGF na ośrodkowy układ nerwowy jest uszkodzenie połączeń cholinergiczych pomiędzy przegrodą i hipokampem. Stosuje się także uszkodzenia w obrębie układu podstawno – korowego, to jest zniszczenie jądra podstawnego wielkokomórkowego (NBM) — źródła unerwienia w tym układzie, bądź unerwianej przezeń części kory (rys. 1). Uszkodzenia stosowane w tych modelach imitują zmiany obserwowane w neuronach cholinergiczych w chorobach neurodegeneracyjnych, na przykład w chorobie Alzheimera i podczas procesu starzenia się oraz posiadają tę ogromną zaletę, że ich wpływ na czynność układu cholinergicznego jest dokładnie opisany. Do badań tych używa się zwykle szczu-

Ponieważ NGF nie przechodzi przez barierę krew – mózg, musi on być podawany domózgowo (Thoenen i in. 1987). Najczęstszym sposobem dostarczania egzogenego NGF w badaniach na zwierzęcych modelach doświadczalnych są infuzje NGF prowadzone za pomocą pompki osmotycznych (mini – Alzet). Innym sposobem dostarczania NGF są wszczepy polimerów nasyconych neurotrofiną, którą następnie powoli uwalniają (Yamamoto i in. 1992), dostarczanie NGF w mikrokapsułkach wykonanych z odpowiedniego biopolimeru (Maysinger i in. 1992), jeszcze innym — implantacja komórek zmodyfikowanych genetycznie i wytwarzających NGF (Stromberg i in. 1990).

Na modelach zwierzęcych określono dawki terapeutyczne egzogenego NGF. Kryterium uznania danej dawki za skuteczną było wystąpienie ochronnego działania NGF na odnerwione neurony jądra podstawnego. Po przecięciu strzępka bocznego NGF wykazywał działanie ochronne wobec neuronów przegrody, gdy był dostarczany pompką mini-osmotyczną w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ z szybkością 0,45 $\mu\text{l/h}$.

Stosując model częściowego przecięcia cholinergicznym połączeń septo-hipokampalnych wykazano w bardzo licznych pracach (Kromer 1987, Fusco i in. 1989, Gage i in. 1990, Hagg i in. 1990, Junard i in. 1990, Lapchak 1992), że chroniczne podawanie NGF zapobiega atrofii i śmierci neuronów cholinergicznym w strukturze unerwiającej (przegroda), jak i procesowi degeneracyjnemu w strukturze docelowej (hipokamp). Po przecięciu włókien projekcji przegroda – hipokamp następuje obniżenie aktywności enzymatycznej transferazy acetylocholinowej neuronów przegrody oraz ich zanik i śmierć. Tylko około 1/3 komórek, których neuryty są uszkodzone przeżywa, obniżając jedynie poziom swoistych białek znacznikowych. Egzogeny NGF zapobiega zarówno zanikowi, jak i procesowi degeneracyjnemu ich ciał komórkowych. Badano również wpływ długotrwałego działania NGF po odnerwieniu hipokampa. Pięciomiesięczne podawanie NGF do bocznej komory mózgu w dwóch dawkach tygodniowo zapobiegało degeneracji cholinergicznym ciał komórkowych wywołanej przez przecięcie strzępka i nie wywierało zauważalnych efektów ubocznych (Junard i in. 1990). Podawanie NGF nasila również zmiany kompensacyjne w obszarze zakończeń nerwowych, do których dochodzą uszkodzone włókna cholinergiczne, co przejawia się znacznym zwiększeniem liczby połączeń synaptycznych oraz powiększeniem kolbek synaptycznych (Lapchak 1992).

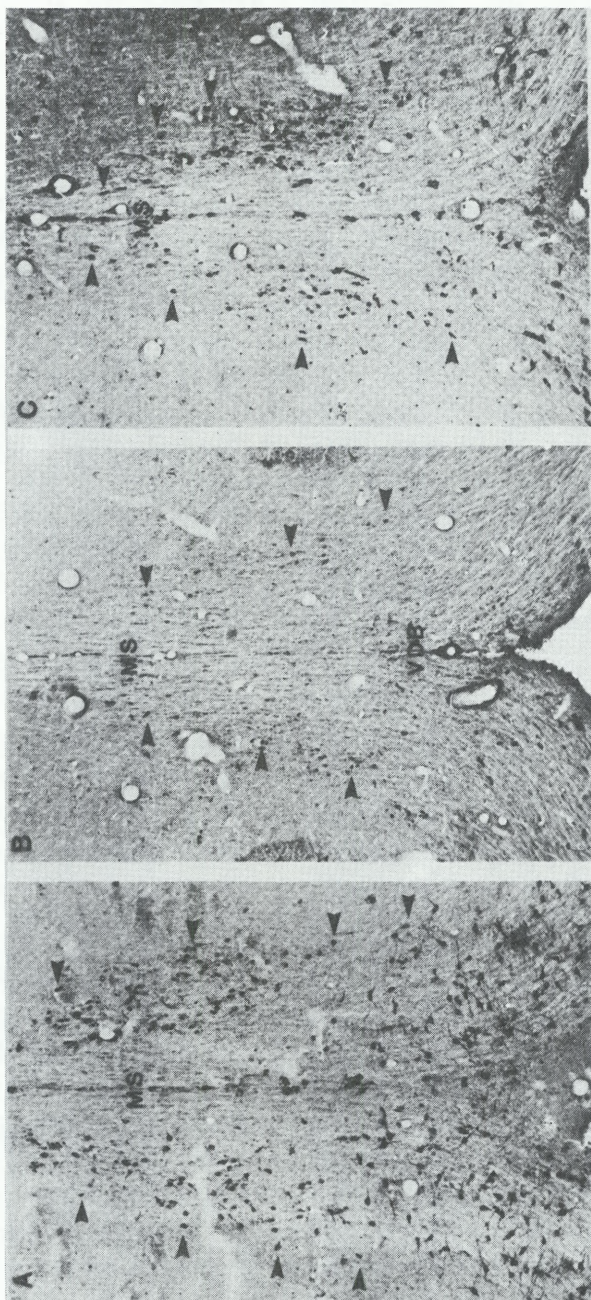
NGF odgrywa rolę w pourazowych jak też i innych zmianach plastycznych obserwowanych w hipokampie, takich jak sprouting (tj. boczne wyrastanie wypustek neuronalnych), czy odpowiedzi regeneracyjne, indukując odrost uszkodzonych włókien nerwowych i stwarzając właściwe dla wzrostu mikrośrodowisko (Gage i in. 1990). W badaniach wpływu egzogenego NGF na wzrost neurytów pochodzących z domózgowych przeszczepów nerwów obwodowych bądź płodowej tkanki mózgowej umieszczanych w miejscu przecięcia dróg septo-hipokampalnych stwierdzono, że ciągła infuzja NGF zastosowanego wraz z przeszczepem

znacznie wzmacniała i przyspieszała odrost i penetrację aksonów cholinergiczych do hipokampa (Hagg i in. 1990). NGF w tym wypadku przyczyniał się do zmniejszenia oporności dojrzałej tkanki mózgowej na inwazję cholinergiczną. Należy tu jednak wspomnieć, że terapia z zastosowaniem NGF ma tylko umiarkowany wpływ na wzrost neurytów cholinergiczych u osobników dorosłych w obszarze bezpośrednio przylegającym do miejsca przecięcia strzępka, a także nie wpływa na wrastanie włókien cholinergiczych do odnerwionego hipokampa (Junard i in. 1990). W licznych badaniach z użyciem przeszczepów tkanki płodowej umieszczanych w miejscu przerwania połączeń cholinergiczych u osobników dorosłych wykazywano natomiast znacznie bardziej nasilony odrost i penetrację do hipokampa cholinergiczych aksonów pochodzących z przeszczepu niż uszkodzonych aksonów biorcy przeszczepu. Wykazano także, stosując ten sam model uszkodzenia, iż implantacja mysich fibroblastów zmodyfikowanych genetycznie poprzez wprowadzenie aktywnego transkrypcyjnie genu β -NGF i wydzielających biologicznie czynny NGF wpływa w sposób znamieny statystycznie na liczbę neuronów przeżywających przecięcie ich aksonów. Wszczepione w obręb rany pooperacyjnej fibroblasty wydzielają NGF do końca badanego okresu, to jest przez 6 tygodni (Stromberg i in. 1990).

NGF poza wpływem na przeżywalność neuronów cholinergiczych, ich potencjał regeneracyjny i plastyczność pourazową, wpływa także na podtrzymanie ich funkcji rozumianej jako wytwarzanie znaczników układu cholinergicznego. Fotografia 3 ilustruje wpływ egzogenego NGF na immunoreaktywność ChAT w przegrodzie po uszkodzeniu jej połączeń z hipokampem (Kromer 1987). Analiza wpływu egzogenego NGF na parametry cholinergiczne w tym modelu wykazała częściowy powrót do normy obniżonej uszkodzeniem aktywności — zasadniczych enzymów komórek cholinergiczych, transferazy acetylo-cholinowej (ChAT) i esterazy acetylocholinowej (AChE), tak w hipokampie jak i w przegrodzie. NGF powodował 20%–60% przyrosty aktywności enzymatycznej ChAT w hipokampie i przegrodzie po stronie przecięcia (Fusco i in. 1989).

Dodatkowo zaobserwowano, że NGF zwiększa poziom ChAT także w strukturach nieuszkodzonych u dorosłych zwierząt (Fusco i in. 1989). Działanie NGF na poziom ChAT jest przypisywane jego zdolności do swoistej indukcji w komórkach fenotypu cholinergicznego poprzez pobudzanie syntezy mRNA ChAT, co potwierdziły ostatnie badania wykonane techniką hybrydyzacji *in situ* na neuronach jądra podstawno – korowego (NBM).

Większość prac dotyczących działania egzogenego NGF została wykonana w modelu septo-hipokampalnym, jednak tak po uszkodzeniach jądra podstawno – korowego (Casamenti i in. 1989) jak i po odnaczynieniu kory (Cuello i in. 1989, Maysinger i in. 1992) uzyskiwano podobne wyniki. Co więcej, wpływ egzogenego NGF na uszkodzone neurony cholinergiczne obserwowano nie tylko u szczurów, ale i u naczelników (Tuszyński i in. 1990, Koliatsos i in. 1991). Ważny jest również fakt, że opisywane rezultaty uzyskiwano nie tylko po podaniu



Fot. 3. Wpływ NGF na immunoreaktywność ChAT w neuronach przyśrodkowej przegrody szczura po obustronnym uszkodzeniu jej połączeń z hipokampem. A — zwierzę naiwne; B — zwierzę operowane; C — zwierzę operowane, któremu w ciągu czterech dni po zabiegu podawano dokomorowo NGF. Strzałki wskazują komórki cholinergiczne. Zwraca uwagę spadek liczby komórek wykazujących immunoreaktywność na ChAT w przegrodzie szczura operowanego. Spadek ten jest znacznie mniejszy po podaniu NGF (C). (Kromer 1987).

NGF otrzymywanego z naturalnego źródła, jakim jest ślinianka podżuchwowa samca myszy, ale i po podaniu rekombinowanego ludzkiego NGF (Lapchak 1992). Na koniec warto wspomnieć, iż NGF podawany zwierzętom z uszkodzonymi połączeniami cholinergicznymi zmniejsza powodowane przez te uszkodzenia ubytki behawioralne (Lapchak 1992).

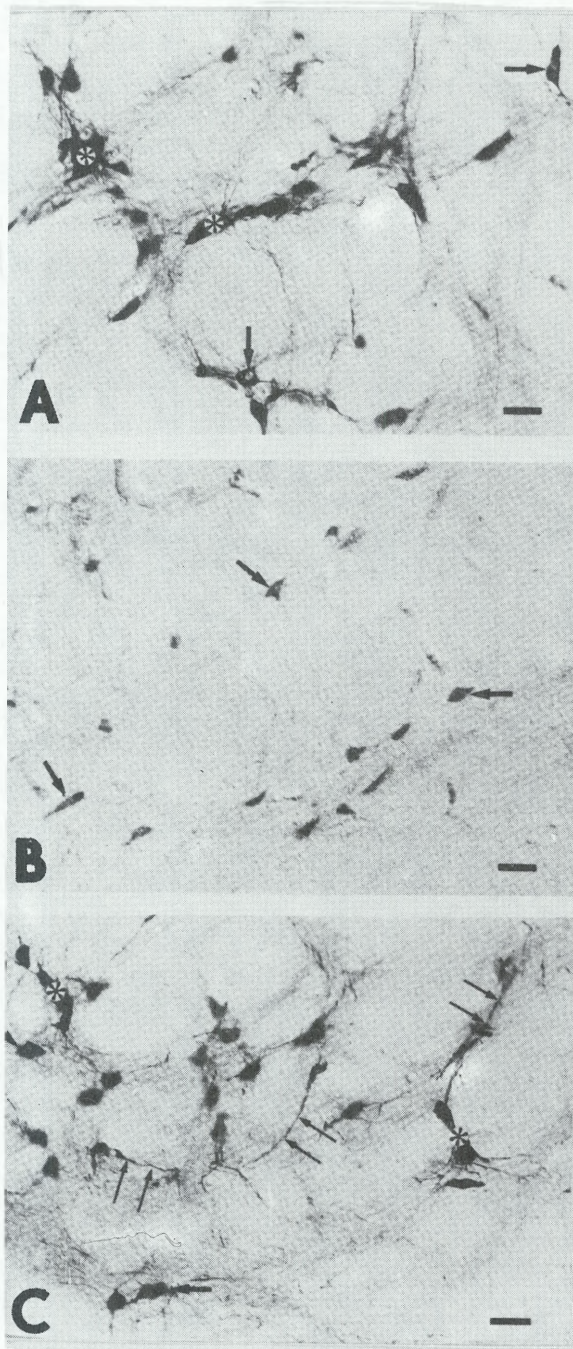
Dodatkowo należy odnotować, iż NGF wykazuje synergistyczny efekt farmakologiczny na neurony cholinergiczne z wieloma związkami między innymi z gangliozydami. Gangliozydy — glikosfingolipidy zawierające kwas sjałowy, są naturalnymi składnikami błon komórkowych i występują szczególnie obficie w ośrodkowym układzie nerwowym. Mają wpływ na różnicowanie się neuronów, czas ich przeżycia, a także synaptogenezę. Gangliozydy wpływają dobroczynnie na regenerację w obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym. Synergistyczne działanie NGF i gangliozydu GM1 obserwowano *in vitro* (przeżywalność i neurotogeneza) oraz *in vivo*: w modelu uszkodzeń systemu podstawno — korowego (Casamenti i in. 1989), a także po odnaczynieniu kory u szczurów (Cuellar i in. 1989). Fotografia 4 ukazuje ochronny wpływ łącznego podawania NGF i GM1 w stosunku do zmian w neuronach cholinergicznym NBM, rejestrowanych jako zmiany immunoreaktywności ChAT (Cuellar i in. 1989). Synergistyczny wpływ obu związków obserwowano także w odniesieniu do zachwianych uszkodzeniem układu cholinergicznego funkcji poznawczych (Casamenti i in. 1989).

BADANIA NA MÓZGACH STARYCH ZWIERZĄT

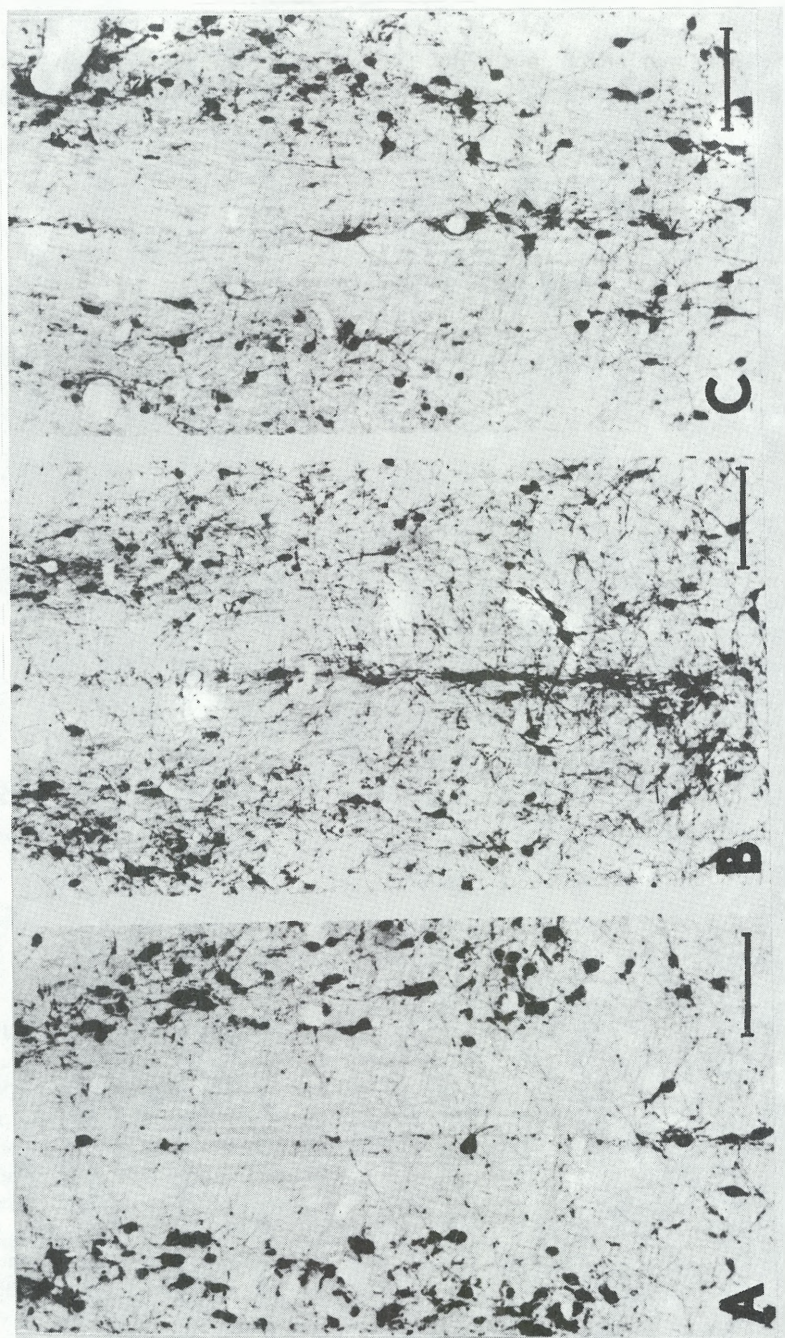
Wobec istotnej roli endogennego czynnika wzrostu nerwów dla układu cholinergicznego, a także obiecujących prób zastosowania tego czynnika w eksperymentalnych uszkodzeniach tego układu, imitujących przynajmniej częściowo zmiany związane z wiekiem, zastosowano czynnik wzrostu nerwów w naturalnych modelach starzenia się, mając na celu przezwyciężenie pewnych jego znamion związanych z zanikiem neuronów cholinergicznym. I tak na przykład, NGF podawany chronicznie zapobiega obumieraniu cholinergicznym neuronów przegrody u starych, 30-miesięcznych szczurów (fot. 5) oraz powoduje znaczną poprawę w testach orientacji przestrzennej (Fischer i in. 1991). Również w modelach uszkodzonego mózgu u starych szczurów, tak po uszkodzeniu połączeń cholinergicznym pomiędzy przegrodą a hipokampem, jak i po uszkodzeniu systemu podstawno — korowego, obserwowano dodatni wpływ czynnika wzrostu nerwów na przeżywalność neuronów cholinergicznym, chociaż osiągnięcie takiego efektu wymagało długiego czasu podawania neurotrofiny (Yunshao i in. 1991).

Wielokrotnie demonstrowano, że zachodzący z wiekiem zanik cholinergicznym komórek podstawnego przodomózgowia dotyczy tych neuronów, które charakteryzują się immunoreaktywnością dla receptora NGF (Koh i in. 1989). Wykazano, że w trzech najważniejszych podstawnym jądrach cholinergicznym szczura, a mianowicie w jądrze przyśrodkowym przegrody, jądrze pasma przekątnego i w jądrze podstawnym wielkokomórkowym, obserwuje się u starych zwie-

rząt wyraźne zmniejszenie liczby receptorów NGF o niskim powinowactwie na ciałach komórkowych i dendrytach. Regiony mózgu, w których dochodzi do obniżenia liczby receptorów NGF pokrywają się z obszarami o zmniejszonej z wiekiem aktywności ChAT. Obniżony poziom receptora NGF może wynikać z zachwiania równowagi w układzie NGF – recept. or NGF, brak bowiem jednomy-



Fot. 4. Łączny wpływ NGF i GM1 na immunoreaktywność ChAT w neuronach wielkokomórkowego jądra podstawnego szczura po odnaczyniającym uszkodzeniu kory. A — zwierzę naiwne; B — zwierzę operowane; C — zwierzę operowane, któremu podawano NGF i GM1. Gwiazdki wskazują zgrupowania komórek cholinergicznych, strzałki — komórki pojedyncze. Cienkie strzałki na (C) wskazują wybarwione wypustki komórek cholinergicznych. (Cuello i in. 1989).



Fot 5. Wpływ NGF na immunoreaktywność receptora NGF i ChAT (barwienie podwójne) w neuronach przyśrodkowej przegrody starego szczura. A — zwierzę młode; B — zwierzę stare (trzydziestomiesięczne); C — zwierzę stare (trzydziestomiesięczne), któremu podawano do przegrody NGF. Zwraca uwagę znacznie zmniejszona liczba i rozmiary wybarwionych komórek u szczura trzydziestomiesięcznego (B). Po stronie wlewu NGF (prawa strona C) nie nastąpiło zmniejszenie się rozmiarów komórek. Skala — 100 μ m. (Fischer i in. 1991).

ślności co do zmian poziomu NGF u starych szczurów (Goedert i in. 1986, Larsfors i in. 1987).

MECHANIZM DZIAŁANIA NGF NA NEURONY CHOLINERGICZNE

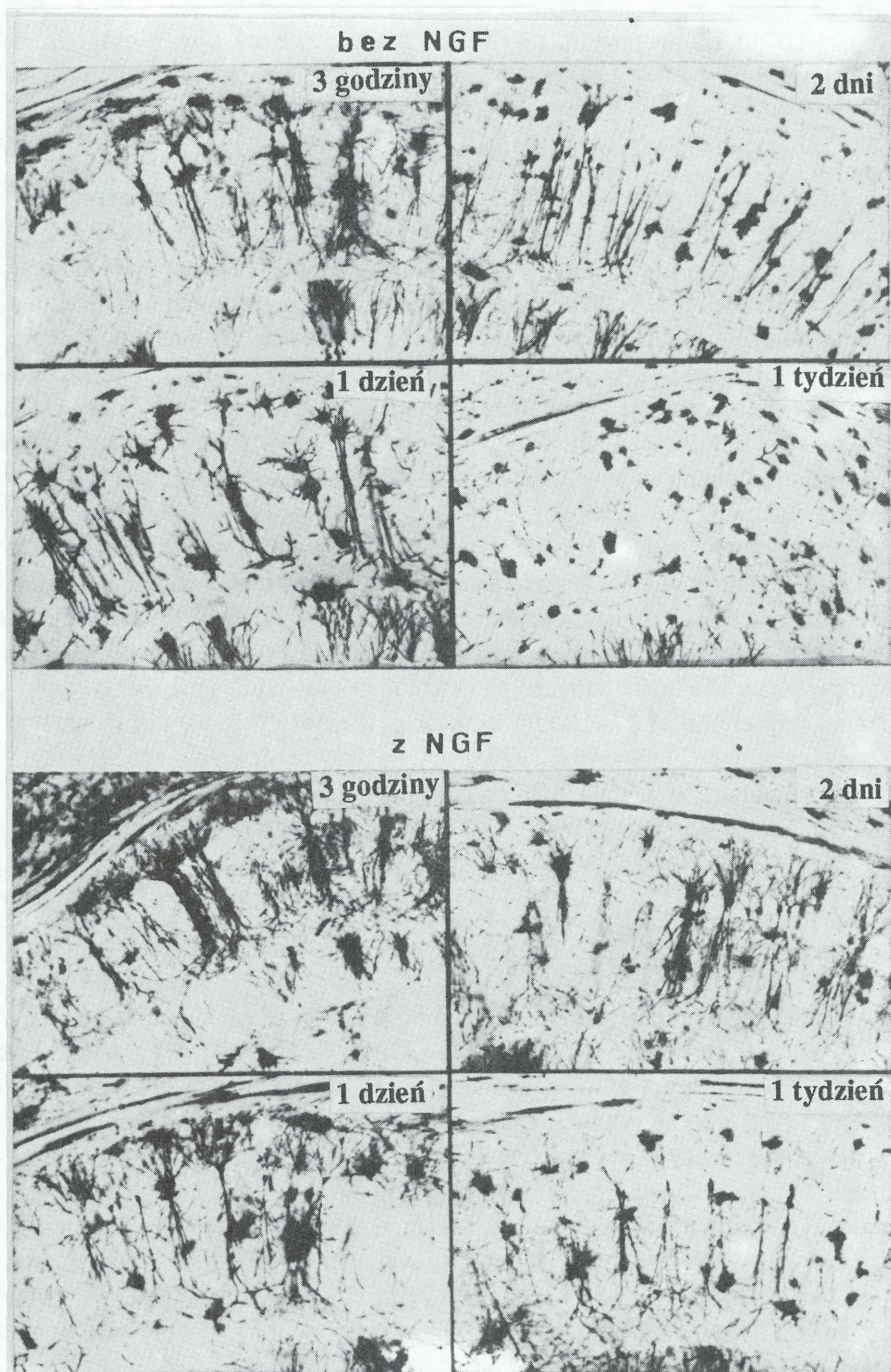
NGF wywiera działanie troficzne na neurony cholinergiczne poprzez wiązanie się do swego receptora o wysokim powinowactwie. Kompleks NGF – receptor NGF jest wstecznie transportowany do ciała komórki nerwowej. Wydaje się, że w mechanizmie działania NGF odgrywają rolę, obok wspomnianego przemieszczenia kompleksu NGF – receptor, także specyficzne, przenoszone przez NGF sygnały. Wykazano, iż receptor NGF o niskim powinowactwie jest zaangażowany w inicjacji fosforylacji tyrozyny, procesu, który jest niezbędny dla powstania odpowiedzi fizjologicznych. Wykazano również, że aktywność kinazy tyrozynowej protoonkogenu *trk*, wchodzącego w skład kompleksu receptora o wysokim powinowactwie, jest niezbędna, obok obecności receptora o niskim powinowactwie, aby mogło zajść wiązanie NGF z receptorem o wysokim powinowactwie i odpowiedź biologiczna. W następnym etapie przekazywania sygnału wydają się uczestniczyć białka sygnałowe, takie jak białka aktywujące GTP-azę, które wiążą się do ufosforylowanych w reszcie tyrozynowej peptydów. Aczkolwiek dalszy szlak sygnału nie jest znany, to pierwsze dane wskazują, że NGF wywiera swe działanie na cholinergiczne komórki znajdujące się w źródłach unerwienia poprzez aktywację kinazy białkowej C (PKC).

Mechanizmy działania NGF na neurony cholinergiczne zostały szczegółowo przedstawione w artykułach przeglądowych (Lapchak 1992, Vantini i Skaper 1992).

DZIAŁANIE EGZOGENNEGO NGF NA NEURONY NIECHOLINERGICZNE

Rola NGF w układzie cholinergicznym jest dobrze udokumentowana. Jednak wydaje się, że endogenne NGF wpływa także na funkcje neuronów niecholinergiczych, przynajmniej w hipokampie. Ostatnie wyniki badań, uzyskane w kilku niezależnych laboratoriach, wskazują na ochronne działanie egzogenne NGF po uszkodzeniach mózgu wywołanych niedokrwieniem, w którym to modelu uszkodzane są komórki niecholinergiczne, prawdopodobnie glutamatergiczne, to znaczy neurony piramidalne pola CA1 hipokampa. W tym modelu egzogenne NGF przeciwdziałał tak zwanej opóźnionej śmierci neuronalnej (delayed neuronal death — DND) (Shigeno i in. 1991, Yamamoto i in. 1992). Wpływ NGF na opóźnioną śmierć komórkową przejawia się między innymi wpływem na morfologię komórek niecholinergiczych (fot. 6).

Działanie ochronne NGF w doświadczalnym niedokrwieniu może mieć odniesienie praktyczne, jako że także u ludzi pole CA1 hipokampa jest szczególnie wrażliwe na niedokrwienie. Wskazują na to często spotykane w materiale sekcyj-



Fot. 6. NGF zapobiega zanikowym zmianom dendrytycznym w hipokampie gerbila poddanym przejściowemu niedokrwieniu. Górna część ilustracji przedstawia fragmenty hipokampa pochodzące od gerbila, któremu przed wywołaniem niedokrwienia nie podawano NGF. Zwraca uwagę zanik dendrytów. Dolna część ilustracji prezentuje chronologiczne zmiany u zwierzęcia, które otrzymywało NGF (Shigeno i in. 1991).

nym zmiany martwicze w tym polu u pacjentów, u których wystąpi okresowe zatrzymanie krążenia mózgowego.

Rozważa się kilka możliwych mechanizmów ochronnego działania NGF w zapobieganiu lub też zmniejszaniu DND. Egzogenny NGF mógłby działać bezpośrednio na neurony piramidalne hipokampa, wywierać wpływ przez swoje receptory, których ekspresję stymuluje, bądź reagować krzyżowo z receptorami innych członków rodziny NGF (Shigeno i in. 1991). Ponadto spekuluje się, iż ochronne działanie egzogenego NGF mogłoby być pośredniczone przez blokowanie wytwarzania hipotetycznego „białka śmierci” (killer protein). Hipotezę taką wysunięto porównując naturalnie występującą w rozwoju płodowym śmierć neuronów i postischemiczną opóźnioną śmierć neuronów. W obu przypadkach można jej zapobiegać chemicznymi inhibitorami syntezy białek. Wiadomo też, że NGF zapobiega wywołanemu hipoglikemią wzrostowi wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia (Yamamoto i in. 1992).

ZABURZENIA FUNKCJI UKŁADU CHOLINERGICZNEGO W CHOROBIE ALZHEIMERA I W PROCESIE STARZENIA SIĘ A NGF

Od szeregu lat wiadomo, że zmianom otepiennym i osłabieniu sprawności procesów poznawczych towarzyszy osłabienie funkcji układu cholinergicznego mózgu. W chorobie Alzheimer, charakteryzującej się postępującą utratą pamięci, obserwuje się poważny spadek aktywności enzymatycznej ChAT w korze mózgowej i hipokampie oraz utratę komórek w jądrze podstawnym Meynerta, które jest głównym komórkowym źródłem unerwienia cholinergicznego kory i, poprzez septum, hipokampa. Ubytki neuronów cholinergiczných jąder podstawnych mózgu należą do najbardziej stałych i najmocniej zarysowanych neurochemicznych objawów patologicznych w chorobie Alzheimer. Powyższe fakty posłużyły do sformułowania hipotezy mówiącej o tym, że u podłoża choroby Alzheimer leżą zaburzenia układu cholinergicznego przodomózgowia (Collerton 1986, Hefti i Weiner 1986).

W procesie naturalnego starzenia się, podobnie jak w chorobie Alzheimer, dochodzi do utraty komórek cholinergiczných, jednak zmiany te są znacznie łagodniejsze. W 1982 r. R. Bartus sformułował cholinergiczną hipotezę geriatrycznych zaburzeń pamięci, wiążąc zaburzenia pojawiające się w przebiegu starzenia się z pogorszeniem funkcjonowania i obniżeniem sprawności układu cholinergicznego. Nowsze badania zmian parametrów układu cholinergicznego mózgu u pacjentów z chorobą Alzheimer i u osób starych zdają się potwierdzać rolę tego układu dla procesów pamięci i uczenia się, wnosząc istotne nowe elementy poznawcze. Obecnie sądzi się, iż dawne hipotezy cholinergiczne dotyczące patogenyzy choroby Alzheimer, w swej pierwotnej postaci nie są prawdziwe.

W 1981 roku (Appel 1981) została zaproponowana hipoteza, ogólnie znana pod nazwą hipotezy neurotroficznej, mówiąca o tym, iż zwyrodnienie neuronów,

obserwowane w różnych chorobach neurologicznych wieku starczego, jak w chorobie Alzheimera, chorobie Parkinsona i w stwardnieniu zanikowym bocznym, wynika ze zmniejszonej podaży specyficznych czynników neurotroficznych wytwarzanych przez struktury docelowe unerwiane z regionów degenerujących komórek. Fakt, że NGF podtrzymuje funkcje neuronów cholinergicznych w powiązaniu ze zjawiskiem znacznego zaniku tych neuronów i spadkiem poziomu ich znaczników cholinergicznych, spotykanym u pacjentów z chorobą Alzheimera, spowodował skoncentrowanie uwagi na NGF jako czynniku zaangażowanym w patogenezie tej choroby. Jednak wyniki badań dotyczących poziomu NGF w mózgu w chorobie Alzheimera, jak i podczas normalnego starzenia się, nie są jednoznaczne. Stwierdzano, na przykład, spadki poziomu mRNA NGF w korze i w hipokampie mózgów pochodzących od pacjentów zmarłych w przebiegu choroby Alzheimera. Nie stwierdzono natomiast obniżenia się poziomu białka NGF w tej chorobie, chociaż prowadzi ona do zmniejszenia się liczby komórek produkujących NGF. Z kolei prace badające poziom receptora NGF zgodnie stwierdzają zmniejszenie się jego ekspresji w chorobie Alzheimera. W materiale autopsyjnym pochodzącym od osób starych w niektórych przypadkach stwierdzano obniżenie poziomu NGF w mózgu, w innych nie obserwowano zmian (Goedert i in. 1986). Warto tu wspomnieć, że podobne obserwacje wynikały z badań mózgów zwierząt starych, co omówiono powyżej. Obserwowano mianowicie wyraźne zmniejszenie się liczby receptorów NGF, a nadto regiony mózgu, w których dochodziło do obniżenia się liczby receptorów NGF, pokrywały się z obszarami o zmniejszonej z wiekiem aktywności ChAT.

W obecnej chwili nie jest możliwa konkluzja, czy NGF jest zaangażowany w patogenezie choroby Alzheimera, jednakże wiele obserwacji wskazuje na istotne znaczenie NGF w tej chorobie i w przebiegu procesu fizjologicznego starzenia się. Postuluje się, że niedobory ChAT w chorobie Alzheimera i w starzeniu się mogłyby być spowodowane zaburzeniem interakcji NGF z jego receptorem, prawdopodobnie na skutek zmian produkcji receptora lub zachwiania normalnej transdukcji sygnału dla NGF na poziomie protoonkogenu *trk*.

Niezależnie od faktu, czy rzeczywiście endogenne NGF jest, czy nie jest bezpośrednio zaangażowany w patogenezie zaburzeń cholinergicznych obserwowanych w chorobie Alzheimera i w przebiegu starzenia się, bardzo obiecujące wyniki prac eksperymentalnych z podawaniem egzogenne NGF, omówione powyżej, zdają się wskazywać, iż terapia egzogenne NGF mogłaby być wskazana chociażby ze względu na poprawę funkcji nie dotkniętych procesem chorobowym neuronów cholinergicznych. W efekcie poprawy działania układu cholinergicznego należałoby się spodziewać ogólnej poprawy zaburzonych w chorobie Alzheimera funkcji. Nadzieje związane z NGF jako potencjalnym lekiem są tym bardziej zrozumiałe, że jak dotąd nie udało się stworzyć skutecznej strategii korygowania deficytów cholinergicznych spowodowanych chorobami neurodegeneracyjnymi czy starzeniem się. Działanie stosowanych do tej pory środków

jest dość ograniczone, tym bardziej, że w dawkach terapeutycznych większość z nich powoduje występowanie objawów ubocznych (Kumar i Calache, 1991).

NGF posiada cechy jakie powinna spełniać poszukiwana substancja farmakologiczna, która wywierałaby dodatni wpływ na degenerujące neurony cholinergiczne i zapobiegała rozszerzaniu się tego procesu poprzez działanie troficzne i ochronne, bądź też poprzez oddziaływanie na regulację ich aktywności. Zapewnienie optymalnych warunków mikrośrodowiska dla neuronów cholinergicznych sprzyałoby ich optymalnej aktywności. Ponadto, wpływając w ten sposób również na inne, niecholinergiczne komórki nerwowe biorące udział w procesach pamięci, mogłaby poprawiać ogólną sprawność zaburzonych procesów poznawczych.

Większość badaczy optuje za zastosowaniem NGF w terapii choroby Alzheimera (Tuszyński i Gage 1990, Lapchak 1992). Jednakże niektórzy autorzy sceptycznie odnoszą się do możliwości zastosowania NGF w terapii choroby Alzheimera (Butcher i Woolf 1989) wychodząc z założenia, że patogeneza choroby Alzheimera jest związana ze zmianami w regulacji białek cytoszkieletalnych prowadzącymi do tego, iż architektura neuronów staje się w większym stopniu zdeterminowana przez białka biorące udział w stanach strukturalnie labilnych. To z kolei prowadziłoby do aberracji zakończeń neuronalnych, niekontrolowanego sproutingu, reaktywnej gliozy, czy nienormalnego wzrostu neuronów, co NGF mógłby nasilać.

W chwili obecnej nie są poznane wszystkie efekty uboczne podawania egzogenego NGF. W pierwszych próbach klinicznych podejmowanych w latach siedemdziesiątych, kiedy to mysz NGF podawany był obwodowo dzieciom z neuroblastomą, u części pacjentów pojawiał się świąd skóry, wzrost ciśnienia krwi i bóle głowy. Należałoby to przypisywać raczej ogólnym efektom toksycznym niezbyt dobrze oczyszczonego w owych czasach białka. Dalsze badania na modelach zwierzęcych powinny przynieść dodatkowe informacje co do toksyczności NGF o sekwencjach homologicznych dla danego gatunku. Nie wiadomo również jaka byłaby najbardziej optymalna dawka. Jak dotąd określono jedynie dawki skuteczne w badaniach eksperymentalnych.

Nie ma dotychczas badań, które mogłyby ocenić skutki dłuższego niż pięciomiesięczny okres podawania NGF *in vivo*. Znajdujemy się jeszcze na etapie badań na modelach zwierzęcych, które to badania są jeszcze fragmentaryczne i dotyczą tylko niektórych aspektów działania egzogenego NGF. Pomimo to należy odnotować pierwsze próby zastosowania czynnika wzrostu nerwów w terapii choroby Alzheimera (Olson i in. 1992). Są to jednak pojedyncze, wstępne próby, bowiem nierozwiązany wciąż jest zasadniczy problem dla ewentualnego zastosowania NGF w klinice, a mianowicie dostarczenie czynnej substancji do mózgu.

Ewentualna terapia ludzkich chorób neurodegeneracyjnych będzie wymagać długotrwałego, wieloletniego dostarczania NGF, a więc nie wchodzi w grę podawanie domózgowe. Znaczny postęp w dziedzinie doskonalenia metod dostarczania NGF dokonał się ostatnio wraz z opracowaniem koniugatu NGF z przeciwciałem

przeciwno receptorowi transferyny zdolnego do przekraczania bariery krew – mózg (Friden i in. 1993). Koniugat ten mógłby być zatem podawany obwodowo. Jego badania znajdują się w fazie prób na modelach zwierzęcych.

UWAGI KOŃCOWE

Z przedstawionego krótkiego przeglądu działania czynnika wzrostu nerwów w doświadczalnych modelach imitujących zaburzenia funkcji cholinergicznym wynika, że posiada on działanie hamujące zmiany zwyrodnieniowe w neuronach cholinergicznym i działanie odwracające pewne znamiona starzenia się tego układu. Te obiecujące obserwacje przyczynią się być może do unowocześnienia strategii naprawczych stosowanych w przewyciężaniu zaburzeń układu cholinergicznego. Nieliczne jeszcze, lecz obiecujące wyniki dotyczące zapobiegania przez NGF zmianom degeneracyjnym w neuronach niecholinergicznym, jak w zjawisku tak zwanej opóźnionej śmierci neuronalnej wywoływanym przejściowym niedokrwieniem mózgu, również zdają się budzić nadzieję na przyszłe możliwości terapeutyczne związane z tą neurotrofiną. Czy NGF znajdzie szersze zastosowanie terapeutyczne u ludzi zależeć będzie nie tylko od dalszego postępu badań podstawowych, ale i od wyników pilotowych prób klinicznych. Jednocześnie specyfika działania czynników neurotroficznym czym z nich doskonale narzędzie do dalszych badań samych procesów naprawczych. Obecne badania zmierzają do wyjaśnienia roli w ośrodkowym układzie nerwowym najmniej poznanych neurotrofin — BDNF i NT-3, należących do rodziny neurotroficznym NGF, ich interakcji z NGF oraz działania wszystkich neurotrofin w zespole. Ich poznanie wymaga dalszych wielotorowych badań funkcjonalnym, molekularnym, komórkowym i biochemicznym.

ROLE OF THE NERVE GROWTH FACTOR IN BRAIN

Summary

This review provides an overview of the presence and significance of the nerve growth factor (NGF) in the brain with respect to its importance as a maintenance factor for adult cholinergic neurons. It also emphasizes its possible role in rescuing noncholinergic hippocampal neurons.

The neurotrophic action of NGF on cholinergic neurons *in vivo* in lesion and aging models, and on noncholinergic neurons in an ischemic model are presented.

In addition, this review provides information concerning the possible therapeutic use of NGF to treat neurodegenerative diseases involving central cholinergic neurons, such as Alzheimer's disease and ageing.

LITERATURA

- Appel S. H., 1981. *A unifying hypothesis for the cause of amyotrophic lateral sclerosis, Parkinsonism and Alzheimer's disease*. Ann. Neurol. 10, 499–505.
- Bacia A., Aloe L., Fusco M., Vantini G., Leon A., Oderfeld-Nowak B., 1992. *Cellular localization of nerve growth factor-like immunoreactivity in hippocampus and septum of adult rat brain*. Acta Neurobiol. Exp. 52, 1–7.
- Bartus R. T., Dean R. L., Beer B., Lippa A. S., 1982. *The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction*. Science 217, 408–417.
- Butcher L., Woolf N. J., 1989. *Neurotrophic agents may exacerbate the pathologic cascade of Alzheimer's disease*. Neurobiol. Aging 10, 557–570.
- Casamenti F., Di Patre P. L., Milan F., Petrelli L., Pepeu G., 1989. *Effects of nerve growth factor and GM1 ganglioside on the number of cholinergic neurons in rats with unilateral lesion of the nucleus basalis*. Neurosci. Lett. 103, 87–91.
- Collerton D., 1986. *Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease*. Neurosci. 19, 1–28.
- Cuello A. C., Garofalo L., Kenigsberg R. L., Maysinger D., 1989. *Gangliosides potentiate in vivo and in vitro effects of nerve growth factor on central cholinergic neurons*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 2056–2060.
- Fischer W., Bjorklund A., Chen K., Gage F. H., 1991. *NGF improves spatial memory in aged rodents as a function of age*. J. Neurosci. 11, 1889–1906.
- Friden P. M., Walus L. R., Watson P., Doctrow S. R., Kozarich J. W., Bakman C., Bergman H., Hoffer B., Bloom F., Granholm A. C., 1993. *Blood-brain barrier penetration and in vivo activity of an NGF conjugate*. Science 259, 373–377.
- Fusco M., Oderfeld-Nowak B., Vantini G., Schiavo N., Gradkowska M., Zaremba, M., Leon A., 1989. *Nerve growth factor affects uninjured, adult rat septohippocampal cholinergic neurons*. Neuroscience 33, 47–52.
- Gage F. H., Buzsaki G., Armstrong D. M., 1990. *NGF-dependent sprouting and regeneration in the hippocampus*. Prog. Brain Res., 83, 357–370.
- Goedert M., Fine A., Hunt S. P., Ullrich A., 1986. *Nerve growth factor mRNA in peripheral and central rat tissue and in the human central nervous system: lesion effects in the rat brain and levels in Alzheimer's disease*. Mol. Brain Res. 1, 85–92.
- Hagg T., Vahlsing H. L., Manthorpe M., Varon S., 1990. *Nerve growth factor infusion into the denervated adult rat hippocampal formation promotes its cholinergic reinnervation*. J. Neurosci. 10, 3087–3092.
- Hefti F., Weiner W. J., 1986. *Nerve growth factor and Alzheimer's disease*. Ann. Neurol. 20, 275–281.
- Junard E. O., Montero C. N., Hefti F., 1990. *Long-term administration of mouse nerve growth factor to adult rats with partial lesions of the cholinergic septo-hippocampal pathway*. Exp. Neurol. 110, 25–38.
- Koh S., Chang P., Collier T. J., Loy R., 1989. *Loss of NGF receptor immunoreactivity in basal forebrain neurons of aged rats — correlation with spatial memory impairment*. Brain Res. 498, 397–404.
- Koliatsos V. E., Clatterbuck R. E., Nanta H. J., Knusel B., Burton L. E., Hefti F., Mobley W. C., Price D. L., 1991. *Human nerve growth factor prevents degeneration of basal forebrain cholinergic neurons in primates*. Ann. Neurol. 30, 831–840.
- Kromer L., 1987. *Nerve growth factor treatment after brain injury prevents neuronal death*. Science 235, 214–216.
- Kumar U., Calache M., 1991. *Treatment of Alzheimer's disease with cholinergic drugs*. Int. J. Clin. Pharmacol. Therapy and Toxicol. 1, 23–37.

- Lapchak P. A., 1992. *Therapeutic potential for nerve growth factor in Alzheimer's disease: insights from pharmacological studies using lesioned central cholinergic neurons*. Rev. Neurosci. 3.
- Larsfors L., Ebendal T., Whittemore S. R., Persson H., Hoffer B., Olson L., 1987. *Decreased level of nerve growth factor (NGF) and its messenger RNA in the aged brain*. Mol. Brain Res. 3, 55–60.
- Levi-Montalcini R., 1982. *Developmental neurobiology and the natural history of nerve growth factor*. Ann. Rev. Neurosci. 5, 341–362.
- Levi-Montalcini R., 1987. *The nerve growth factor: thirty five years later*. EMBO J. 6, 1145–1154.
- Maysinger D., Jalsenjak I., Cuellar A. C., 1992. *Microencapsulated nerve growth factor: effects on the forebrain neurons following devascularizing cortical lesions*. Neurosci. Letters 140, 71–74.
- Oderfeld-Nowak B., Bacia A., Grądkowska M., Fusco M., Vantini G., Leon A., Aloe L., 1992. *In vivo activated brain astrocytes may produce and secrete nerve growth factor-like molecules*. Neurochem. Int. 21, 455–461.
- Olson L. A., Nordberg H., von Holst L., Backman T., Ebendal I., Alafuzoff K., Amberla P., Hartvig A., Herlitz A., Lilja H., Lundqvist B., Langstrom B., Meyerson A., Persson M., Viitanen B., Wiblad B., Seiger W. A., 1992. *Nerve growth factor affects IIC-nicotine binding, blood flow, EEG, and verbal episodic memory in an Alzheimer patient (Case report)*. J. Neural. Transm. 4, 79–95.
- Shigeno T., Mima T., Takakura K., Graham D. I., Kato G., Hashimoto Y., Furukawa S., 1991. *Amelioration of delayed neuronal death in the hippocampus by nerve growth factor*. J. Neurosci. 11, 2914–2919.
- Stromberg J., Wetmore C. J., Ebendal T., Ernfors P., Persson H., Olson L., 1990. *Rescue of basal forebrain cholinergic neurons after implantation of genetically modified cells producing recombinant NGF*. J. Neurosci. Res. 25, 405–411.
- Thoenen H., Bandtlow C., Heumann R., 1987. *The physiological function of nerve growth factor in central nervous system: the comparison with the periphery*. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 109, 145–178.
- Tuszyński M. H., Gage F. H., 1990. *Potential use of neurotrophic agents in the treatment of neurodegenerative disorders*. Acta Neurobiol. Exp. 50, 311–322.
- Tuszyński M. H., Hoi Sang U., Amaral D. G., Gage F. H., 1990. *Nerve growth factor infusion in the primate brain reduces lesion-induced cholinergic neuronal degeneration*. J. Neurosci. 10, 3604–3614.
- Vantini G., Skaper S., 1992. *Neurotrophic factors: from physiology to pharmacology?* Pharmacol. Res. 26, 1–15.
- Whittemore S. R., Friedman P. L., Larhammer D., Persson H., Gonzales-Carvajal H., Holets V. R., 1988. *Rat-nerve growth factor sequence and the site of synthesis in the adult hippocampus*. J. Neurosci. Res. 20, 403–410.
- Whittemore S. R., Seiger W. A., 1987. *The expression, localization and functional significance of beta-nerve growth factor in the central nervous system*. Br. Res. 12, 439–464.
- Yamamoto S., Yoshimine T., Fujita T., Kuroda R., Irie T., Fujioka K., Hayakawa T., 1992. *Protective effect of NGF atelocollagen mini-pellet on the hippocampal delayed neuronal death in gerbils*. Neurosci. Lett. 141, 161–165.
- Yunshao H., Zhibin Y., Yici C., 1991. *Effect of nerve growth factor on the lesioned septohippocampal cholinergic system of aged rats*. Brain Res. 552, 159–163.