

GRAŻYNA NIEWIADOMSKA, MACIEJ MAŁECKI

Zakład Neurofizjologii

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

E-mail: gwn@ameba.nencki.gov.pl

NEUROTROFINY — NARZĘDZIE W PRÓBACH NAPRAWY USZKODZONEGO UKŁADU NERWOWEGO

WSTĘP

W roku 1991 z inicjatywy pracowników naukowych Instytutu Nenckiego w Warszawie zawiązało się Polskie Towarzystwo Badań Układu Nerwowego. Jedną z licznych aktywności Towarzystwa jest organizowanie szkół naukowych, w czasie których specjaliści z danej dziedziny neurobiologii starają się przekazać stan wiedzy na dany temat. Organizowanie tych szkół stało się tradycją. Odbývają się zawsze w maju, stąd noszą nazwę Wiosennej Szkoły Neurobiologii. W maju 1997 roku miała miejsce już czwarta taka szkoła, a jej tematem były: czynniki troficzne i cytokiny w fizjologii i patologii układu nerwowego. W czasie szkoły odbyły się dwie sesje. Pierwsza na temat występowania mechanizmów

działania i funkcji czynników troficznych i cytokin w fizjologii układu nerwowego oraz druga na temat badania tych związków w warunkach patologii eksperymentalnej i klinicznej oraz prób terapii chorób układu nerwowego czynnikami troficznymi, między innymi w chorobie Alzheimer'a, Parkinsona, chorobach demielinizacyjnych, stwardnieniu zanikowym bocznym, chorobach prionowych i w ischemii mózgu. Spróbujmy przedstawić bliżej jedną z klas substancji, którym poświęcono sesję naukową i które odgrywają bardzo znaczącą rolę zarówno w rozwijającym się, jak i dojrzałym układzie nerwowym.

NGF — SUBSTANCJA SYGNAŁOWA W UKŁADZIE NERWOWYM

W rozwoju zarodkowym powstaje bardzo dużo komórek prekursorowych układu nerwowego, tak zwanych neuroblastów. Różnicują się w procesie dojrzewania w komórki nerwowe, wykształcając wypustki, łączące je z innymi neuronami lub komórkami narządów obwodowych, czyli z miejscami docelowymi ich projekcji. Spośród nadmiaru neuronów w niedojrzałym układzie nerwowym przeżyją tylko te, które wytworzą połączenia i poprzez synapsy będą odbierały i przekazywały sygnały, co stanowi istotę działania tego układu. Neurony, które nie zdołały wytworzyć synaps, przez co nie stały się częścią sieci neuronalnej, obumierają w aktywnym procesie programowanej śmierci komórek, zwanym apoptozą. Neurony, które znalazły się w sieci wzajemnych połączeń nie tylko oczekują

sygnałów, do ich odbierania są wszakże funkcjonalnie wyspecjalizowane, ale także potrzebują sygnałów, aby przeżyć. Natura tych sygnałów może być zarówno elektryczna, jak i chemiczna.

Pogląd, że przeżywalność neuronów w czasie rozwoju zależy od sygnałów troficznych przekazywanych z miejsc docelowych ich projekcji znany jest od lat trzydziestych naszego stulecia. Przełom w tych badaniach dokonał się w roku 1953 wraz z odkryciem przez R. LEVI-MONTALCINI białkowego czynnika stymulującego rozrost neuronalny, nazwanego czynnikiem wzrostu nerwów (NGF, ang. nerve growth factor), (LEVI-MONTALCINI i HAMBURGER 1953).

Wyzolowanie i scharakteryzowanie NGF jest klasycznym przykładem na to, że w nauce

wielkich odkryć na miarę Nagrody Nobla (Rita Levi-Montalcini otrzymała ją w 1986 roku) dokonuje się przez przypadek. RITA LEVI-MONTALCINI i jej współpracownicy zaplanowali doświadczenie, w którym postanowili sprawdzić, czy komórki guzów nowotworowych mogą zastąpić tkankę obwodową i być źródłem czynników zwiększających przeżywanie neuronów w obwodowym układzie nerwowym. Wcześniejsze obserwacje pozwalały na takie przypuszczenie. Po implantacji tkanki mięsaka noworodkom myszy zaobserwowali dramatyczny rozrost zwojów współczulnych i czuciowych oraz zwojów korzeni grzbietowych rdzenia kręgowego, a także intensywne wyrastanie neurytów ze zwojów leżących w pobliżu miejsca przeszczepu (LEVI-MONTALCINI i HAMBURGER 1953). W dalszych badaniach stwierdzili, że efekt ten jest powodowany przez nieznane, rozpuszczalne w wodzie białko produkowane przez przeszczepioną tkankę nowotworową. W doświadczeniach, których celem było oczyszczenie tego białka i kodującego je DNA lub mRNA używali jadu żmii jako źródła fosfodiesterazy, enzymu degradującego kwasy nukleinowe. Stwierdzili wówczas, że jad żmii sam w sobie jest źródłem jakiegoś czynnika troficznego, który powoduje rozrost zwojów obwodowych, a uzyskany efekt jest znacznie silniejszy niż w przypadku tkanki nowotworowej. W kolejnych doświadczeniach wyekstrahowali białko, które obecne było zarówno w przeszczepionych tkankach, jak i w znacznie wyższym stężeniu w jadzie żmii. To właśnie był NGF!

LEVI-MONTALCINI i współpracownicy wykazali, że u nowo narodzonych myszy i szczurów podanie przeciwciała skierowanego przeciw NGF powoduje niemal całkowity zanik obwodowych zwojów współczulnych (LEVI-MONTALCINI i BOOKER 1960). Ponadto, przeciwciała anti-NGF podane gryzoniom we wczesnych stadiach rozwoju postnatalnego powoduje zmniejszenie liczby neuronów w zwojach korzeni grzbietowych rdzenia kręgowego. Wynika stąd, że przeżywalność neuronów współczulnych i czuciowych zależy od obecności aktywnego NGF. W doświadczeniach drugiego rodzaju postąpiono w sposób odwrotny. Zwiększono pulę NGF w układzie

nerwowym zarodków bądź noworodków gryzoni, podając wysokie dawki egzogenego NGF. Stwierdzono wówczas, że liczba przeżywających neuronów była większa w grupie zwierząt doświadczalnych niż u zwierząt kontrolnych (LEVI-MONTALCINI 1965).

Następne trzy dekady badań wykazały, że w obwodowym układzie nerwowym NGF działa jako substancja sygnałowa pomiędzy komórkami, które go syntetyzują (komórki narządów obwodowych) i komórkami, które nań odpowiadają (neurony zwojów obwodowych). Charakter przekazywanego sygnału zależy od ilości, miejsca i czasu, w którym NGF ulega ekspresji. NGF jest czynnikiem transportowanym z miejsc docelowych projekcji neuronalnej, który zapobiega obumieraniu neuronów oraz wpływa na ich różnicowanie. W naturalnie rozwijającym się układzie nerwowym NGF jest dostępny w ograniczonych ilościach. Rozrastające się zakończenia neuronów obwodowych konkurują ze sobą o dostęp do substancji troficznej. Ta kompetycja jest jednym z elementów mechanizmu regulującego liczbę neuronów w dojrzewającym układzie nerwowym.

Na początku lat osiemdziesiątych wykazano, że NGF wpływa także na rozwój ośrodkowego układu nerwowego (VANTINI i SKAPER 1992). W mózgu populacją neuronów szczególnie wrażliwą na NGF są neurony cholinergiczne, których substancją przekąźnikową jest acetylocholina (ACh). Ciała komórkowe tych neuronów są położone w przedniej części mózgu nazywanej okolicą podstawną przodomózgowia. NGF jest niezbędny do przeżycia i zachowania prawidłowej morfologii tych neuronów nie tylko w czasie rozwoju, ale także w dojrzałym ośrodkowym układzie nerwowym (LONGO i współaut. 1993). NGF, podawany domózgowo, zapobiega zmianom degeneracyjnym neuronów cholinergicznych okolicy podstawnej mózgu po eksperymentalnych uszkodzeniach tych struktur oraz zmianom wywołanym procesem starzenia się (SOFRONIEW i COOPER 1993). Stało się to podstawą domniemywań, że niedobór NGF jest związany z procesami prowadzącymi do chorób neurodegeneracyjnych.

NGF NIE JEST JEDYNĄ SUBSTANCJĄ TROFICZNĄ

Zaobserwowano, że NGF działa specyficznie tylko na niektóre populacje neuronów. Neurony przywspółczulne zwojów ręskowych, neurony ruchowe rogów brzusznych rdzenia kręgowego, neurony czuciowe rozwijające się z plakody ektodermalnej, a także część neuronów czuciowych pochodzących z grzebienia nerwowego nie

jest uzależniona od dostępności NGF. Ta obserwacja stała się motorem poszukiwań innych substancji troficznych, które wspomagają przeżywalność neuronów. Do odkrycia tych substancji (tab. 1) przyczyniło się wprowadzenie do neurobiologii technik biologii molekularnej. Część z nich jest strukturalnie bardzo podobna

Tabela 1. Przykłady substancji o działaniu neurotroficznym

Rodzina	Przedstawiciele
Klasyczne neurotrofiny	czynnik wzrostu nerwów (NGF) czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF) neurotrofina-3 (NT-3) neurotrofina-4/5 (NT-4/5) neurotropina-6 (NT-6)
EGF	epidermalny czynnik wzrostu (EGF) transformujący czynnik wzrostu alfa (TGF- α) czynnik wzrostu wirusa <i>Vaccinia</i> amfiregulina (AR) czynnik wzrostu guza Schwannoma (SDGF)
FGF	kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów (aFGF) zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) interleukina 2 (INT-2)
Insulinopodobne czynniki wzrostu	insulina insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF) somatomedyny relaksyna
Inne	hormon wzrostu (GH) czynnik wzrostu płytek krwi (PDGF) czynnik wzrostu komórek zernych (MGS) czynnik neurotroficzny zwojów rząskowych (CNTF) czynnik dojrzewania gleju neksyna I i II neuronalny czynnik różnicowania cholinergicznego (CDF) czynnik wzrostu pochodzący z mięśni (MDGF) czynnik wzrostu pochodzący z prażkowia transformujący czynnik wzrostu beta (TGF β) związany z błoną czynnik stymulujący neurotransmitter (MANS) trombina entaktyna erytropoetyna czynnik indukujący neuryty interleukina 1, 3, 6 neksyna pochodząca z gleju czynnik neurotroficzny wiążący heparynę
Czynniki adhezji macierzy pozakomórkowej	laminina fibronektyna purpuryna apoliproteiny gangliozydy
Przekazniki informacji	neurotransmittery neuropeptydy hormony steroidowe

do NGF i ma synergistyczne lub uzupełniające z nim działanie. Grupa spokrewnionych z NGF substancji jest określana jako rodzina klasycznych neurotrofin (VANTINI i SKAPER 1992, LEWIN i BARDE 1996). Należą do niej, obok NGF, także czynnik neurotroficzny pochodzący z mózgu (BDNF, ang. brain-derived neurotrophic factor) oraz neurotrofina 3 (NT-3, ang. neurotrophin 3), neurotrofina 4/5 (NT-4/5; nazwa odzwierciedla przypuszczenie, że NT-4 i NT-5 są jedną i tą samą substancją) oraz neurotrofina 6 (NT-6; znaleziona u ryb nie ma, jak dotąd, swojego odpowiednika u ssaków). Ostatnio zidentyfikowano także neurotrofinę 7 — NT-7.

Sekwencjonowanie białka BDNF doprowadziło do jego sklonowania oraz do stwierdzenia, że geny kodujące zarówno BDNF, jak i NGF są

ze sobą blisko spokrewnione. Badania wykazały, że wiele populacji neuronów w ośrodkowym układzie nerwowym jest wrażliwych na BDNF, włączając w to neurony leżące w strukturach związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi, na przykład neurony cholinergiczne przegrody i neurony dopaminergiczne istoty czarnej mózgu oraz neurony ruchowe rdzenia kręgowego.

Molekularne klonowanie BDNF w celu zwiększenia ilości tego białka, które w mózgu występuje w bardzo małych stężeniach, spowodowało odkrycie trzeciego członka rodziny neurotrofin, neurotrofiny 3 (NT-3). NT-3 wywiera działanie troficzne na neurony zwojów współczulnych i neurony zwojów dolnych nerwu błędnego w obwodowym układzie nerwowym oraz na neurony cholinergiczne okolicy podstawnej, neuro-

ny noradrenergiczne miejsca sinawego i neuro-ny glutaminianergiczne hipokampa w mózgu.

Badania nad wpływem neurotrofin na namnażanie się, różnicowanie i przeżywalność neuronów lub ich komórek prekursorowych wykazują, że każda z neurotrofin wywiera nieco inne działanie na tę samą populację neuronów (LOUGHLIN i FALLON 1993). Różnicowanie komórek prekursorowych kory mózgu zależy od obecności NT-3, podczas gdy BDNF wpływa na przeżywalność tych komórek. Podobnie w mózdku, BDNF promuje głównie przeżywanie komórek prekursorowych neuronów ziarnistych oraz wydłużanie się wyrastających neurytów, natomiast NT-3 ułatwia skupianie się neurytów w pęczki i tworzenie włókien nerwowych. NT-3, w przeciwieństwie do NGF i BDNF, nie jest czynnikiem troficznym istotnym dla przeżywalności neuronów. W ontogenezie ma ona większe znaczenie dla rozwijającego się, niż dla dojrzałego układu nerwowego. Jej poziom w mózgu noworodków myszy i szczurów jest bardzo wysoki, po czym spada w miarę dojrzewania organizmu. Natomiast poziom NGF i BDNF w mózgu jest równie wysoki w okresie postnatalnym, jak i u dorosłych zwierząt.

Klasyczna definicja mówi, że neurotrofiną nazywamy substancję (czynnik) specyficzną wobec określonej puli neuronów, wspomagającą ich przeżywalność, występującą w ograniczonych ilościach w miejscach docelowych projekcji wrażliwych nań neuronów, łączącą się ze specyficznymi receptorami i przenoszona wstecznym transportem aksonalnym do ciała neuronów, gdzie wywiera swoje działanie. Definicja

ta uległa ewolucji, gdy okazało się, że NGF, prototypowa substancja troficzna, wywiera działanie również na komórki nieneuronalne i jest syntetyzowana nie tylko w miejscach docelowych projekcji (LEVI-MONTALCINI i współaut. 1996, WATKINS 1995). Poza układem nerwowym neurotrofiny są substancjami sygnałowymi w układzie hormonalnym i odpornościowym. Ponadto niektóre neurotrofiny mogą być wydzielane i przenoszone w sposób autokryny (działanie na te same komórki, przez które są wydzielane), parakryny (działanie na komórki sąsiednie) lub holokryny (uwalnianie do przestrzeni międzykomórkowej po degradacji komórki syntetyzującej neurotrofinę). Neurotrofiny modulują cały szereg różnorodnych reakcji w układzie nerwowym, takich jak namnażanie się, różnicowanie i przeżywanie neuroblastów w czasie rozwoju, ale także przeżywanie i odpowiedź adaptacyjną dojrzałych neuronów w dorosłym organizmie. Do związanych z różnicowaniem odpowiedzi neuronalnych stymulowanych przez neurotrofiny należy wzmacnianie rozrastania się neurytów (zarówno aksonów jak i dendrytów) oraz określanie fenotypu czynnościowego dojrzewających neuronów, to znaczy decydowanie o tym, jakim neuroprzekaznikiem będzie się posługiwał dany neuron. Warto dodać, że oprócz neurotrofin, także inne czynniki wzrostowe (np. EGF, PDGF, TGF oraz kwaśny i zasadowy FGF) i niektóre cytokiny (np. CNTF, LIF, IL-1, 3 i 6) wpływają na przeżywalność neuronów oraz rozwój i zmiany adaptacyjne w układzie nerwowym.

MECHANIZM DZIAŁANIA NEUROTROFIN

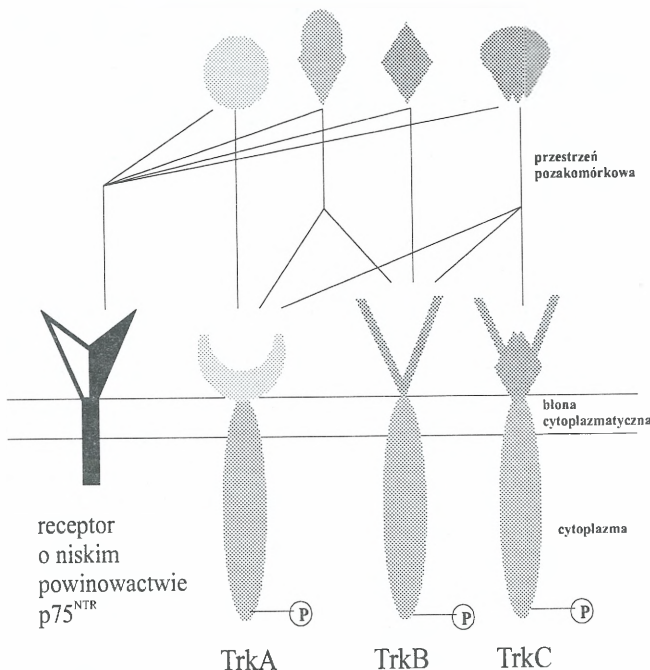
Większość wyników badań nad mechanizmami działania neurotrofin pochodzi z badań *in vitro* na komórkach linii PC12. Te komórki, pochodzące z guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy szczura, są zmienionymi nowotworowo komórkami chromafinowymi. W hodowli *in vitro* dodanie czynników wzrostu, na przykład NGF, powoduje różnicowanie tych komórek tak, że morfologicznie i biochemicznie przypominają one neurony współczulne. Być może znaczenie ma tu fakt, że zarówno komórki chromafinowe, jak i komórki prekursorowe neuronów współczulnych we wczesnym rozwoju zarodkowym wywodzą się z tego samego źródła, to jest z grzebienia nerwowego.

Wykorzystując ten model doświadczalny w połączeniu z badaniami *in vivo* wykazano, że neurotrofiny wywierają swoje działanie poprzez wiązanie się do specyficznych dla nich recepto-

rów (BARBACID 1995). W ten sposób NGF oraz inne znane czynniki troficzne aktywują kaskadę zdarzeń molekularnych związanych z mechanizmami przekazywania sygnału w komórce. Neurotrofiny wiążą się i aktywują specyficzne receptory, będące kinazami tyrozyny, kodowanymi przez protoonkogeny z rodziny *trk*. Receptory Trk charakteryzuje wysokie powinowactwo wiązania neurotrofin. Wszystko wskazuje na to, że właśnie połączenie neurotrofin ze specyficznymi dla nich receptorami Trk jest niezbędne do wywołania ich troficznej aktywności. Jednak fizjologiczny efekt neurotrofin zależy także od współdziałania z receptorem o niskim powinowactwie, tak zwanym receptorem $p75^{NTR}$, który wiąże niespecyficznie wszystkie neurotrofiny. Receptory Trk są bardziej swoiste, i tak receptor Trk A wiąże NGF, receptor Trk B wiąże BDNF i NT-4/5, natomiast receptor Trk

C jest specyficzny dla NT-3, która jednak jest rozpoznawana także przez pozostałe receptory Trk (ryc. 1).

NGF NT-4/5 BDNF NT-3



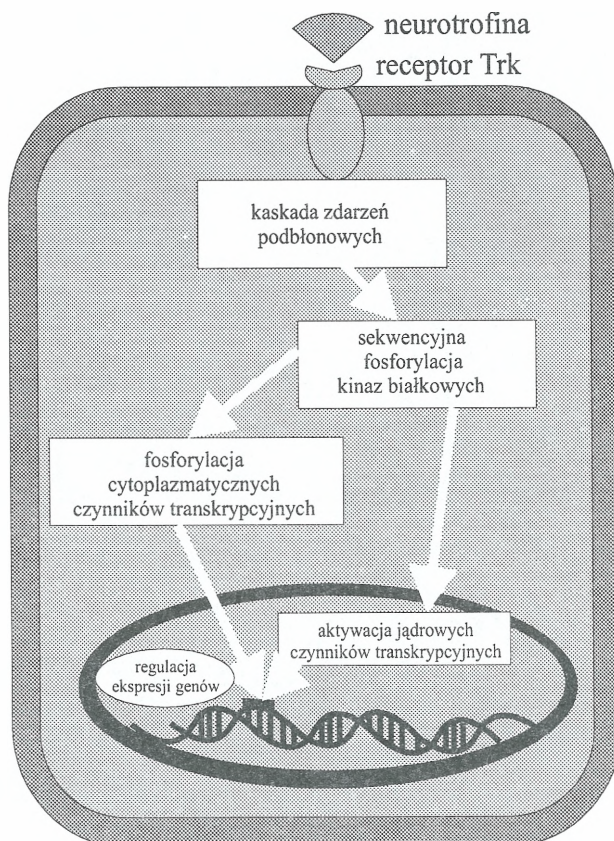
Wszystkie receptory neurotrofin są jednoczynnikowymi białkami zbudowanymi z podjednostek i składają się z trzech domen: zewnątrzkomórkowej, która zawiera miejsca wiązania

ce neurotrofinę, transbłonowej, która kotwiczy receptor w błonie komórkowej i wewnątrzkomórkowej, która jest odpowiedzialna za prze-

Ryc. 1. Schemat przedstawiający dwa podstawowe typy receptorów neurotrofin. Receptory z rodziny kinaz tyrozyny Trk charakteryzuje wysokie powinowactwo oraz specyficzność wiązania z ligandem.

NGF wiąże się z receptorem TrkA, BDNF z TrkB, NT-3 głównie z TrkC, ale także choć słabiej z TrkA i TrkB, NT-4/5 wiąże się z TrkB i słabiej z TrkA. Receptor p75^{NTR} nie wykazuje homologii sekwencji z receptorami Trk i charakteryzuje się niskim powinowactwem wiązania wszystkich substancji z rodziny neurotrofin.

niesienie sygnału. Pobudzenie receptora w wyniku związania neurotrofiny powoduje autofosforylację reszt tyrozynowych zlokalizowanych w części cytoplazmatycznej receptora oraz



Ryc. 2. Schematyczna ilustracja kaskady zdarzeń komórkowych związanych z przekazaniem sygnału po przyłączeniu neurotrofiny do właściwego jej receptora Trk.

Pobudzenie receptora w wyniku związania neurotrofiny powoduje autofosforylację reszt tyrozynowych zlokalizowanych w części cytoplazmatycznej receptora oraz uruchomienie kaskady sekwencyjnej aktywacji kinaz białkowych. Aktywne kinazy fosforylują białka będące wtórnymi przekaznikami sygnału w komórce. Tymi białkami są, między innymi, obecne w cytoplazmie czynniki transkrypcyjne, które aktywowane w wyniku fosforylacji przemieszczają się do jądra komórkowego. Aktywne kinazy białkowe mogą również same przechodzić do jądra i fosforylować obecne tam tak zwane jądrowe czynniki transkrypcyjne. Zarówno cytoplazmatyczne, jak i jądrowe czynniki transkrypcyjne wiążą się z obszarami regulatorowymi genów docelowych i modulują ich ekspresję.

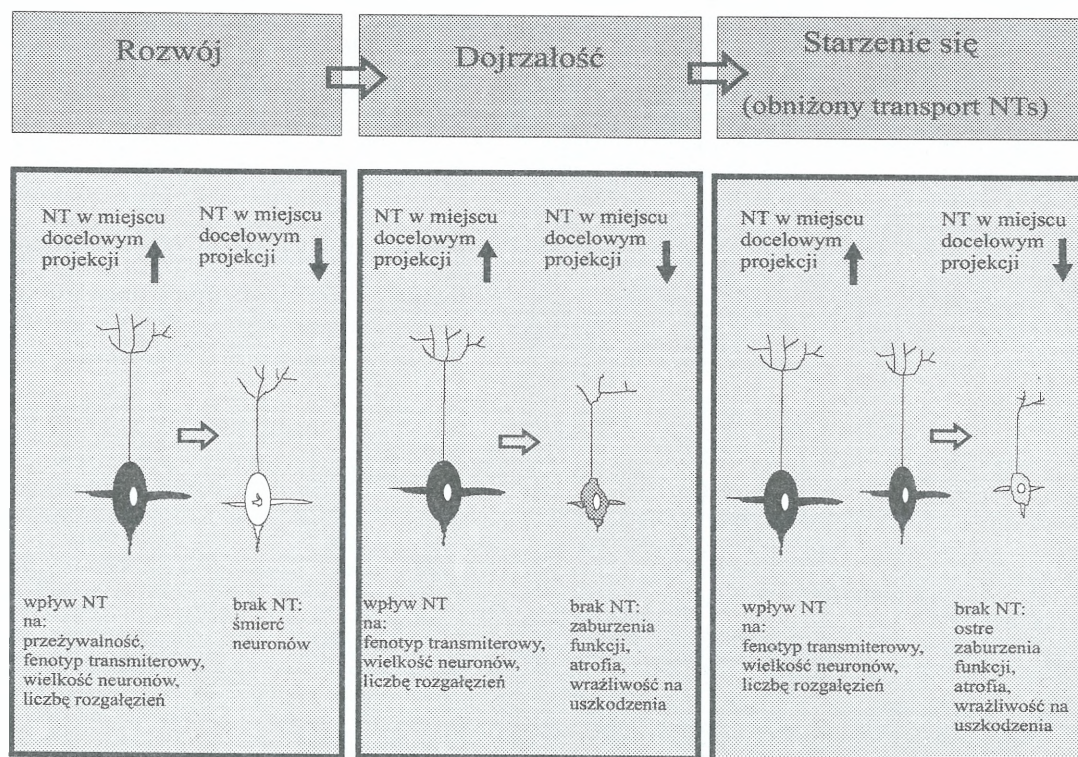
uruchomienie wskutek tego kaskady sekwencyjnie aktywowanych kinaz białkowych. Aktywne kinazy fosforylują białka będące wtórnymi przekaźnikami sygnału w komórce. Tymi białkami są między innymi obecne w cytoplazmie czynniki transkrypcyjne, które aktywowane w wyniku fosforylacji przemieszczają się do jądra komórkowego. Aktywne kinazy białkowe mogą również same przechodzić do jądra i fosforylo-

wać obecne tam tak zwane jądrowe czynniki transkrypcyjne. Zarówno cytoplazmatyczne, jak i jądrowe czynniki transkrypcyjne wiążą się z obszarami regulatorowymi genów docelowych i modulują ich ekspresję. Specyficzność sygnału wywołanego związaniem neurotrofiny z receptorem zależy przypuszczalnie od współdziałania szeregu określonych czynników transkrypcyjnych (SEGAL i GREENBERG 1996; ryc. 2)

ROLA NEUROTROFIN W DOJRZAŁYM UKŁADZIE NERWOWYM

Wiele badań wskazuje na to, że efekty jakie wywierają neurotrofiny w ośrodkowym układzie nerwowym są także różne w zależności od wieku organizmu. Ilustruje to dobrze zmieniająca się wrażliwość neuronów cholinergiczných okolicy podstawnej mózgu na neurotrofiny (SOFRONIEW i COOPER 1993, KOLIATSOS i współaut. 1991); (ryc. 3). W czasie tak zwanego okresu krytycznego w rozwijającym się układzie nerwowym neurotrofiny są niezbędne dla przeżywania neuronów cholinergiczných, przez co regulują ich liczbę. W dojrzałym układzie nerwowym neurotrofiny zapewniają prawidłową morfologię neuronów cholinergiczných oraz utrzymanie ich fenotypu transmitterowego (tzn. syntezy acetylocholiny jako neuroprzekaźnika tych neuronów), nie wydają się natomiast niezbędne do ich przeżywania. Neurotrofiny takie, jak NGF i

BDNF zwiększają ilość enzymu syntetyzującego neuroprzekaźnik ChAT, (acetylotransferaza cholinowa), a także wielkość wrażliwych na nie neuronów oraz rozmiary końcowych rozgałęzień tych neuronów. Wiadomo, że podawanie NGF prowadzi do rozrostu neuronów cholinergiczných zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. U starych zwierząt zmniejszenie liczby receptorów NGF o wysokim powinowactwie w błonie komórkowej neuronów jest powiązane ze zmniejszoną zdolnością neuronów cholinergiczných do pobierania i transportowania NGF, co z kolei prowadzi do atroficznych zmian w tych neuronach. Wydaje się, że w dojrzałym układzie nerwowym istnieje pozytywne sprzężenie zwrotne pomiędzy neuronami cholinergicznymi a neuronami docelowymi ich projekcji w korze i w hipokampie. Pochodzące z miejsc docelowych projekcji



Ryc. 3. W ośrodkowym układzie nerwowym zależność neuronów od substancji neurotroficznych zmienia się wraz z wiekiem organizmu (zmodyfikowane wg SOFRONIEW i COOPER 1993). NT — neurotrofiny.

neurotrofiny regulują funkcje neuronów cholinergiczných. Wzrost aktywności cholinergiczných jest z kolei sygnałem zwrotnym, podnoszącym poziom syntezy neurotrofin w miejscach docelowych projekcji. Wykazano, że poziom NGFmRNA i BDNFmRNA w hipokampie podle-

ga szybkiej regulacji w odpowiedzi na zmiany poziomu neuroprzekaźnika (acetylocholiny) i aktywności dochodzących z okolicy podstawnej połączeń neuronalnych (SOFRONIEW I MOBLEY 1993).

ROLA NEUROTROFIN W CHOROBACH NEURODEGENERACYJNYCH

Neurotrofiny są obecnie przedmiotem bardzo intensywnie rozwijających się badań, które pozwalają wnikać w mechanizmy rozwoju i funkcjonowania układu nerwowego. Wiele wskazuje na to, że neurotrofiny mogą także stać się farmakologicznym narzędziem zarówno w badaniach nad plastycznością niezaburzonego układu nerwowego, jak i w różnych stanach patologicznych tego układu. Również potencjalne terapeutyczne zastosowanie NGF, BDNF i NT-3 w chorobach neurodegeneracyjnych jest przedmiotem rosnącego zainteresowania badaczy i klinicystów.

Odkrycie, że efekty troficzne NGF w mózgu odnoszą się do układu cholinergicznego wywołało nadzieje na skuteczną terapię choroby Alzheimera (HEFTI I WILL 1987). Przypuszcza się, że NGF może zapobiegać bądź kompensować zaburzenia funkcji układu cholinergicznego związane z procesami starzenia się. U różnych gatunków zwierząt oraz u ludzi stwierdzono postępujące z wiekiem osłabienie funkcji układu cholinergicznego. Zmniejszona sprawność układu cholinergicznego ma bardzo silne reperkusje behawioralne. Udowodniono, że zarówno u ludzi, jak i u zwierząt wiąże się ono z zależnym od wieku uszkodzeniem funkcji poznawczych i pamięci. Te informacje są szczególnie interesujące wobec faktu, że degeneracyjne zmiany układu cholinergicznego okolicy podstawnej są charakterystyczną cechą chorób związanych z zaburzeniami pamięci u ludzi, takich jak choroba Alzheimera, forma choroby Parkinsona z pogorszeniem pamięci oraz niektóre demencje typu starczego. W chorobie Alzheimera pogorszenie funkcji poznawczych silnie koreluje z obniżeniem poziomu acetylotransferazy cholinowej w korze, obniżeniem jej syntezy oraz ubytkiem komórek cholinergiczných w jądrze podstawnym Meynerta i piramidalnych komórek immunopozytywnych na acetyloesterazę cholinową (enzym hydrolizujący, rozkładający neuroprzekaźnik i usuwający go ze szczeliny synaptycznej) w III warstwie kory mózgu (KASA i współaut. 1997).

Wyniki badań na modelach zwierzęcych pozwalają sądzić, że neurotrofiny mogą być związane z etiologią chorób demencyjnych. Badania

na starych szczurach wykazały, że podawanie NGF, a także NT-3 i NT-4/5 ma korzystny efekt troficzny na neurony cholinergiczne oraz na zaburzone z wiekiem procesy poznawcze (FISHER i współaut. 1991, MARKOWSKA i współaut. 1994). Podobne wyniki uzyskano u starych małp (TUSZYŃSKI i współaut. 1996a). Zwierzętom podawano do okolicy podstawnej mózgu ¹⁹²IgG-saporynę. Jest to kompleks, w którym neurotoksyna saporyna jest sprzężona z przeciwciałem skierowanym przeciwko receptorom neurotrofin p75. Ponieważ w okolicy podstawnej receptory p75 są obecne tylko na neuronach cholinergiczných podany kompleks bardzo selektywnie uszkadza właśnie te neurony. Jeżeli równocześnie z IgG-saporyną implantowano fibroblasty produkujące NGF, to stwierdzono, że liczba neuronów cholinergiczných uszkodzonych przez neurotoksynę jest mniejsza. Natomiast neurony, które przeżyły były większe i produkowały więcej neuroprzekaźnika (ACh, tj. acetylocholiny) oraz enzymu go syntetyzującego, czyli acetylotransferazy cholinowej (ChAT), niż neurony u małp kontrolnych nie traktowanych NGF. Wzrosła także (w porównaniu z grupą kontrolną) liczba zakończeń cholinergiczných w korze mózgu i w hipokampie (miejscu docelowe projekcji neuronów cholinergiczných). W tym doświadczeniu małpy były trenowane również w testach na uczenie się. Okazało się, że zwierzęta, które otrzymywały NGF i tym samym zachowały większą sprawność układu cholinergicznego uczyły się lepiej. Dokładna analiza wyników pokazała, że większe zdolności poznawcze małp, które otrzymywały NGF wiązały się ze sprawniejszymi mechanizmami uwagi, które są bardzo ważnym nieasocjacyjnym czynnikiem procesu uczenia się.

W chorobie Alzheimera obok deficytu układu cholinergicznego obserwuje się także poważne zaburzenia metabolizmu energetycznego mózgu, szczególnie w polach asocjacyjnych nowej kory. W testach behawioralnych wykazano, że obniżenie aktywności metabolicznej było skorelowane z pogorszeniem zdolności poznawczych. Podawanie starym szczurom NGF lub łączne podawanie NGF i BDNF powodowało u tych zwierząt stymulację utylizacji glukozy

przez komórki kory mózgu oraz poprawę pamięci przestrzennej (HELLWEG 1994).

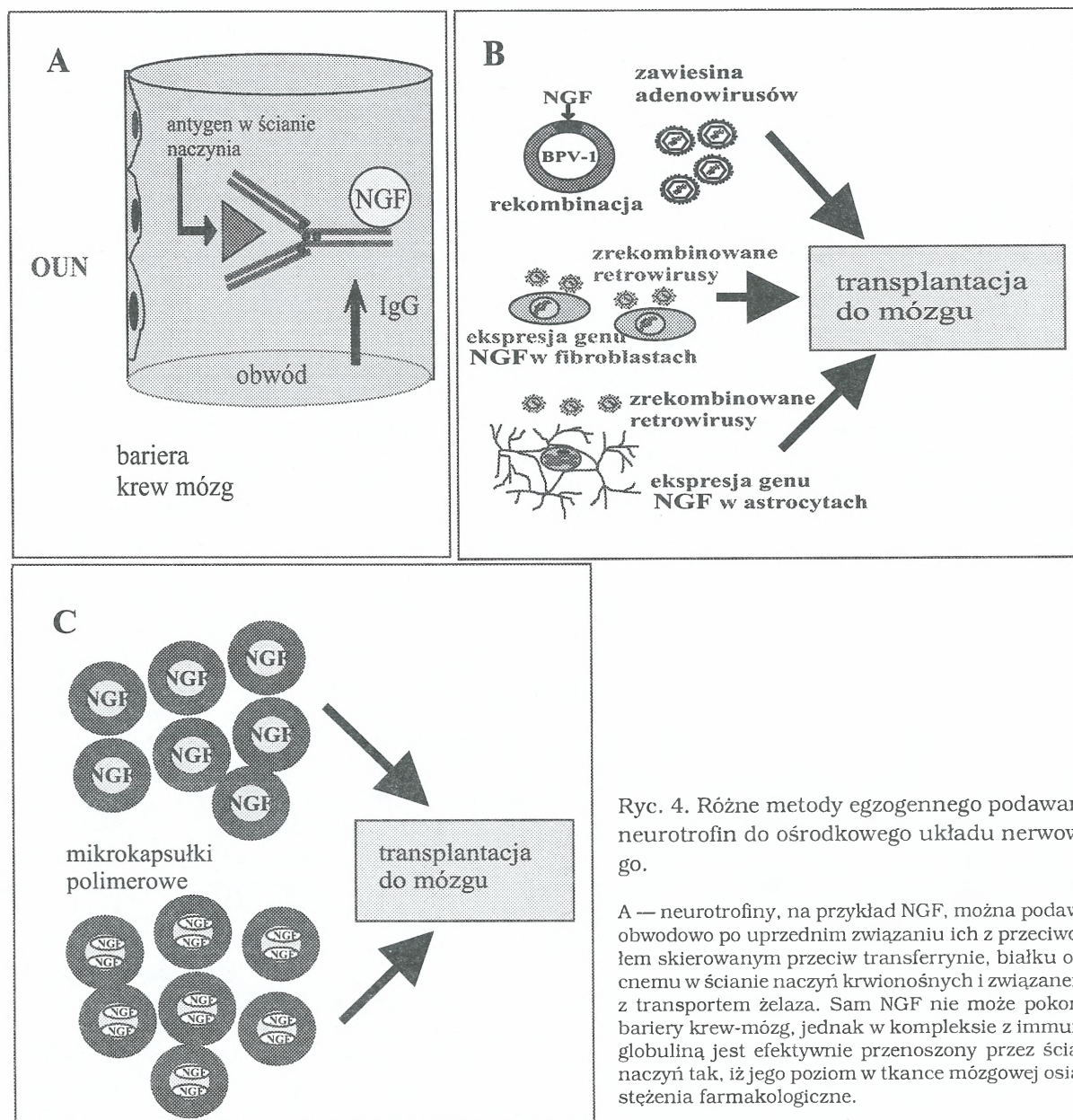
Wyniki uzyskane w modelach zwierzęcych zachęcają do wykorzystania neurotrofin w próbach leczenia pacjentów z chorobą Alzheimera. Zakłada się, że długotrwałe domózgowe podawanie egzogenego NGF mogłoby stanowić element terapii u chorych z chorobą Alzheimera. Opublikowane doniesienia wskazują, że próby

takie są obiecujące, ponieważ uzyskano poprawę stanu klinicznego ocenianego poprzez analizę EEG oraz testy psychomotoryczne. Opisano przypadek zastosowania NGF u pacjentów z chorobą Alzheimera na Uniwersytecie Karolińskim w Szwecji, u których uzyskano korzystne efekty w testach pamięciowych (OLSON i współaut. 1994).

CZY NEUROTROFINY MOGĄ BYĆ LEKIEM W PRÓBACH NAPRAWY USZKODZONEGO UKŁADU NERWOWEGO?

Należy sądzić, że liczba zastosowań klinicznych neurotrofin będzie rosła. Wiąże się to nie tylko z przekonaniem, że neurotrofiny mogą łagodzić zmiany neurodegeneracyjne oraz

wspomagać procesy naprawy, ale także z udogodnieniem sposobu podawania neurotrofin do mózgu (ryc. 4). Dotychczas przeszkodą w zastosowaniu klinicznym był fakt, że na przykład



Ryc. 4. Różne metody egzogenego podawania neurotrofin do ośrodkowego układu nerwowego.

A — neurotrofiny, na przykład NGF, można podawać obwodowo po uprzednim związaniu ich z przeciwciałem skierowanym przeciw transferrynie, białku obecnemu w ścianie naczyń krwionośnych i związanemu z transportem żelaza. Sam NGF nie może pokonać bariery krew-mózg, jednak w kompleksie z immunoglobuliną jest efektywnie przenoszony przez ściany naczyń tak, iż jego poziom w tkance mózgowej osiąga stężenia farmakologiczne.

NGF nie przenika przez barierę między krwią a mózgiem. Ostatnio jednak udało się połączyć NGF z przeciwciałem, które łącząc się z białkami w ścianie naczyń krwionośnych potrafi go przemieścić przez barierę krew- mózg (ryc. 4A). Drugą, jeszcze dogodniejszą drogą wydaje się użycie metod transplantacyjnych w połączeniu z technikami inżynierii genetycznej (ryc. 4B). Komórki fibroblastów lub astrocytów, którym za pomocą wirusowego nośnika włączono w DNA gen kodujący NGF są zdolne do jego efektywnej syntezy. Po transplantacji zawiesiny tak zmodyfikowanych fibroblastów do mózgu starych szczurów stwierdzono wzrost poziomu NGF w okolicy podstawnej, a także korzystne zmiany morfologii neuronów cholinergicznym oraz poprawę zdolności uczenia się w testach behawioralnych (CHEN i GAGE 1995). Podobny efekt otrzymano podając starym szczurom zamiast fibroblastów zawiesinę zrekombinowanych adenowirusów zdolnych do ekspresji wbudowanego w ich genom genu kodującego NGF (CASTEL-BARTHE i współaut. 1996). Jeszcze innym sposobem egzogenego podawania neurotrofin jest wykorzystanie tak zwanych polimerowych mikrokapsulek (ryc. 4C). Zbudowane są one z obojętnego dla organizmu polimeru, który tworzy otoczkę kapsułki. W jej wnętrzu zamknięte są, bądź bezpośrednio substancje neurotroficzne, bądź na przykład fibroblasty zdolne do syntezy którejś z neurotrofin. Kapsułki mają bardzo małe rozmiary (średnica rzędu kilkunastu mikrometrów), mogą migrować w tkance, a zawarte w nich substancje troficzne wydostają się przez pory w tworzącym ich powierzchnię polimerze. Zaletą tej metody jest możliwość wprowadzenia do organizmu fibroblastów nieswoistych gatunkowo bez obawy wywołania odpowiedzi odpornościowej.

Oto kilka przykładów wykorzystania neurotrofin oraz nowych sposobów ich podawania do mózgu w próbach naprawy uszkodzonego układu nerwowego. Starym małpom przecięto chirurgicznie połączenie neuronalne pomiędzy przegrodą mózgu a hipokampem (KORDOWER i

współaut. 1994). Poprzez włókna strzępkowo-sklepieniowe neurony cholinergiczne przegrody wysyłają projekcję do hipokampa. Po przerwaniu tego połączenia neurony przegrody degenerują wskutek braku NGF, którego źródłem jest tkanka docelowa ich projekcji, czyli hipokamp. Jeżeli w krótkim czasie po operacji zaimplantowano małpom kapsułki zawierające fibroblasty chomika syntetyzujące NGF, to stwierdzono, że transplanty chronią neurony cholinergiczne przegrody przed degeneracją. Ponadto, w kilkanaście dni po zabiegu neurony przegrody zaczynają odtwarzać połączenia aksonalne, obserwowano bowiem rozrost neurytów w kierunku transplantu. W podobnych doświadczeniach u szczurów stwierdzono, że odrastające neuryty, które identyfikowano immunohistochemicznie znakując przeciwciałami białka neurofilamentów i receptor $p75^{NTR}$, przebijają bliznę utworzoną z astrocytów i po czterech tygodniach odtwarzają gęstą sieć włókien unerwiających hipokamp. Behawioralnie u zwierząt otrzymujących NGF wystąpiła znaczna poprawa pamięci przestrzennej.

Neurotrofiny mogą być także potencjalnym lekiem w przypadku uszkodzenia układu ruchowego, związanego z urazami rdzenia kręgowego. W zwierzęcym modelu doświadczalnym szczurom po przecięciu rdzenia kręgowego implantowano przeszczepy z fibroblastów zdolnych do produkcji NGF (TUSZYŃSKI i współaut. 1996a). Takie przeszczepy przeżywały około roku. Syntetyzowany przez nie NGF powodował duży rozrost neurytów neuronów czuciowych zwojów korzeni grzbietowych rdzenia. Pod wpływem NGF komórki glejowe w uporządkowany sposób tworzyły szlaki ukierunkowujące rozrost neurytów. Odtwarzała się także osłonka mielinowa na wyrastających neurytach. Są to bardzo znaczące wyniki, które pokazują, że dojrzałe neurony czuciowe zachowują wrażliwość na NGF i mogą podjąć skuteczne procesy naprawy uszkodzeń. Podobne, wstępne wyniki uzyskano u ludzi (WANG i współaut. 1996). W materiale autopsyjnym pochodzącym od pa-

Ciąg dalszy podpisu pod rysunkiem 4.

B — wykorzystanie metod transplantacyjnych z zastosowaniem technik inżynierii genetycznej do podawania neurotrofin. Zmodyfikowane adenowirusy są wektorem przenoszącym w swoim genomie gen kodujący NGF. Po implantacji do mózgu inicjują replikację własnego DNA, na matrycy którego są syntetyzowane zakodowane w nim białka, w tym także NGF. Wśród wektorów eukariotycznych wektory wywodzące się z retrowirusów są szczególnie użyteczne, gdyż ich zaletą jest bardzo wysoka wydajność transfekcji. Zrekombinowane retrowirusy, zawierające gen kodujący NGF służą do transfekcji astrocytarnych komórek glejowych lub fibroblastów. Po sprawdzeniu, że tak zmodyfikowane komórki produkują NGF używa się ich jako transplantów do mózgu, gdzie są źródłem substancji troficznej. C — egzogenym źródłem substancji neurotroficznej mogą być także polimerowe mikrokapsułki, zawierające neurotrofinę (na lewo u góry) lub też zmodyfikowane genetycznie komórki, np. fibroblasty zdolne do syntezy NGF (na lewo u dołu). Zawiesinę mikrokapsulek implantuje się do wybranych okolic ośrodkowego układu nerwowego. Parametry porów w ścianie kapsulek są tak dobrane, że neurotrofiny mogą być uwalniane w stałym tempie przez dłuższy okres czasu. BPV-1 — (Rinder papilloma virus) wirus brodawczaka krów należący do rodziny adenowirusów; IgG — immunoglobulina typu G; NGF — czynnik wzrostu nerwów; OUN — ośrodkowy układ nerwowy.

cientów z urazami rdzenia kręgowego stwierdzono, że pod wpływem NGF (źródłem były zrekombinowane fibroblasty) wzrosła znacznie liczba regenerujących aksonów. Zwiększyła się także liczba aktywnych komórek Schwanna oraz ilość syntetyzowanej przez nie mieliny. W błonie komórek Schwanna obserwowano silną propagację receptorów TrkA^{NGF} . Przypuszcza się, że w tym przypadku troficzne działanie NGF jest przenoszone przez komórki Schwanna, które indukują kolejne etapy procesu naprawy.

Jeszcze jedna, równie fascynująca możliwość zastosowania neurotrofin pojawiła się u pacjentów z uszkodzeniami w układzie słuchowym (KOPKE i współaut. 1996, STEACKER i

współaut. 1996). Po uszkodzeniach ucha wewnętrznego w następstwie urazu zniszczone komórki włosowe przestają być źródłem neurotrofin, to jest NT-3 i BDNF dla neuronów słuchowych na wyższych piętrach układu słuchowego. Pozbawione troficznej osłony neurony słuchowe degenerują. Przeszczepienie pacjentom w miejscu uszkodzenia fibroblastów syntetyzujących obie neurotrofiny zapobiegało obumieraniu neuronów słuchowych. Jeżeli przeszczep implantowano z pewnym odroczeniem od chwili uszkodzenia promował on procesy naprawy podejmowane przez ocalałe w układzie słuchowym neurony.

PODSUMOWANIE

Neurotrofiny w ciągu kilkudziesięciu lat badań ich przebyły drogę od jadu — jad żmiji był źródłem pierwszej odkrytej substancji tego typu, do leku — nie wykluczone, że już za kilka lat niektóre z nich będą podawane pacjentom. W ciągu tego czasu przyzwyczailiśmy się traktować NGF jako substancję chroniącą komórki w okresie naturalnie przejawiającego się ich masowego wymierania w czasie rozwoju. Jednak w badaniach nad NGF pojawiają się ciągle nowe zaskakujące odkrycia. Jednym z nich są dane dotyczące roli receptora o niskim powinowactwie, p75^{NTR} . W wyniku tych badań udowodniono, że w okresie rozwoju neurony czuciowe, komórki zwojowe siatkówki oraz oligodendrocyty (typ komórek glijowych wytwarzających mielinę) u szczura wymierają masowo po podaniu NGF. Tempo wymierania neuronów czuciowych, bardzo wrażliwych na brak NGF, zmniejsza się jeżeli obniży się poziom receptorów p75^{NTR} (BARRETT i BARRLETT 1994). Śmierć komórek zwojowych siatkówki u ptaków występuje rzadziej, jeżeli w tak zwanym okresie krytycznym podaje się przeciwciała skierowane przeciw NGF i tym samym blokuje się wiązanie neurotrofiny do receptora p75^{NTR} (FRADE i współaut. 1996). W odpowiedzi na podanie NGF oligodendrocyty, które przejawiają ekspresję receptora p75^{NTR} ulegają częściej śmierci wskutek apoptozy niż w teście kontrolnym (CASACCIA-BONNEFIL i współaut. 1996). Efekt ten można osłabić podając przeciwciała skierowane przeciw receptorom p75^{NTR} .

Okazało się, że w odpowiedzi na NGF receptor p75^{NTR} może przekazywać sygnały wewnątrzkomórkowe niezależnie od swoich partnerów, receptorów z rodziny Trk (CARTER i LEWIN 1997). Po związaniu z NGF przekazuje on

sygnał poprzez swoją krótką domenę wewnątrzkomórkową aktywując drogę z udziałem ceramidu, uznawanego obecnie za wtórny przekaznik II-go rzędu. Ceramid jest substancją indukującą programowaną śmierć komórek. Fragment wewnątrzkomórkowej domeny receptora p75^{NTR} , przekazujący sygnał do śmierci komórki nazwano w związku z tym domeną śmierci. Wiele wskazuje na to, że NGF wyzwała samobójczą śmierć tylko tych komórek układu nerwowego, w których brak ekspresji receptorów TrkA. Sugeruje się, że obecność receptorów TrkA hamuje syntezę ceramidu i blokuje sygnały uruchamiające proces apoptozy przekazywane poprzez receptor p75^{NTR} . Z najnowszych badań wynika, że sam receptor p75^{NTR} , a właściwie jego domena wewnątrzkomórkowa ICD (ang. intracellular domain) może być konstytutywnym aktywatorem apoptozy w komórkach i w sposób autonomiczny, niezależnie od obecności NGF i receptorów Trk, uruchamiać kaskadę przekazywania sygnałów w komórce (MAJDAN i współaut. 1997).

W badaniach nad wykorzystaniem substancji troficznych możemy spodziewać się jeszcze wielu nieoczekiwanych odkryć. Bardzo dużo wysiłku wymagać będzie wyjaśnienie mechanizmów ich działania. Ten wysiłek zapewne się opłaci, gdyż bardzo realna wydaje się możliwość wykorzystania czynników neurotroficznych w postępowaniu klinicznym. Można spodziewać się ich terapeutycznego działania w różnych stanach patologii rozwojowej, w czasie regeneracji uszkodzonego układu nerwowego, w zapobieganiu lub łagodzeniu skutków niektórych chorób neurodegeneracyjnych oraz w poprawie pogarszającej się z wiekiem sprawności układu nerwowego.

NEUROTROPHINS — A TOOL IN ATTEMPTS AT THE REPAIR OF DAMAGED NERVOUS SYSTEM

Summary

Trophic factors include those substances that affect cell differentiation, survival, phenotypic expression, and plasticity, as well as evoke cell hypertrophy. Neurotrophic factors are a subset of growth factors that acts on neuronal tissue both in central and peripheral nervous system. Nerve growth factor (NGF) was the first neurotrophic substance to be identified, isolated, and characterized. NGF acts as a signal between the cell that produces it and the cell that responds. Many recent studies on the distribution of NGF and its receptors help to elucidate the role of NGF in preventing death and controlling differentiation of neurons in the developing nervous system, and the action of NGF on the maintenance and regeneration of neurons in the mature nervous system. NGF is a member of a class of substances which has been termed the neurotrophins family. This family of NGF-related trophic factors includes also brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), neurotrophin-4/5 (NT-4/5), and neurotrophin-6 (NT-6). All neurotrophins activate a cascade of events known to be involved in intracellular signaling. The neurotrophins bind to and activate specific membrane receptors, tyrosine kinases of Trk family. The Trk proteins appear to be important in high affinity neurotrophin binding but may require the presence of the low-affinity neurotrophin receptor, $p75^{NTR}$.

The signal transduction mechanisms carrying information from cell membrane to the nucleus are becoming well characterized. A natural extension of the neurotrophic hypothesis is to suggest that disturbances in neurotrophic mechanisms may cause, or contribute to, neurodegenerative changes associated with aging or diseases. Basal forebrain cholinergic neurons, particularly dependent on NGF trophic support, provide a useful model system to investigate this possibility. The age-related reduction in NGF accessibility probably contributes to the pronounced vulnerability of cholinergic neurons to degeneration during aging and in Alzheimers disease. The behavioral impairments, which are associated with marked atrophic changes in the basal forebrain cholinergic system can be ameliorated by infusion of NGF in rats, primates, and humans. An increasing number of reports suggest that also other neurotrophins can protect neurons from cell death caused by a physical or chemical injury when administered in pharmacological doses. Currently, many different procedures of neurotrophins delivery to the relevant neuronal populations in the brain are being developed. A major inference from all these experiments is the possibility that pharmacological supplementation of a lost or deficient trophic activity might be of therapeutic benefit.

LITERATURA

- BARBACID M. 1995. *Neurotrophins and their receptors*. Curr. Opin. Cell Biol. 7, 148–152.
- BARRETT G. L., BARRLETT P. F. 1994. *The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6501–6505.
- CARTER B. D., LEWIN G. R. 1997. *Neurotrophins live or let die: Does p75^{NTR} decide?* Neuron 18, 187–190.
- CASACCIA-BONNEFIL P., CARTER B. D., DOBROWSKY R. T., CHAO M. V., 1996. *Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75*. Nature 383, 716–719.
- CHEN K. S., GAGE F. H. 1995. *Somatic gene transfer of NGF to the aged brain: behavioral and morphological amelioration*. J. Neurosci. 15, 2819–2825.
- CUELLO A. C. 1997. *Experimental neurotrophic factor therapy leads to cortical synaptic remodeling*. J. Psychiatry Neurosci. 22, 46–55.
- FISCHER W., BJORKLUND A., CHEN K., GAGE F. H. 1991. *NGF improves spatial memory in aged rodent as a function of age*. J. Neurosci. 11, 1889–1906.
- FRADE J. M., RODRIGUEZ-TEBAR A., BRADE Y-A. 1996. *Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor*. Nature 385, 166–168.
- HEFTI F., WILL B. 1987. *Nerve growth factor is a neurotrophic factor for forebrain cholinergic neurons: Implications for Alzheimers disease*. J. Neural Transm. (Suppl.) 24, 309–315.
- HELLWEG R. 1994. *Trophic factors during brain ageing and after functional damage*. J. Neural Transm. 44, 209–217.
- KASA P., RAKONCZAY Z., GULYA K. 1997. *The cholinergic system in Alzheimers disease*. Progress Neurobiol. 52, 511–535.
- KOLIATOS V. E., CLATTERBUCK R. E., NAUTA W. H. J., KNUSELL B., BURTON L. E., HEFTI F., PRICE B. L. 1991. *Recombinant human nerve growth factor prevents degeneration of basal forebrain cholinergic neurons in primates*. Ann. Neurol. 30, 831–840.
- KOPKE R., STAECKER H., LEFEBRE P., MALGRANGE G., RUBEN R. J. 1996. *Effect of neurotrophic factor on the inner ear: clinical implications*. Acta Otolaryng. 116, 248–252.
- KORDOWER J. H., WINN S. R., LIN Y. T., MUFSON E. J., SLADEK J. R., HAMMANG J. P., BAETGE E. E., EMERICH D. F. 1994. *The aged monkey basal forebrain: rescue and sprouting of axotomized basal forebrain neurons after grafts of encapsulated cells secreting human nerve growth factor*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 10898–10902.
- LEVI-MONTALCINI R. 1965. *Growth regulation of sympathetic nerve cells*. Arch. Ital. Biol. 103, 832–846.
- LEVI-MONTALCINI R., BOOKER B. 1960. *Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an anti-serum to a nerve growth protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 46, 384–391.
- LEVI-MONTALCINI R., HAMBURGER V. 1953. *A diffuseable agent of mouse sarcoma producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo*. J. Exp. Zool. 123, 233–287.
- LEVI-MONTALCINI R., SKAPER S. D., DAL TOSO R., PETRELLI L., LEON A. 1996. *Nerve growth factor: from neurotrophins to neurokine*. Trends Neurosci. 19, 514–520.
- LEWIN G. R., BARDE Y-A. 1996. *Physiology of the neurotrophins*. Annu. Rev. Neurosci. 19, 289–317.
- LONGO F. M., HATZMAN D. M., GRIMES M. L., MOBLEY W. C. 1993. *Nerve growth factor action in the peripheral and central nervous system*. [W:] *Neurotrophic factors*. LOUGHLIN S. E., FALLON J. W., (red.). Academic Press, Inc., pp. 209–256.
- LOUGHLIN S. E., FALLON J. H. 1993. *Neurotrophic factors*. Academic Press, Inc., New York
- MAJDAN M., LACHANCE C., GLOSTER A., ALOYZ R., ZEINDLER C., BAMJI S., BHAKAR A., BELLIVEAU D., FAWCETT J., MILLER F. D., BARKER P. 1997. *Transgenic mice expressing the intracellular domain of the p75 neurotrophin receptor*

- undergo neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 15, 6988–6998.
- MARKOWSKA A. L., KOLIATSOS V., PRICE D., OLTON D. S. 1994. Behavioral effects of nerve growth factor (NGF) in young and aged rats. *J. Neurosci.* 14, 4815–4824.
- OLSON L., BACKMAN L., EBENDAL T., ERIKSDOTTER-JONHAGEN M., HOFFER B., HUMPEL C., FREEDMAN R., GIACOBINI M., MEYERSON B., NORDBERG A. 1994 Role of growth factors in degeneration and regeneration in the central nervous system; clinical experiences with NGF in Parkinsons and Alzheimers disease. *J. Neurol.* 242, Suppl 1, S12–S15.
- SEGAL R. A., GREENBERG M. E. 1996. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 463–489.
- SOFRONIEW M. V., COOPER J. D. 1993. Neurotrophic mechanisms and neuronal degeneration. *Semin. Neurosci.* 5, 285–294.
- SOFRONIEW M. V., MOBLEY W. C. 1993. On the possibility of positive-feedback in trophic integrations between afferent and target neurons. *Semin. Neurosci.* 5, 309–312.
- STEACKER H., GALINOVIC-SCHWARTZ V., LIN W., LEFEBRE P., KOPKE R., MALGRANGE B., VAN-DE-WALTER T. R. 1996. The role of the neurotrophins in maturation and maintenance of postulated auditory innervation. *Am. J. Otol.* 17, 486–492.
- TUSZYŃSKI M. H., GABRIEL K., GAGE F. M., SUHR S., MEYER S., ROSETTI A. 1996. Nerve growth factor delivery by gene transfer induces differential outgrowth of sensory, motor, and noradrenergic neurites after adult spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 137, 157–173.
- TUSZYŃSKI M. H., ROBERTS J., SORSUT M. S., U H. S., GAGE F. M. 1996a. Gene therapy in the adult primate brain: intraparenchymal grafts of cells genetically modified to produce nerve growth factor prevent cholinergic neuronal degeneration. *Gene Ther.* 3, 305–314.
- VANTINI G., SKAPER S. D., 1992. Neurotrophic factors: from physiology to pharmacology. *Pharmacol. Res.* 26, 1–15.
- WANG Z. H., WALTER G. F., GERHARD L. 1996. The expression of nerve growth factor receptors on Schwann cells and the effect of these cells on the regeneration of axons in traumatically injured human spinal cord. *Acta Neuropathol.* 91, 180–184.
- WATKINS A. D. 1995. Perception, emotions and immunity, an integrated homeostatic network. *Q. J. Med.* 88, 283–294.