

© Коллектив авторов, 2017
УДК

Стамбольский Д.В.¹, Плеханова О.С.¹, Юдина И.Ю.⁷, Калинина Н.И.¹,
Карагяур М.Н.², Дубров В.Э.¹, Кочиш А.Ю.³, Семина Е.В.^{1,4}, Акопян Ж.А.^{1,2},
Голубев И.О.⁵, Антонов А.В.⁶, Сафин Ш.М.⁶, Ткачук В.А.^{1,2}

Система мозгового нейротрофического фактора (BDNF) как мишень для создания лекарственных средств, восстанавливающих иннервацию

¹ Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия

² Медицинский научно-образовательный центр Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия

³ Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена, г. Санкт-Петербург, Россия

⁴ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава России, г. Москва, Россия

⁵ Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, Москва, Россия

⁶ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Республиканская клиническая больница им. Г.Г. Куватова, г. Уфа, Башкортостан

⁷ Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова ИПО

Мозговой нейротрофический фактор (BDNF) является одним из основных нейротрофических факторов, участвующих в поддержании функционирования и регенерации нервной системы. В последние годы BDNF рассматривают как многообещающую терапевтическую мишень, на основании с полученных данных о том, что BDNF улучшает регенерацию нейронов. **Цель** обзора — суммировать данные об экспрессии BDNF, его сигнализации, эффектах и механизмах стимуляции реиннервации. Анализ исследований последних десятилетий позволяет сделать заключение о целесообразности и перспективности разработок, направленных на создание лекарственных препаратов на основе BDNF для регенерации компонентов нервной системы.

Ключевые слова: мозговой нейротрофический фактор; иннервация; регенерация нервов.

Для цитирования: Стамбольский Д.В., Плеханова О.С., Юдина И.Ю., Калинина Н.И., Дубров В.Э., Кочиш А.Ю., Семина Е.В., Акопян Ж.А., Голубев И.О., Антонов А.В., Сафин Ш.М., Ткачук В.А. Система мозгового нейротрофического фактора (BDNF) как мишень для создания лекарственных средств, восстанавливающих иннервацию. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(4): —. DOI

Для корреспонденции: Стамбольский Дмитрий Викторович, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, e-mail: dstambolsky@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №14-24-00086) с использованием оборудования, приобретенного за счёт средств Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.05.2017

Stambolsky D.V.¹, Plekhanova O.S.¹, Yudina I.Yu.⁷, Kalinina N.I.¹,
Karagyaour M.N.², Dubrov V.E.¹, Kochish A.Yu.³, Semina E.V.^{1,4}, Akopyan Zh.A.^{1,2},
Golubev I.O.⁵, Antonov A.V.⁶, Safin Sh.M.⁶, Tkachuk V.A.^{1,2}

The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) system as a therapeutical target for development of drugs restoring innervation

¹ Department of Basic Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Medical Research and Education Center of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ P.P. Vreden Russian Research Institute of Traumatology and Orthopedics, St. Petersburg, Russia

⁴ Russian Cardiology Research Center, Moscow, Russia

⁵ N.N. Priorov Central Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Moscow, Russia

⁶ G.G. Kuvatov Bashkortostan Republican Clinical Hospital, Ufa, Bashkortostan

⁷ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a major neurotrophic factor maintaining the nervous system function and regeneration. Based on reports indicating that BDNF enhances neuronal regeneration, in recent years, BDNF has been considered a promising therapeutic target. The **aim** of this review was to summarize current data on BDNF expression, sig-

наging, and mechanisms for stimulation of reinnervation. **Conclusion.** Recent studies of the role of BDNF showed that continuation of research and development of BDNF-based drugs stimulating regeneration of nervous system components is advisable and promising.

Keywords: brain-derived neurotrophic factor, innervation, nerve regeneration.

For citation: Stambolsky D.V., Plekhanova O.S., Yudina I.Yu., Kalinina N.I., Dubrov V.E., Kochish A.Yu., Semina E.V., Akopyan Zh.A., Golubev I.O., Antonov A.V., Safin Sh.M., Tkachuk V.A. The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) system as a therapeutic target for development of drugs restoring innervation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(4): —. DOI:

For correspondence: Dmitry V. Stambolsky, PhD., Leading Researcher, Faculty of medicine, Lomonosov Moscow State University, e-mail: dstambolsky@gmail.com

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. Source of funding: Grant of the Russian Science Foundation (No. 14-24-00086). The authors acknowledge that the work was carried out using equipment purchased with the funding from the Program of Development of M.V. Lomonosov Moscow State University.

Received 29.05.2017

Введение

Увеличение продолжительности жизни человека ставит перед обществом задачу обеспечения активного долголетия. В связи с этим, длительное поддержание функциональной активности и разработка способов восстановления нервной системы становятся все более актуальными. В мире все больше средств вкладывается в исследования и разработки в области когнитивных и нейронаук. Актуальными задачами признаются исследования лежащих в основе функционирования нервной системы механизмов обновления и регенерации нервной системы, а также исследования молекулярных механизмов, лежащих в основе обеспечения когнитивных функций.

Наш коллектив более 20 лет занимается исследованиями в области регенеративной медицины. Одним из направлений этих исследований является исследование молекулярных механизмов регенеративной активности мезенхимальных стромальных клеток (МСК) на посттравматическую реиннервацию. В ходе этих исследований нами было показано, что регенеративная активность клеточных препаратов определяется секретлируемыми факторами роста и нейротрофинами, стимулирующими рост нейритов и кровеносных сосудов и обеспечивающих выживание нейронов.

Результатом наших исследований стало создание геннотерапевтических препаратов, обеспечивающих длительную локальную продукцию белковых молекул, воспроизводящих регенераторную активность МСК. Среди ряда других молекул, стимулирующих реиннервацию, нами был выбран мозговой нейротрофический фактор (BDNF — brain-derived neurotrophic factor). Этот фактор был выбран потому, что он является одним из основных нейротрофических факторов, участвующих в поддержании и регенерации нервной системы. Он не только обеспечивает морфо-

генез и стимулирует регенерацию центральной и периферической нервной системы, но и обеспечивает выживание нейронов, временно лишенных морфофункциональных связей с иннервируемыми органами или тканями. Он стимулирует выживание и восстановление как двигательных, так и некоторых чувствительных нейронов после травмы [1].

Экспрессия BDNF

BDNF наряду с фактором роста нервов (NGF) и нейротрофинами (NT-3, NT-4, NT 4/5 и NT-6) относится к семейству нейротрофинов млекопитающих [2, 3]. BDNF активно экспрессируется в развивающемся и взрослом мозге млекопитающих, в телах нейронов, дендритах, а также микроглии и эндотелиальных клетках церебральных артериол [4]. На периферии он экспрессируется эндотелием сосудов, в нервномышечных синапсах, мышцах и печени [5].

BDNF был впервые описан в 1987 г как белок с молекулярной массой 13 кДа [6]. BDNF синтезируется в виде пробелка массой 32 кДа, состоящего из 247 аминокислот [7], и подвергается расщеплению внеклеточными протеазами такими, как плазмин и металлопротеиназы [8, 9]. Доказана роль урокиназной системы в протеолитической активации BDNF и ряда других нейротрофических факторов [10]. Зрелая форма BDNF (14 kDa) высвобождается нейронами механизмами как постоянной, так и активируемой секреции [7]. Методами иммунопреципитации было показано существование другой минорной про-формы BDNF — 28 kDa [11]. Пробелки для достижения биологической активности подвергаются посттрансляционной модификации. Зрелая форма BDNF является критически важной для защиты мозга при ишемии [12].

Рецепторы BDNF и сигнализация

Показано, что в форме пробелка BDNF, связываясь с низкоаффинным рецептором зрелого BDNF $p75^{NTR}$ с высокой аффинностью [13], вместо поддержки выживания через активацию каспаз запускает апоптоз [14] (рис. 1). Нейротрофиновый рецептор $p75^{NTR}$ ($p75$) относится к семейству рецепторов фактора некроза опухолей (TNF). В основном он экспрессируется при раннем развитии нейронов, тогда как у взрослых его экспрессия ограничена холинергическими нейронами и некоторыми нейронами кортекса [15], экспрессия также возрастает при патологических состояниях, таких, как эпилепсия или нейродегенерация [16]. Низкоаффинный рецептор $p75^{NTR}$ связывается с про-формами нейротрофинов с высокой аффинностью и индуцирует сигнализацию, вызывая эффекты противоположные рецепторам TrkB [17]. Так, про-форма BDNF стимулирует выживание нейронов через TrkB, а активируя $p75^{NTR}$, способствует смерти нейронов. Количество про-формы BDNF является критическим для смерти нейронов [18].

Зрелая форма BDNF сохраняет способность связываться с $p75^{NTR}$, но связывание становится низкоаффинным. Предполагается, что $p75^{NTR}$ является ко-рецептором для зрелой формы BDNF и может усиливать или ослаблять его эффекты при взаимодействии с Trk рецепторами. Продemonстрирована экспрессия $p75^{NTR}$ нейрональными клетками предшественниками, локализованными в нишах головного мозга, показано, что от его экспрессии зависит нейрогенный потенциал клеток предшественников [19]. BDNF и его рецептор TrkB экспрессируются в развивающемся и во взрослом мозге млекопитающих и принимают участие в регуляции процессов дифференцировки нейронов, регуляции формирования синапсов, а также обеспечивают выживание интегрированных в нервную систему нейронов. Зрелая форма BDNF через активацию рецептора TrkB активирует сигнальные пути MAPK/ERK, PLC и PI-3K и тем самым поддерживает выживание [20]. Между этими сигнальными путями были обнаружены перекрестные взаимодействия (рис. 2).

Некоторые изоформы TrkB были выявлены в ЦНС млекопитающих. Полноразмерная изоформа TrkB является типичной тирозиновой киназой, которая гомодимеризуясь при связывании с лигандом вызывает внутриклеточное тирозинное фосфорилирование [21]. Кроме того, в нейронах и глии обнаружены усеченные формы TrkB, лишенные тирозинкиназного компонента; так T1, экспрессируясь в мозге, может действовать как доминантно-негативный ингибитор сигнализации BDNF, образуя гетеродимеры с полноразмерным TrkB [22]. Также были выявлены 2 дополнительных белка, связывающих BDNF — это

карбоксипептидаза Е (CPE) и сортилин. Связывание BDNF с CPE необходимо для его сортировки в секреторные везикулы, а сортилин локализован с BDNF в секреторных гранулах нейронов. Полагают, что CPE и сортилин возможно участвуют в регуляции внутриклеточной локализации BDNF в нейронах [23].

Роль BDNF

BDNF поддерживает выживание и рост нейритов у мотонейронов, симпатических и дофаминергических нейронов, ганглиозных клеток сетчатки. В работах, посвященных исследованиям нейродегенеративных заболеваний, ишемических повреждений и травм ЦНС установлено, что BDNF обладает выраженными нейрозащитными свойствами, угнетает клеточный апоптоз [24, 25], препятствует гибели нейронов [26, 27], стимулирует рост холинергических нервных волокон [28]. Показано, что BDNF поддерживает рост спинальных сенсорных и моторных нервных клеток [29], а также дофаминергических нейронов черной субстанции, холинергических и ГАМКергических нейронов коры головного мозга [30]. Введение BDNF стимулирует повышение ноцицептивной чувствительности спинальных нейронов [31].

В настоящее время проводятся исследования BDNF при различных физиологических и патологических состояниях с целью использования системы BDNF в качестве мишени для создания лекарственных средств. Показано, что BDNF играет важную

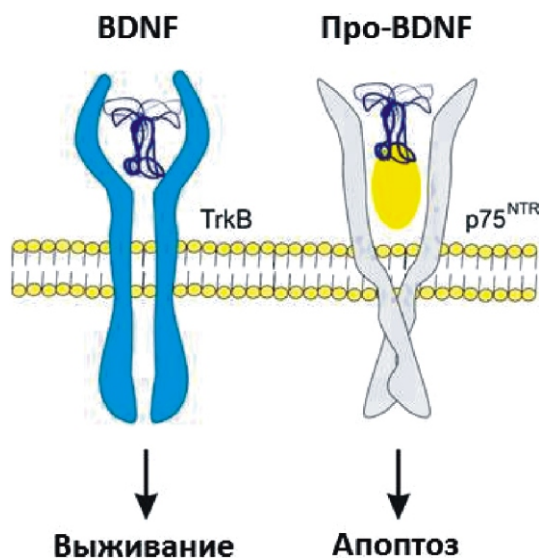


Рис. 1. Рецепторы BDNF и про-BDNF. BDNF, связываясь с рецептором TrkB, индуцирует активацию сигнальных путей, ведущих к выживанию клеток. Про-BDNF связывается с $p75^{NTR}$, что приводит к апоптозу. BDNF, мозговой нейротрофический фактор; $p75^{NTR}$, $p75$ рецептор нейротрофинов [из 87].

роль в регуляции многих процессов. Так, обнаружено, что при развитии ЦНС пик концентрации BDNF в головном мозге приходится на молодые годы, а относительно постоянные уровни определяются в зрелом и в старческом возрасте [32]. Интересен тот факт, что возрастание уровня BDNF совпадает с периодом, когда лобная кора созревает структурно и функционально [32], а преобладание в развивающемся мозге про-формы BDNF, которая не трансформируется в активную форму, делает развивающийся мозг более чувствительным к ишемии [4].

BDNF иммуногистохимически выявляется в клетках нервных ганглиев, локализованных в кишечных нервных сплетениях мышечной оболочки и на базальной мембране между продольным и поперечным слоями гладкомышечных клеток [33].

Установлено, что нарушения когнитивных функций у взрослого человека могут быть связаны с нарушениями выработки BDNF в гиппокампе [34]. Пр продемонстрирована статистически значимая связь между концентрацией BDNF в головном мозге с аффективными нарушениями и снижением памяти [35]. Ген BDNF локализован в коротком плече 11 хромосомы (11p14.1) его полиморфизм BDNF Val66Met связывают с психическими заболеваниями, такими, как шизофрения, тревожные и депрессивные расстройства [36].

В рамках моноаминовой гипотезы депрессии рассматривается механизм нарушения экспрессии генов-мишеней для нейротрофических факторов и, прежде всего, BDNF. Стресс может быть причиной

снижения экспрессии BDNF, что может приводить к апоптозу нейронов гиппокампа и, впоследствии, даже к его атрофии. Ассоциация депрессии с уровнем BDNF подтверждена метаанализом результатов клинических исследований, в ходе которых отслеживалась его концентрация [37]. Было обнаружено, что некоторые антидепрессанты действуют через рецепторы BDNF [38, 39]. Показано, что введение BDNF в дорсальное ядро шва воспроизводит эффекты антидепрессантов в модели «выработанной беспомощности» [40]. BDNF участвует в развитии дофаминергических систем мозга и взаимодействует с мезолимбическими дофаминергическими системами, участвующими в механизмах действия антипсихотических лекарств и в механизмах определяющих злоупотребление наркотическими веществами [25]. Хроническое применение антидепрессантов не только приводит к повышению экспрессии BDNF, но может также вызывать субклеточное перераспределение нейротрофинов [41]. Стресс, спровоцированный имобилизацией, стимулирует повышение экспрессии мРНК BDNF [40].

BDNF также играет роль в определении предрасположенности к шизофрении; полиморфные повторы (GT)_n в гене BDNF могут быть использованы для прогнозирования чувствительности к фармакотерапии хлорпромазином [42]. Показано, что экспрессия BDNF и TrkB, ассоциирована с патогенезом алкогольной зависимости [43]. BDNF запускает и поддерживает экспрессию дофаминового D3 рецептора (DRD3) [25].

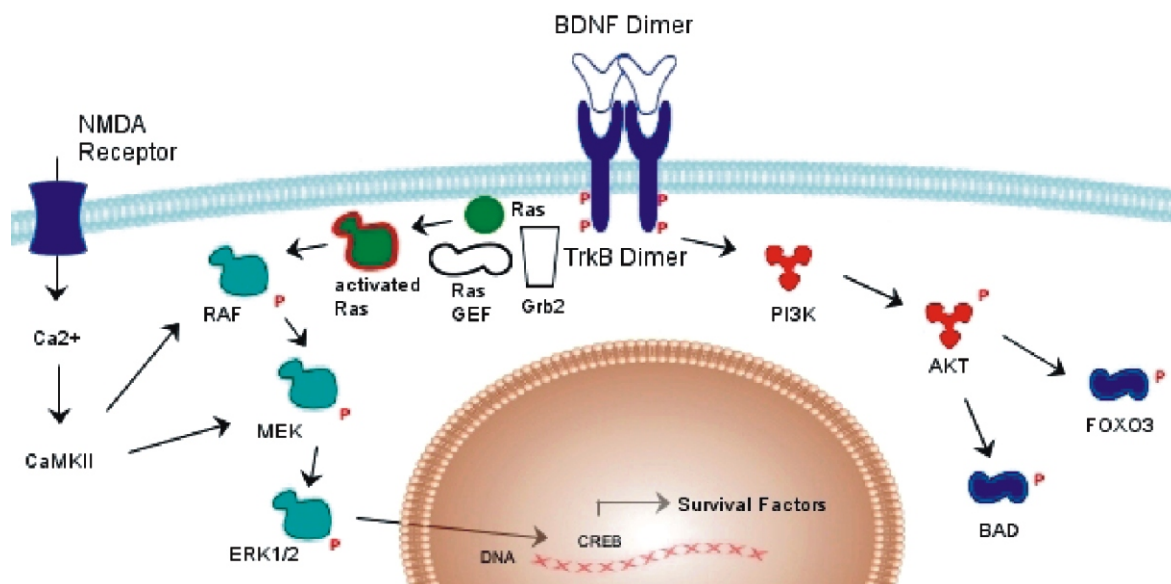


Рис. 2. Пример сигнального пути BDNF-TrkB, ведущего к выживанию клеток. BDNF активирует пути AKT и ERK1/2. PI3K вызывает фосфорилирование AKT, ингибирующие белки гибели клеток (FOXO3 и BAD). ERK1/2 фосфорилируется киназным каскадом (RAF-MEK — ERK1/2), активируемым RAS, который активируется RAS-GEF связыванием с Grb2, связанным с фосфорилированными TrkB димерами. Этот путь также может быть фосфорилирован CaMKII [из 88].

Было обнаружено, что снижение уровня экспрессии BDNF ассоциировано с нейродегенеративными заболеваниями, такими, как болезнь Альцгеймера [44], болезнь Хантингтона [45], и возрастной деменцией [46]. Продемонстрирована зависимость скорости прогрессирования болезни Альцгеймера от степени снижения экспрессии BDNF [47]. Показано снижение транскрипции BDNF в гиппокампе пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера [28].

Было выявлено, что BDNF стимулирует восстановление после экспериментального инсульта [48, 49]. Продемонстрировано, что предварительное введение продуцирующих BDNF фибробластов в головной мозг животных перед экспериментальным воспроизведением ишемии вызывает повышение экспрессии рецептора BDNF — TrkB и предотвращает гибель определенных групп нейронов гиппокампа [50]. Показано, что BDNF влияет на дифференцировку олигодендроцитов и миелинизацию после субкортикального ишемического инсульта [51]. Кроме того, BDNF стимулирует ангиогенез. Этот его эффект может быть объяснен тем, что сигнализация BDNF через TrkB вызывает 2–4-кратное увеличение транскрипции гена VEGF, причём этот эффект отменяется мутацией в области промотора гена VEGF [26], а также при повышении экспрессии урокиназы и матричных металлопротеиназ MMP-2 и MMP-9 в ответ на стимуляцию клеток BDNF [52].

Показано участие сигнализации BDNF в восприятии боли [53, 54], что позволяет надеяться на возможность разработки лекарственных средств на основе BDNF для лечения хронической боли. BDNF способен защищать клетки от гибели при химиотерапии [55]. Блокирование TrkB синтетическим ингибитором, или блокирование BDNF антителами повышает чувствительность к химиотерапии [56]. Клетки нейробластомы, экспрессирующие мРНК BDNF, но не имеющие трансмембранной активной формы TrkB, не дифференцируются в ответ на стимуляцию ретиноевой кислотой [57]. Обработка клеток нейробластомы ретиноевой кислотой приводит к повышению экспрессии не только TrkB, но и никотинового ацетилхолинового рецептора [58].

Также было обнаружено, что введение BDNF мышам с ожирением, индуцированным жировой диетой, и лишенным рецептора меланокортина-4, приводит у них к уменьшению аппетита и снижению веса [59]. Показано, что ожирение у детей, страдающих WAGR-синдромом (орфанная патология, крупная хромосомная делеция), ассоциировано со снижением экспрессии BDNF [60]. Снижение экспрессии BDNF ассоциировано с патологическим повышением аппетита, ожирением, гиперактивностью и когнитивными расстройствами [24]. Показано, что полимор-

физмы гена BDNF могут быть факторами риска ожирения у мужчин, страдающих шизофренией и получающих антипсихотическую фармакотерапию, и у женщин со сниженным уровнем экспрессии BDNF [61]. Продукция BDNF зависит от приема пищи при голодании — после 48 часов она возрастает, а после возвращения к нормальному питанию восстанавливается [62]. Популяционные исследования европейских популяций демонстрируют зависимость анорексии и индекса массы тела от экспрессии BDNF [63].

Была выявлена значимая роль BDNF в стимуляции нейропластичности [64], что открывает новые перспективы для создания лекарственных средств, предназначенных для лечения сосудистых, травматических и нейродегенеративных заболеваний нервной системы и хронической боли. BDNF вовлечен в процессы синаптической пластичности, которая необходима для обучения и памяти. Он способствует увеличению сложности аксонального дерева, расширяя синаптическую территорию аксона, координирует образование синапсов и стабилизацию между пре- и постсинаптическими нейронами [65]. Было показано, что делеция одного аллеля гена BDNF вызывает нарушение обучаемости у мышей [66].

Антероградный аксональный транспорт обеспечивает доставку BDNF и нейротрофина 3 (NT3) к связанным с нейронами иннервируемыми тканям, где они функционируют как трофические факторы и как нейротрансмиттеры [67]. На линии нейробластомы показано, что BDNF участвует в запуске роста нейритов; подтверждено участие BDNF в регуляции синаптической передачи и формировании синапсов в ЦНС по аутокринным и паракринным механизмам [68, 69].

Было показано, что при повреждении нейронов, вызванном гипоксией, ишемией и нейротоксинами, экспрессия BDNF повышается и оказывает нейротрофический эффект [70, 71]. Также было обнаружено, что BDNF снижает гибель культивируемых дофаминовых нейронов, вызванную токсическим действием ротенона [72].

Повреждение периферических нервов зачастую является причиной инвалидности, поскольку скорость роста периферических нервов очень низкая, и функциональное восстановление в большинстве случаев остается неполным [73, 74]. Было обнаружено, что BDNF улучшает регенерацию периферических нервов [75]. Повышение уровня BDNF предотвращает смерть нейронов, усиливает нейрональную активность и способствует росту аксонов [1]. Напротив, сниженный уровень BDNF замедляет рост нейритов и ингибирует восстановление аксонов и ремиелинизацию [76]. После повреждения периферических нервов Шванновские клетки продуцируют и секретируют нейротрофические фак-

торы и в том числе BDNF. Известно, что Шванновские клетки являются основными клетками стромы в периферической нервной системе и играют ключевую роль во время роста и регенерации периферических нервов. После повреждения нерва Шванновские клетки участвуют в элиминации дебриса, дедифференцируются, образуя так называемые «диски Бюнгнера», делятся и мигрируют, обеспечивая направленный рост регенерирующих аксонов по направлению к денервированным мишеням [77, 78]. В то же время Шванновские клетки синтезируют и секретируют нейротрофические факторы, в частности, фактор роста нервов (NGF), BDNF, нейротрофин-3 и нейротрофин-4/5, повышая выживание и рост нейронов [78, 79]. Эти секретируемые нейротрофические факторы, в свою очередь, способствуют фенотипической модуляции Шванновских клеток и нейронов, формируя таким образом положительную обратную связь для развития нервов и регенерации [80, 81]. Еще одним источником нейротрофических факторов являются мезенхимальные стволовые клетки [82]. Обнаружено, что мезенхимальные стромальные клетки, выделяемые из жировой ткани, способны стимулировать рост нервных волокон и репарацию травмированного нерва, при этом паракринная секреция нейротрофических факторов, в частности BDNF, играет ключевую роль. Важнейшей находкой оказался тот факт, что блокирование BDNF полностью нейтрализует позитивный нейротрофический эффект мезенхимальных стромальных клеток [83]. Одну из интересных иллюстраций роли BDNF можно увидеть на рис. 3, отражающим максимальное повышение экспрессии BDNF и его рецептора после травмы нерва по сравнению с другими нейротрофическими факторами.

Поскольку нейротрофические факторы, в том числе, BDNF могут усиливать регенерацию нейронов, в последнее время полагают, что они обладают большим терапевтическим потенциалом при повреждении периферических нервов. Клиническое использование экзогенного BDNF до сих пор было ограниченным в связи со сложностями доставки, поддержания эффективной фармакотерапевтической дозы и возможного риска образования опухолей при введении высоких концентраций [76, 84—86]. Поиск эффективной стратегии клинического применения BDNF для восстановления периферической иннервации является актуальной задачей исследований в последние годы.

Поскольку доставка нейротрофических факторов к различным структурам нервной системы и длительное локальное поддержание их терапевтической концентрации все еще остается сложной задачей, для ее решения были использованы генотерапевтические подходы, с помощью которых возможно обеспечение длительной локальной продукции нейротрофинов. Нами были проведены доклинические исследования генотерапевтического препарата на основе BDNF. Результаты проведенных исследований продемонстрировали биологическую безопасность и специфическую активность разработанного препарата в отношении *посттравматического восстановления иннервации* [75].

Для осуществления генной терапии нами была создана модифицированная генетическая конструкция $\rho\text{Vax1-hBDNF}$. Эффективность экспрессии данной плазмиды в эукариотических клетках была подтверждена на клеточной линии HEK293T. Нами была разработана методика внутримышечной инъекции генетической конструкции и подобраны ее оптимальные

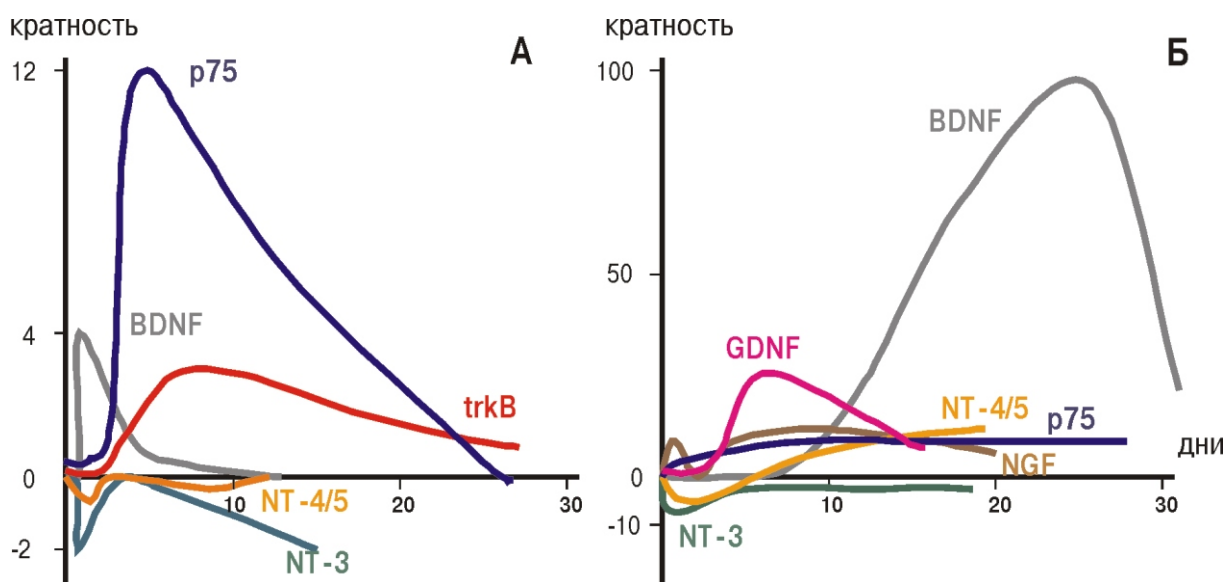
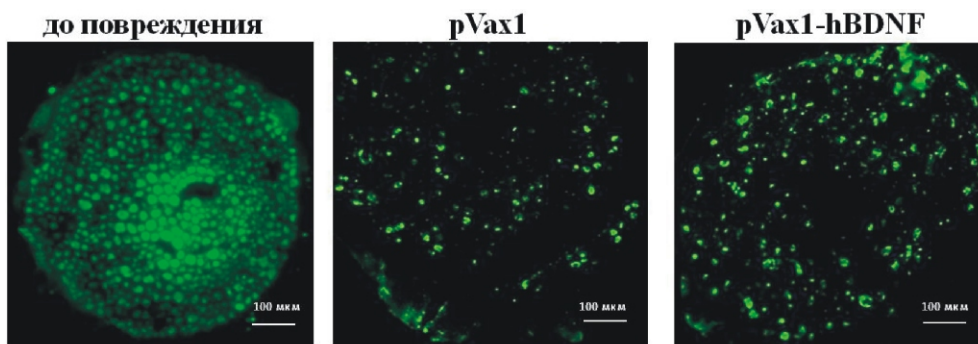


Рис. 3. Динамика экспрессии нейротрофических факторов и их рецепторов в травмированном нерве: А — в проксимальном конце нерва (теле нейрона), Б — в дистальном конце нерва (Шванновские клетки) [из 89].

характеристики. Эффективность такой методики была подтверждена при помощи плазмиды, кодирующей маркерный белок (β -галактозидазу), и с помощью контроля экспрессии pVax1-hBDNF в мышечном экспланте. Инъекция генетической конструкции pVax1-hBDNF стимулировала более полноценное восстановление нерва, то есть по данным электрофизиологического и морфологического исследования количество восстановившихся нервных волокон было значительно больше, чем в группе контроля. Таким образом, гиперэкспрессия BDNF в передней большеберцовой мышце (*m. tibialis ant.*) стимулировала восстановление травмированного периферического нерва (рис. 4).

В настоящее время проводятся клинические исследования генного лекарственного препарата на основе невирусной плазмидной конструкции, несущей ген

BDNF для стимуляции восстановления периферической иннервации. По результатам завершенной первой фазы клинических исследований препарат BDNF является безопасным для человека. На настоящий момент в двойное слепое плацебо-контролируемое исследование включено 27 пациентов. Исследователи у части пациентов наблюдают значительное ускорение восстановления иннервации, побочных эффектов не зарегистрировано, однако статистическая обработка данных будет проведена по завершению клинического исследования. Полученные нами результаты указывают на целесообразность продолжения исследований и разработок, направленных на создание лекарственных препаратов на основе BDNF для регенерации периферических нервов, а в перспективе и восстановления центральной нервной системы и когнитивных функций человека.



Введение pVax1-hBDNF увеличивает количество регенерирующих нервных волокон (через 7 суток)

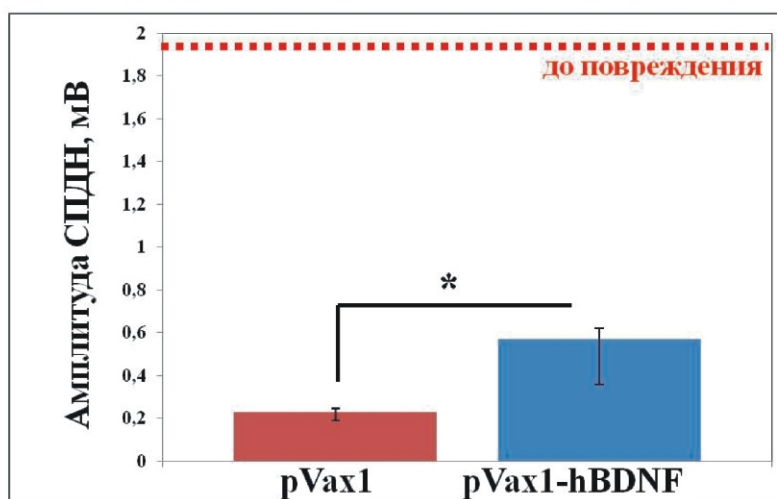


Рис. 4. Внутримышечная инъекция генетической конструкции pVax1-hBDNF достоверно увеличивает количество регенерировавших аксонов. Верхняя панель — поперечные срезы общего малоберцового нерва, 3 мм дистальнее места повреждения, 4-е сут. от момента повреждения: зеленое окрашивание соответствует локализации восстановившихся аксонов; иммунофлуоресцентная окраска срезов матригелей антителами против маркера аксонов — белка NF200. Нижняя панель — внутримышечная инъекция генетической конструкции pVax1-hBDNF статистически значимо увеличивает количество регенерировавших аксонов (*- $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля) [75].

Заключение

Наши и литературные данные свидетельствуют в пользу того, что система мозгового нейротрофического фактора является перспективной терапевтической мишенью. Препараты на основе BDNF могут влиять на синаптическую пластичность (восстановление после травм, после инсульта, ускорение обучения при работе с нейроинтерфейсами); высшую нервную деятельность (депрессию, память); ишемию мозга; ангиогенез; восприятие боли; течение нейродегенеративных заболеваний (болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона и др.); ожирение и восстановление периферической иннервации при травме нервов.

References

1. Lykissas M.G., Batistatou A.K., Charalabopoulos K.A., Beris A.E. The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration. *Curr Neurovasc Res.* 2007; 4: 143-51.
2. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science.* 1987; 237: 1154-62.
3. Gotz R., Koster R., Winkler C., Raulf F., Lottspeich F., Schartl M., Thoenen H. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature.* 1994; 372: 266-9.
4. Yang J., Siao C.J., Nagappan G., Marinic T., Jing D., Mc Grath K., Chen Z.Y., Mark W., Tessarollo L., Lee F.S., Lu B., Hempstead B.L. Neuronal release of proBDNF. *Nat Neurosci.* 2009; 12: 113-5.
5. Cassiman D., Denef C., Desmet V.J., Roskams T. Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin-receptors. *Hepatology.* 2001; 33: 148-58.
6. Barde Y.A., Edgar D., Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1982; 1: 549-53.
7. Mowla S.J., Farhadi H.F., Pareek S., Atwal J.K., Morris S.J., Seidah N.G., Murphy R.A. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem.* 2001; 276: 12660-66.
8. Lu B. Pro-region of neurotrophins: role in synaptic modulation. *Neuron.* 2003; 39: 735-8.
9. Pang P.T., Teng H.K., Zaitsev E., Woo N.T., Sakata K., Zhen S., Teng K.K., Yung W.H., Hempstead B.L., Lu B. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science.* 2004; 306: 487-91.
10. Gray K., Ellis V. Activation of pro-BDNF by the pericellular serine protease plasmin. *FEBS Lett.* 2008; 582(6): 907-10.
11. Goodman L.J., Valverde J., Lim F., Geschwind M.D., Federoff H.J., Geller A.I., Hefti F. Regulated release and polarized localization of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci.* 1996; 7: 222-38.
12. Chen A., Xiong L.J., Tong Y., Mao M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomol Rep.* 2013; 1(2): 167-76.
13. Lee R., Kermani P., Teng K.K., Hempstead B.L. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science.* 2001; 294(5548): 1945-8.
14. Nykjaer A., Willnow T.E. Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends Neurosci.* 2012; 35(4): 261-70.
15. Angelo M.F., Aviles-Reyes R.X., Villarreal A., Barker P., Reines A.G., Ramos A.J. p75 NTR expression is induced in isolated neurons of the peneumbra after ischemia by cortical devascularization. *J Neurosci Res.* 2009; 87: 1892-903.
16. Dechant G., Barde Y.A. The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci.* 2002; 5: 1131-6.
17. Ho R., Minturn J.E., Simpson A.M., Iyer R., Light J.E., Evans A.E., Brodeur G.M. The effect of P75 on Trk receptors in neuroblastomas. *Cancer Lett.* 2011; 305: 76-85.
18. Kenchappa R.S., Tep C., Korade Z., Urrea S., Bronfman FC, Yoon SO, Carter BD. p75 neurotrophin receptor-mediated apoptosis in sympathetic neurons involves abiphasic activation of JNK and up-regulation of tumor necrosis factor- α -converting enzyme/ADAM17. *J Biol Chem.* 2010; 285: 20358-68.
19. Bernabeu R.O., Longo F.M. The p75 neurotrophin receptor is expressed by adult mouse dentate progenitor cells and regulates neuronal and non-neuronal cell genesis. *BMC Neurosci.* 2010; 11: 136-47.
20. Huang E.J., Reichardt L.F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2003; 72: 609-42.
21. Wong J., Woon H.G., Weickert C.S. Full length TrkB potentiates estrogen receptor α mediated transcription suggesting convergence of susceptibility pathways in schizophrenia. *Mol Cell Neurosci.* 2011; 46: 67-78.
22. Luberg K., Wong J., Weickert C.S., Timmusk T. Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *J Neurochem.* 2010; 113: 952-64.
23. Evans S.F., Irmady K., Ostrow K., Kim T., Nykjaer A., Saftig P., Blobel C., Hempstead B.L. Neuronal brain-derived neurotrophic factor is synthesized in excess, with levels regulated by sortilin-mediated trafficking and lysosomal degradation. *J Biol Chem.* 2011; 286: 29556-67.
24. Gray J., Yeo G.S., Cox J.J., Morton J., Adlam A.L., Keogh J.M., Yanovski J.A., El Gharbawy A., Han J.C., Tung Y.C., Hodges J.R., Raymond F.L., O'rahilly S., Farooqi I.S. Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Diabetes.* 2006; 55(12): 3366-33.
25. Krebs M.O., Guillain O., Bourdell M.C., Schwartz J.C., Olie J.P., Poirier M.F., Sokoloff P. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) gene variants association with age at onset and therapeutic response in schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2000; 5(5): 558-62.
26. Nakamura K., Martin K.C., Jackson J.K., Beppu K., Woo C.W., Thiele C.J. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1 α in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 2006; 66(8): 4249-55.
27. Baj G., Tongiorgi E. BDNF splice variants from the second promoter cluster support cell survival of differentiated neuroblastoma upon cytotoxic stress. *J Cell Sci.* 2009; 122(Pt 1): 36-43.
28. Phillips H.S., Hains J.M., Armanini M., Laramee G.R., Johnson S.A., Winslow J.W. BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron.* 1991; 7(5): 695-702.
29. Barde Y.A., Davies A.M., Johnson J.E., Lindsay R.M., Thoenen H. Brain derived neurotrophic factor. *Prog Brain Res.* 1987; 71: 185-9.
30. Kuipers S.D., Bramham C.R. Brain-derived neurotrophic factor mechanisms and function in adult synaptic plasticity: new insights and implications for therapy. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2006; 9(5): 580-6.
31. Thompson S.W., Bennett D.L., Kerr B.J., Bradbury E.J., McMahon S.B. Brain-derived neurotrophic factor is an endogenous modulator of nociceptive responses in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(14): 7714-8.
32. Waterhouse E.G., Xu B. New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. *Mol Cell Neurosci.* 2009; 42(2): 81-9.

33. Hoehner J.C., Wester T., Pahlman S., Olsen L. Localization of neurotrophins and their high-affinity receptors during human enteric nervous system development. *Gastroenterology*. 1996; 110(3): 756-67.
34. Castren E., Tanila H. Neurotrophins and dementia—keeping in touch. *Neuron*. 2006; 51(1): 1-3.
35. Kauer-Sant Anna M., Tramontina J., Andreazza A.C., Cereser K., da Costa S., Santin A., Yatham L.N., Kapczinski F. Traumatic life events in bipolar disorder: impact on BDNF levels and psychopathology. *Bipolar Disord*. 2007; 9(1): 128-135.
36. Chen Z.Y., Bath K., McEwen B., Hempstead B., Lee F. Impact of genetic variant BDNF (Val66Met) on brain structure and function. *Novartis Found Symp*. 2008; 289: 180-95.
37. Brunoni A.R., Lopes M., Fregni F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008; 11(8): 1169-80.
38. Saarelainen T., Hendolin P., Lucas G., Koponen E., Sairanen M., Mac Donald E., Agerman K., Haapasalo A., Nawa H., Aloyz R., Ernfors P., Castren E. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci*. 2003; 23(1): 349-57.
39. Jiang B., Huang C., Chen X.F., Tong L.J., Zhang W. Tetramethylpyrazine Produces Antidepressant-Like Effects in Mice Through Promotion of BDNF Signaling Pathway. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015; 18(8): 1-13.
40. Altar C.A. Neurotrophins and depression. *Trends Pharmacol Sci*. 1999; 20(2): 59-61.
41. Calabrese F., Molteni R., Maj P.F., Cattaneo A., Genarelli M., Racagni G., Riva M.A. Chronic duloxetine treatment induces specific changes in the expression of BDNF transcripts and in the subcellular localization of the neurotrophin protein. *Neuropsychopharmacology*. 2007; 32(11): 2351-9.
42. Xu M.Q., St Clair D., Feng G.Y., Lin Z.G., He G., Li X., He L. BDNF gene is a genetic risk factor for schizophrenia and is related to the chlorpromazine-induced extrapyramidal syndrome in the Chinese population. *Pharmacogenet Genomics*. 2008; 18(6): 449-57.
43. Davis M.I. Ethanol-BDNF interactions: still more questions than answers. *Pharmacol Ther*. 2008; 118(1): 36-57.
44. Jeronimo-Santos A., Fonseca-Gomes J., Guimaraes D.A., Tanqueiro S.R., Ramalho R.M., Ribeiro J.A., Sebastiao A.M., Diogenes M.J. Brain-derived neurotrophic factor mediates neuroprotection against A β -induced toxicity through a mechanism independent on adenosine 2A receptor activation. *Growth Factors*. 2015; 33(4): 298-308.
45. Silva A., Naia L., Dominguez A., Ribeiro M., Rodrigues J., Vieira O.V., Lessmann V., Rego A.C. Overexpression of BDNF and Full-Length TrkB Receptor Ameliorate Striatal Neural Survival in Huntington's Disease. *Neurodegener Dis*. 2015; 15(4): 207-18.
46. Passaro A., Dalla Nora E., Morieri M.L., Soavi C., Sanz J.M., Zurlo A., Fellin R., Zuliani G. Brain-derived neurotrophic factor plasma levels: relationship with dementia and diabetes in the elderly population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015; 70(3): 294-302.
47. Laske C., Stellos K., Hoffmann N., Stransky E., Straten G., Eschweiler G.W., Leyhe T. Higher BDNF serum levels predict slower cognitive decline in Alzheimer's disease patients. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011; 14(3): 399-404.
48. Qin L., Kim E., Ratan R., Lee F.S., Cho S. Genetic variant of BDNF (Val66Met) polymorphism attenuates stroke-induced angiogenic responses by enhancing anti-angiogenic mediator CD36 expression. *J Neurosci*. 2011; 31(2): 775-83.
49. Rodriguez-Frutos B., Otero-Ortega L., Ramos-Cejudo J., Martinez-Sanchez P., Barahona-Sanz I., Navarro-Hernandez T., Gomez-de Frutos Mdel C., Diez-Tejedor E., Gutierrez-Fernandez M. Enhanced brain-derived neurotrophic factor delivery by ultrasound and microbubbles promotes white matter repair after stroke. *Biomaterials*. 2016; 100: 41-52.
50. Ferrer I., Ballabriga J., Marti E., Perez E., Alberch J., Arenas E. BDNF up-regulates TrkB protein and prevents the death of CA1 neurons following transient forebrain ischemia. *Brain Pathol*. 1998; 8(2): 253-61.
51. Ramos-Cejudo J., Gutierrez-Fernandez M., Otero-Ortega L., Rodriguez-Frutos B., Fuentes B., Vallejo-Cremades M.T., Hernanz T.N., Cerdan S., Diez-Tejedor E. Brain-derived neurotrophic factor administration mediated oligodendrocyte differentiation and myelin formation in sub-cortical ischemic stroke. *Stroke*. 2015; 46(1): 221-8.
52. Sun C.Y., Hu Y., Wang H.F., He W.J., Wang Y.D., Wu T. Brain-derived neurotrophic factor inducing angiogenesis through modulation of matrix-degrading proteases. *Chin Med J (Engl)*. 2006; 119(7): 589-95.
53. Tao W., Chen Q., Zhou W., Wang Y., Wang L., Zhang. Persistent inflammation-induced up-regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes synaptic delivery of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor GluA1 subunits in descending pain modulatory circuits. *J Biol Chem*. 2014; 289(32): 22196-04.
54. Tao W., Chen Q., Wang L., Zhou W., Wang Y., Zhang Z. Brainstem brain-derived neurotrophic factor signaling is required for histone deacetylase inhibitor-induced pain relief. *Mol Pharmacol*. 2015; 87(6): 1035-41.
55. Jaboin J., Kim C.J., Kaplan D.R., Thiele C.J. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Res*. 2002; 62(22): 6756-63.
56. Ho R., Eggert A., Hishiki T., Minturn J.E., Ikegaki N., Foster P., Camoratto A.M., Evans A.E., Brodeur G.M. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res*. 2002; 62(22): 6462-6.
57. Kaplan D.R., Matsumoto K., Lucarelli E., Thiele C.J. Induction of TrkB by retinoic acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neuroblastoma cells. *Eukaryotic Signal Transduction Group. Neuron*. 1993; 11(2): 321-31.
58. Serres F., Carney S.L. Nicotine regulates SH-SY5Y neuroblastoma cell proliferation through the release of brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res*. 2006; 1101(1): 36-42.
59. Xu B., Goulding E.H., Zang K., Cepoi D., Cone R.D., Jones K.R., Tecott L.H., Reichardt L.F. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci*. 2003; 6(7): 736-42.
60. Han J.C., Liu Q.R., Jones M., Levinn R.L., Menzie C.M., Jefferson-George K.S., Adler-Wailes D.C., Sanford E.L., Lachawan F.L., Uhl G.R., Rennert O.M., Yanovski J.A. Brain-derived neurotrophic factor and obesity in the WAGR syndrome. *N Engl J Med*. 2008; 359(9): 918-27.
61. Zhang X.Y., Chen D.C., Tan Y.L., Tan S., Luo X., Zuo L., Soares J.C. BDNF polymorphisms are associated with cognitive performance in schizophrenia patients versus healthy controls. *J Clin Psychiatry*. 2016; 77(8): e1011-8.
62. Barriohay B., Lebrun B., Moyse E., Jean A. Brain-derived neurotrophic factor plays a role as an anorexigenic factor in the dorsal vagal complex. *Endocrinology*. 2005; 146(12): 5612-20.
63. Ribases M., Gratacos M., Fernandez-Aranda F., Bellodi L., Boni C., Anderluh M., Cristina Cavallini M., Cellini E., Di Bella D., Erzegovesi S., Foulon C., Gabrovsek M., Gorwood P., Hebebrand J., Hinney A., Holliday J., Hu X., Karwautz A., Kipman A., Komel R., Nacmias B., Remschmidt H., Ricca V., Sorbi S., Tomori M., Wagner G., Treasure J., Collier D.A., Estivill X. Association of BDNF with res-

tricting anorexia nervosa and minimum body mass index: a family-based association study of eight European populations. *Eur J Hum Genet.* 2005; 13(4): 428-34.

64. Calabrese F., Rossetti A.C., Racagni G., Gass P., Riva M.A., Molteni R. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. *Front Cell Neurosci.* 2014 8: 430-7.

65. Sanchez A.L., Matthews B.J., Meynard M.M., Hu B., Javed S., Cohen Cory S. BDNF increases synapse density in dendrites of developing tectal neurons in vivo. *Development.* 2006; 133: 2477-86.

66. Bartoletti A., Cancedda L., Reid S.W., Tessarollo L., Porciatti V., Pizzorusso T., Maffei L. Heterozygous knock-out mice for brain-derived neurotrophic factor show a pathway-specific impairment of long-term potentiation but normal critical period for monocular deprivation. *J Neurosci.* 2002; 22(23): 10072-77.

67. Vilar M., Mira H. Regulation of Neurogenesis by Neurotrophins during Adulthood: Expected and Unexpected Roles. *Front Neurosci.* 2016; 10: 26-35.

68. Nakagawara A., Azar C.G., Scavarda N.J., Brodeur G.M. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol.* 1994; 14(1): 759-67.

69. Lessmann V., Gottmann K., Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol.* 2003; 69(5): 341-74.

70. Goldberg J.L., Barres B.A. The relationship between neuronal survival and regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 2000; 23: 579-612.

71. Liu Q.R., Lu L., Zhu X.G., Gong J.P., Shaham Y., Uhl G.R. Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine. *Brain Res.* 2006; 1067(1): 1-12.

72. Jiang Q., Yan Z., Feng J. Neurotrophic factors stabilize microtubules and protect against rotenone toxicity on dopaminergic neurons. *J Biol Chem.* 2006; 281(39): 29391-400.

73. Battistoni B., Papalia I., Tos P., Geuna S. Chapter 1: Peripheral nerve repair and regeneration research: a historical note. *Int. Rev. Neurobiol.* 2009; 87: 1-7.

74. Gu X. Progress and perspectives of neural tissue engineering. *Front Med.* 2015; 9: 401-11.

75. Karagyaur M., Dyikanov D., Makarevich P., Semina E., Stambolsky D., Plekhanova O., Kalinina N., Tkachuk V. Non-viral transfer of BDNF and uPA stimulates peripheral nerve regeneration. *Biomed Pharmacother.* 2015; 74: 63-70.

76. Zhang J.Y., Luo X.G., Xian C.J., Liu Z.H. & Zhou X.F. Endogenous BDNF is required for myelination

and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *Eur J Neurosci.* 2000; 12: 4171-80.

77. Namgung U. The role of Schwann cell-axon interaction in peripheral nerve regeneration. *Cells Tissues Organs.* 2014; 200: 6-12.

78. Stoll G., Griffin J.W., Li C.Y., Trapp B.D. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol.* 1989; 18: 671-83.

79. Frostick S.P., Yin Q., Kemp G.J. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery.* 1998; 18: 397-405.

80. Gu X., Ding F., Yang Y. & Liu J. Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. *Prog Neurobiol.* 2011; 93: 204-30.

81. Chan J.R., Watkins T.A., Cosgaya J.M., Zhang C., Chen L., Reichardt L.F., Shooter EM, Barres BA. NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes. *Neuron.* 2004; 43: 183-91.

82. Kingham P.J., Kolar M.K., Novikova L.N., Novikov L.N., Wiberg M. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem Cells Dev.* 2014; 23(7): 741-754.

83. Lopatina T., Kalinina N., Karagyaur M., Stambolsky D., Rubina K., Revischin A., Pavlova G., Parfyonova Y., Tkachuk V. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *PLoS One.* 2011; 6(3): e17899-e17909.

84. Lu B., Nagappan G., Guan X., Nathan PJ, Wren P. BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2013; 14: 401-16.

85. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat.* 1999; 194(1): 1-14.

86. Gordon T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurg Focus.* 2009; 26(2): E3-E13.

87. Budni J., Bellettini-Santos T., Mina F., Garcez M.L., Zugno A.I. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging Dis.* 2015; 6(5): 331-41.

88. Mitchell A.C. Neuroprotection by physical activity. *Vanderbilt Reviews. Neuroscience.* 2010; 7: 76-81.

89. Gordon Boyd J., Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Molecular Neurobiology.* 2003; 27(3): 277-323.