



Prognostic value of neurotrophic growth factor (BDNF) in patients with colorectal cancer during chemotherapy

Wartość prognostyczna neurotropowego czynnika wzrostu (BDNF) u pacjentów z rakiem jelita grubego w trakcie chemioterapii

Magdalena Olborska¹, Anna Głogowska-Gruszka¹ , Grzegorz Słomian², Marta Buczkowska¹ , Ryszard Szkilnik³, Przemysław Nowak⁴ 

¹Department of Toxicology and Health Protection, Faculty of Health Sciences in Bytom, Medical University of Silesia in Katowice

²Oncological Ward, Independent Public Health Care Unit, Voivodeship Specialised Hospital No. 3, Rybnik, Poland

³Wyższa Szkoła Biznesu w Dąbrowie Górniczej

⁴Department of Pharmacology, Opole University, Opole, Poland

ABSTRACT

INTRODUCTION: The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a protein belonging to neurotrophins that plays a key role in the proper development and functioning of the mammalian central nervous system. Previous studies have focused on assessment of the BDNF concentration in blood serum as a potential biomarker in neurological disorders. Recently, the BDNF signalling pathway has been recognised as a potential target for anticancer drugs, while its receptor (TrkB) as an oncogene in colorectal cancer cells. Despite the significant role in carcinogenesis, there are few studies on BDNF as a biomarker in colorectal cancer.

MATERIAL AND METHODS: The study included 25 patients with clinically and histopathologically confirmed colorectal cancer, who were qualified for treatment. Prior to the first administration of chemotherapy, venous blood samples were collected from the patients and the biochemical parameters routinely determined prior to treatment were evaluated. Additionally, the serum BDNF concentration was determined by the immunoenzymatic method in all the patients.

RESULTS: The serum BDNF concentration in patients was 50.24 ± 23.37 ng/ml. The BDNF concentration did not differ significantly between women and men. A negative correlation was found between the BDNF and CRP concentration and the BDNF and LDH concentration. The BDNF levels were significantly higher in patients who underwent primary tumour resection before chemotherapy. There was no correlation between the BDNF concentration and age, gender, BMI, CEA marker and liver enzymes in patients with colorectal cancer. There was no correlation between the BDNF concentration and clinical response to the treatment.

CONCLUSIONS: BDNF cannot be considered as a prognostic factor in patients with colorectal cancer.

KEY WORDS

colorectal cancer, blood serum, biomarker, brain-derived neurotrophic factor

Received: 05.12.2017

Revised: 19.03.2018

Accepted: 03.06.2019

Published online: 31.12.2019

Address for correspondence: Dr n. med. Anna Głogowska-Gruszka, Department of Toxicology and Health Protection, Faculty of Health Sciences in Bytom, Medical University of Silesia in Katowice, Poland, ul. Piekarska 18, 41-902 Bytom, tel. + 48 32 275 59 91, e-mail: aglogowska@sum.edu.pl

Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
www.annales.sum.edu.pl

**STRESZCZENIE**

WSTĘP: Neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego (*Brain-Derived Neurotrophic Factor* – BDNF) jest białkiem należącym do rodziny neurotrofin, które odgrywa kluczową rolę w prawidłowym rozwoju i funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego ssaków. Dotychczasowe badania dotyczyły głównie oceny stężenia BDNF w surowicy krwi, jako potencjalnego biomarkera w schorzeniach neurologicznych. Ostatnio ścieżka sygnałowa BDNF uznana została za potencjalne miejsce uchwytu leków przeciwnowotworowych, a jego receptor (TrkB) za onkogen w komórkach raka jelita grubego. Pomimo znaczącej roli w nowotworzeniu, niewiele jest prac dotyczących BDNF jako biomarkera w raku jelita grubego.

MATERIAŁ I METODY: Badaniem objęto grupę 25 osób z potwierdzonym klinicznie i histopatologicznie rakiem jelita grubego, którzy zostali zakwalifikowani do leczenia. Przed pierwszorazowym podaniem chemioterapii od pacjentów pobrano próbki krwi żyłnej i dokonano oceny parametrów biochemicznych oznaczanych rutynowo przed leczeniem. Dodatkowo metodą immunoenzymatyczną oznaczono stężenia BDNF w surowicy krwi wszystkich badanych pacjentów.

WYNIKI: Stężenie BDNF w surowicy pacjentów wyniosło $50,24 \pm 23,37$ ng/ml i nie różniło się istotnie pomiędzy kobietami i mężczyznami. Stwierdzono ujemną korelację między stężeniem BDNF i CRP oraz BDNF i LDH. Stężenie BDNF było znacząco wyższe u chorych, którzy przed chemioterapią byli poddani resekcji guza pierwotnego. Nie wykazano zależności pomiędzy stężeniem BDNF a wiekiem, płcią, wskaźnikiem BMI, markerem CEA oraz enzymami wskaźnikowymi wątroby u pacjentów z RJG. Nie zaobserwowano zależności pomiędzy stężeniem BDNF a odpowiedzią kliniczną na zastosowane leczenie.

WNIOSKI: BDNF nie może być uznany za czynnik prognostyczny u chorych z rakiem jelita grubego.

SŁOWA KLUCZOWE

rak jelita grubego, surowica krwi, biomarker, neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego

INTRODUCTION

The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a protein belonging to neurotrophins that plays a key role in the proper development and functioning of the mammalian central nervous system (CNS). The main source of BDNF secretion is neurons [1].

BDNF interacts with target cells via the tropomyosin receptor kinase B (TrkB) membrane receptor and the low affinity nerve growth factor receptor (p75^{NTR}). The addition of neurotrophin to the extracellular domain of the TrkB receptor results in its dimerisation, phosphorylation and subsequent activation of intracellular kinase cascades leading to various effects, e.g. gene expression changes, which in turn affects the differentiation process, growth, plasticity and survival of neurons [2]. Stimulation of the p75^{NTR} receptor, depending on the participation of the BDNF precursor or its mature form and cooperation with the sortilin receptor, may lead to the activation of both pro-apoptotic signalling pathways and cell survival cascades [3,4].

The participation of BDNF and its TrkB receptor in oncogenesis has been the subject of many studies in recent years. It was first characterised in the case of neoplasms affecting the central nervous system (CNS), but in recent years it has been demonstrated that this compound also plays a key role in the pathogenesis of non-neurogenic neoplasms, including colorectal cancer [5].

The signalling pathways of, e.g. phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3K), mitogen-activated protein kinase (MAPK) and protein kinase C (PKC), induced by the interaction of BDNF with TrkB, stimulate the proliferation, invasion, metastasis, neovascularisation and survival of tumour cells. The signalling pathways of

WSTĘP

Neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego (*Brain-Derived Neurotrophic Factor* – BDNF) jest białkiem należącym do rodziny neurotrofin, które odgrywa kluczową rolę w prawidłowym rozwoju i funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego (OUN) ssaków. Głównym źródłem jego wydzielania są neurony [1].

BDNF oddziałuje na komórki docelowe za pośrednictwem receptora błonowego o aktywności kinazy tyrozynowej B (*Tropomyosin Receptor Kinase B* – TrkB) i receptora niskiego powinowactwa do nerwowego czynnika wzrostu (Low Affinity Nerve Growth Factor Receptor – p75^{NTR}). Przyłączenie neurotrofiny do zewnątrzkomórkowej domeny receptora TrkB powoduje jego dimeryzację, fosforylację, a następnie uruchomienie wewnątrzkomórkowych kaskad kinaz prowadzących do różnych efektów, np. zmian w ekspresji genów, co w rezultacie wpływa na proces różnicowania, wzrost, plastyczność i przeżywalność neuronów [2]. Stymulacja receptora p75^{NTR}, w zależności od udziału prekursora BDNF lub jego formy dojrzałej oraz kooperacji z receptorem sortilinowym, może powodować aktywację zarówno proapoptotycznych szlaków sygnałowych, jak i kaskad prowadzących do przeżycia komórki [3,4].

Przedmiotem wielu badań ostatnich lat jest udział BDNF i jego receptora TrkB w onkogenezie. Po raz pierwszy został on scharakteryzowany w przypadku nowotworów dotyczących ośrodkowego układu nerwowego (OUN), jednak w ostatnich latach wykazano, że związek ten odgrywa także kluczową rolę w patogenezie nowotworów nieneurogennych, w tym raka jelita grubego [5].



extracellular signal regulated kinase (ERK) and serine/threonine protein kinase (Akt) activated by BDNF additionally cause the resistance of cancer cells to cytostatic drugs [6,7,8]. Moreover, the cell lines of colorectal cancer produce endogenous BDNF and together with TrkB they form an autocrine loop stimulating the proliferation and survival of tumour cells. In the cancer cells of colorectal cancer, increased BDNF expression in comparison with unchanged cells is also observed. Increased BDNF expression is associated with a poor prognosis and course of the disease [9].

Excessive BDNF expression mainly concerns neoplastic cells, but this factor is also present in blood serum. Few studies attempt to correlate the concentrations of peripherally circulating BDNF in order to assess its usefulness as a diagnostic and prognostic marker in colorectal cancer, even though it may significantly contribute to changes in the serum concentrations of this neurotrophin [5].

MATERIAL AND METHODS

The study involved 25 patients treated in the Oncology Department with Haematological Subdivision of the Provincial Specialist Hospital No. 3 in Rybnik (46 Energetyków St., 44-200 Rybnik). They were persons with previously diagnosed and clinically and histopathologically confirmed colorectal cancer. During standard evaluation of the biochemical parameters of blood before the first administration of chemotherapy, 2 additional ml of blood were collected and the BDNF concentration was determined. Other data, including demographic data, as well as biochemical parameters and evaluation of the treatment results, were obtained from the medical history.

The inclusion criteria included: (1) histopathologically confirmed disseminated colorectal cancer, (2) indications for chemotherapy, (3) age between 18 and 80 and (d) written informed consent of the patient to participate in the study. The exclusion criteria included the lack of consent of the patient to participate in the study. After clarifying the purpose and principles of the study, all the individuals gave their informed and voluntary consent to be included in the study. The study was conducted with the consent of the Bioethics Committee of the Medical University of Silesia in Katowice (No. KNW/022/KB1/69/12).

The BDNF concentration was determined in serum obtained by collecting whole blood from the veins in the elbow crease in the morning on an empty stomach. After centrifuging the blood at 1000 x g for 15 minutes at +4°C, the obtained serum was separated into the described Eppendorf tubes and frozen at -75°C until the determinations were made. In all the subjects the BDNF concentration was determined by the immunoenzymatic method using a Cloud-Clone Corp. kit, catalogue number SEA011Hu. The determinations were made according to the manufacturer's protocol. The BDNF concentrations were determined based on a standard

Szlaki sygnałowe, m.in. kinazy 3-fosfatydilinozytolu (*Phosphatidylinositol-3-Kinase* – PI-3K), kinaz aktywowanych mitogenami (*Mitogen-Activated Protein Kinase* – MAPK) oraz kinazy białkowej C (*Protein Kinase C* – PKC), indukowane poprzez interakcję BDNF z TrkB stymulują proliferację, inwazję, przerzutowanie, neowaskularyzację oraz przeżycie komórek guza nowotworowego. Aktywowane przez BDNF ścieżki sygnałowe kinaz regulowanych sygnałami zewnątrzkomórkowymi (*Extracellular Signal Regulated Kinase* – ERK) oraz serynowo-treoninowej kinazy białkowej (*Serine/threonine Protein Kinase* – Akt) powodują dodatkowo oporność komórek nowotworu na działanie leków cytostatycznych [6,7,8]. Co więcej, linie komórkowe raka jelita grubego produkują endogenne BDNF i wraz z TrkB tworzą autokrynną pętlę pobudzającą proliferację i przeżycie komórek guza. W komórkach nowotworowych raka jelita grubego (RJG) obserwuje się również zwiększoną ekspresję BDNF w porównaniu z komórkami niezmiennymi nowotworowo, która związana jest ze złym rokowaniem i przebiegiem choroby [9].

Nadmierna ekspresja BDNF dotyczy głównie komórek nowotworowych, jednak czynnik ten obecny jest także w surowicy krwi. Niewiele prac badawczych podejmuje próbę skorelowania stężeń obwodowo krążącego BDNF, aby ocenić jego przydatność jako markera diagnostycznego i prognostycznego w RJG, choć nowotwór może w znacznym stopniu przyczynić się do zmian stężeń tej neurotrofiny w surowicy krwi [5].

MATERIAŁ I METODY

W badaniu udział wzięło 25 osób leczonych na Oddziale Onkologii z Pododdziałem Hematologicznym SPZOZ Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego nr 3 w Rybniku (ul. Energetyków 46, 44-200 Rybnik). Były to osoby z wcześniej rozpoznany i potwierdzonym klinicznie oraz histopatologicznie nowotworem jelita grubego. W trakcie standardowej oceny parametrów biochemicznych krwi przed pierwszorazowym podaniem chemioterapii dodatkowo pobrano 2 ml krwi, w której oznaczono stężenie BDNF. Pozostałe dane, w tym demograficzne, parametry biochemiczne i ocenę wyników leczenia, uzyskano z historii choroby.

Kryteria włączenia obejmowały: 1) potwierdzony histopatologicznie rozsiały nowotwór jelita grubego, 2) wskazania do chemioterapii, 3) wiek od 18 do 80 r.ż. oraz d) pisemna świadoma zgoda pacjenta na udział w badaniu. Kryteriami wyłączenia był brak zgody pacjenta na udział w badaniu. Po wyjaśnieniu celu i zasad badania wszystkie osoby wyraziły świadomą i dobrowolną zgodę na włączenie do badania. Na jego przeprowadzenie uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej działającej przy Śląskim Uniwersytecie Medycznym w Katowicach (nr KNW/022/KB1/69/12).

Stężenie BDNF oznaczano w surowicy krwi uzyskanej przez pobranie krwi pełnej z żył zagięcia łokciowego w godzinach rannych na czczo. Po odwirowaniu krwi



curve prepared for the series of dilutions available in the standard kit (recombinant human BDNF). Measurements of absorbance in the tested samples were performed with a Mindray MW-12A apparatus at 450 nm wavelength. The sensitivity of the kit was 0.068 ng/ml. The intra-serial and inter-serial errors were below 10% and below 12%, respectively.

Statistical analysis was conducted using Statistica 12 and MS Excel 2013. The values calculated for quantitative variables are presented as the arithmetic mean with standard deviation (SD) or as a percentage. Differences between two averages were verified by Student's t-test for independent samples. Non-parametric data were analysed using the Kruskal-Wallis test. Spearman's rank correlation coefficient was used to assess correlation. The value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

The study involved 25 people aged from 35 to 77 (median 65). Among the respondents, 20% were women and 80% men. The mean body weight was 79.28 ± 13.65 kg and the height 167.16 ± 8.51 cm. The body mass index (BMI) before treatment was 28.34 ± 4.13 kg/m², while after treatment 28.40 ± 4.41 kg/m². It was found that the BDNF concentration in the studied group of patients was 50.24 ± 23.37 ng/ml (Table I).

It was shown that the BDNF concentration increased slightly with age, but the results were not statistically significant (R Spearman = 0.268; $p = 0.194$) (Fig. 1). It was found that the BDNF concentration (R Spearman = 0.3438; $p = 0.09$) rose with an increase in BMI (before the treatment); the obtained correlations were not statistically significant (Fig. 2).

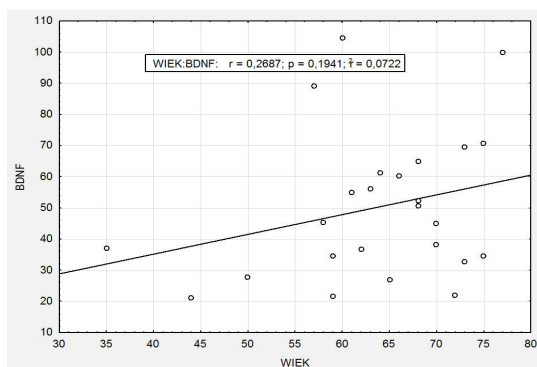


Fig. 1. Correlation between patients' age and BDNF concentration

Ryc. 1. Zależność pomiędzy wiekiem pacjentów a stężeniem BDNF.

The age, body weight and height, BMI and BDNF concentration did not differ significantly between women and men (Tab. II).

No significant differences were found between operated and non-operated patients in terms of age, body weight, height and BMI before and after treatment. The concentrations of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AspAT) and carcinoembryonic antigen (CEA) did not differ significantly.

w warunkach 1000 x g, przez 15 min w temp. +4°C, uzyskano surowicę, którą rozdzielono do opisanych próbek typu Eppendorf i zamrażano w temp. -75°C do czasu wykonania oznaczeń. U wszystkich badanych wykonano oznaczenia stężenia BDNF metodą immunoenzymatyczną za pomocą zestawu firmy Cloud-Clone Corp. o numerze katalogowym SEA011Hu, zgodnie z protokołem producenta. Stężenia BDNF wyznaczono na podstawie krzywej standardowej sporządzonej dla szeregu rozcieńczeń dostępnych w zestawie standardów (rekombinowany ludzki BDNF). Pomiar absorbancji w badanych próbkach przeprowadzono z zastosowaniem aparatu Mindray MW-12A przy długości fali 450 nm. Czułość kitu wynosiła 0,068 ng/ml. Błąd wewnątrzserijny i międzyseryjny wynosił odpowiednio poniżej 10% i poniżej 12%.

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 12 oraz MS Excel 2013. Wartości obliczone dla zmiennych ilościowych przedstawiono jako średnią arytmetyczną z odchyleniem standardowym (SD) lub w procentach. Różnice pomiędzy dwiema średnimi weryfikowano testem t-Studenta dla prób niezależnych. Dane nieparametryczne analizowano testem Kruskala-Wallisa. Do oceny korelacji wykorzystano test Spearmana. Za znamienne statystycznie przyjęto wartość $p < 0,05$.

WYNIKI

W badaniu udział wzięło 25 osób w wieku od 35 do 77 lat (mediana 65). Spośród badanych 20% stanowiły kobiety a 80% mężczyźni. Średnia masa ciała wynosiła $79,28 \pm 13,65$ kg, natomiast wysokość $167,16 \pm 8,51$ cm. Wskaźnik masy ciała (Body Mass Index, BMI) przed leczeniem wynosił $28,34 \pm 4,13$ kg/m², po leczeniu $28,40 \pm 4,41$ kg/m². Stwierdzono, że stężenie BDNF w badanej grupie chorych wynosiło $50,24 \pm 23,37$ ng/ml (tab. I).

Wykazano, że wraz z wiekiem nieznacznie zwiększało się stężenie BDNF, jednak uzyskane rezultaty nie były znamienne statystycznie (R Spearman = 0,268; $p = 0,194$ – ryc. 1). Stwierdzono, że wraz ze wzrostem BMI (przed leczeniem) rosło stężenie BDNF (R Spearman = 0,3438; $p = 0,09$), przy czym uzyskane zależności nie były znamienne statystycznie (ryc. 2).

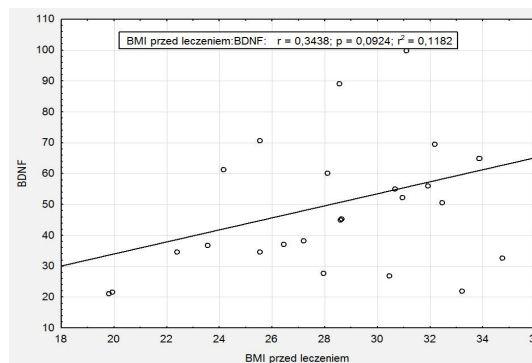


Fig. 2. Correlation between BMI (before treatment) and BDNF concentration.

Ryc. 2. Zależność pomiędzy BMI (przed leczeniem) a stężeniem BDNF.



However, it was shown that the BDNF concentration was significantly higher in the patients in whom the primary tumour was removed before chemotherapy (CHTH) (as compared to non-operated patients); the opposite correlation was observed in the case of lactate dehydrogenase (LDH) and C-reactive protein (CRP) (Tab. III).

A negative correlation was found between BDNF and LDH, i.e. the BDNF concentration decreased with an

Wiek, masa i wysokość ciała, BMI oraz stężenie BDNF nie różniły się istotnie pomiędzy kobietami i mężczyznami (tab. II).

Nie stwierdzono znamienych różnic pod względem wieku, masy i wysokości ciała oraz BMI przed i po leczeniu pomiędzy pacjentami operowanymi i nieoperowanymi. Również stężenia aminotransferazy alaninowej (*Alanine Aminotransferase* – ALT), aminotransferazy asparaginianowej (*Aspartate Aminotransferase*

Table I. Demographic data and other indicators of studied patient population

Tabela I. Dane demograficzne oraz inne wskaźniki badanej populacji chorych

	n	Mean/ Średnia	Median/ Mediana	Min	Max	25th quartile/25th kwartyl	75th quartile/75th kwartyl	SD	
Gender/Płeć	women/kobiety	5 (20%)							
	men/mężczyźni	20 (80%)							
Age (years)/Wiek (lata)	25	63.68	65.00	35.00	77.00	59.00	70.00	9.92	
Body mass (kg)/Masa ciała (kg)	25	79.28	77.30	51.30	110.00	70.50	87.70	13.65	
Height (cm)/Wysokość (cm)	25	167.16	167.00	151.00	182.00	161.00	173.00	8.51	
BMI (kg/m ²)	before CHTH (I)/ przed CHTH (I)	25	28.34	28.60	19.79	34.74	25.53	31.09	4.13
	after CHTH (II)/ po CHTH (II)	25	28.40	29.82	15.81	34.15	25.59	31.64	4.41
	difference (I-II)/ różnica (I-II)	25	-0.06	-1.22	3.98	0.59	-0.06	-0.55	-0.28
BDNF (ng/ml)	25	50.24	45.29	21.01	104.48	34.43	61.4	23,37	

Table II. Analysis of selected variables in women and men

Tabela II. Analiza wybranych zmiennych u kobiet i mężczyzn

	Men (n = 20)/Mężczyźni (n = 20)		Women (n = 5)/Kobiety (n = 5)		P	
	mean/średnia	SD	mean /średnia	SD		
Age (years)/Wiek (lata)	62.95	10.71	66.60	5.64	0.221	
Body mass (kg)/Masa ciała (kg)	79.40	12.99	78.80	17.78	0.313	
Height (cm)/Wysokość (cm)	168.70	6.95	161.00	12.06	0.088	
BMI (kg/m ²)	before CHTH (I)/przed CHTH (I)	27.91	4.41	30.06	2.29	0.212
	after CHTH (II)/po CHTH (II)	27.97	4.72	30.11	2.52	0.232
	difference (I-II)/różnica (I-II)	-0.06	1.51	-0.04	1.16	0.982
BDNF (ng/ml)	49.58	21.94	52.83	31.27	0.261	

Table III. Analysis of selected variables in operated and non-operated patients

Tabela III. Analiza wybranych zmiennych u pacjentów operowanych i nieoperowanych

	Operated (n =16)/Operowani (n = 16)		Non-operated (n = 9)/Nieoperowani (n = 9)		P	
	mean/średnia	SD	mean/średnia	SD		
Age (years)/Wiek (lata)	65.43	7.40	60.55	13.24	0.245	
Body mass (kg)/Masa ciała (kg)	79.63	9.67	78.65	19.57	0.868	
Height (cm)/Wysokość (cm)	166.37	8.15	168.55	9.43	0.549	
BMI (kg/m ²)	before CHTH/przed CHTH	28.83	3.38	27.48	5.33	0.445
	after CHTH/po CHTH	29.10	3.33	27.16	5.91	0.302
LDH (IU/l)	212.22	74.73	329.27	193.51	< 0.01	
AspAT (IU/l)	21.27	13.09	25.16	17.18	0.530	
ALT (IU/l)	20.79	11.62	24.37	17.90	0.548	
CEA (ng/ml)	400.78	1490.56	790.20	1801.37	0.566	
CRP (mg/l)	9.71	12.71	42.15	30.35	< 0.01	
BDNF (ng/ml)	59.28	23.60	34.15	11.76	< 0.01	



increase in the LDH concentration; the obtained correlation was at the limit of statistical significance ($p = 0.079$; Fig. 3). A negative correlation was found between BDNF and CRP, i.e. the BDNF concentration decreased with an increase in the CRP concentration; the obtained correlation was statistically significant ($p < 0.05$; Fig. 4).

It was found that after 6 cycles of chemotherapy partial remission (PR) of the disease occurred in 28% of patients, stabilisation (stable disease – SD) in 60% and progression (progressive disease – PD) in 12% of the patients (Fig. 5).

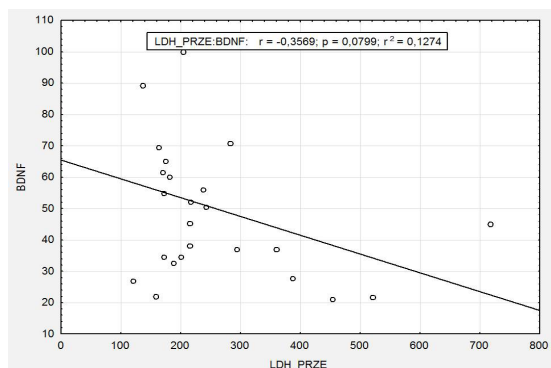


Fig. 3. Correlation between LDH and BDNF concentrations.

Ryc. 3. Zależność pomiędzy stężeniami LDH i BDNF.

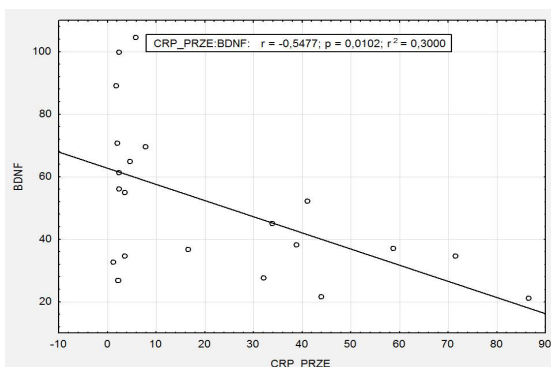


Fig. 4. Correlation between CRP and BDNF concentrations.

Ryc. 4. Korelacja pomiędzy stężeniami CRP a BDNF.

No differences were found in the BDNF concentration (measured before the start of CHTH) and clinical response to treatment (Tab. IV).

DISCUSSION

The first evidence of BDNF presence in serum and plasma appeared in scientific reports more than 20 years ago. The differentiated synthesis and release of BDNF are associated with various diseases. To this very day, researchers have been trying to identify the processes of regulation and function of peripherally circulating BDNF. Lommazsch et al. [10] studied the concentration of the neurotrophin in a group of 140 healthy subjects, aged 20–60 years. The average BDNF concentration in serum amounted to 22.6 ng/ml. Shimizu et al. [11] ana-

– AspAT) i antygenu rakowo-łódkowego (*Carcinoembryonic Antigen – CEA*) nie różniły się istotnie.

Wykazano natomiast, że stężenie BDNF było znacznie wyższe u chorych, którym przed chemioterapią (*Chemotherapy – CHTH*) usunięto guza pierwotnego (w porównaniu z pacjentami nieoperowanymi); odwrotną zależność zaobserwowano w przypadku dehydrogenazy mleczanowej (*Lactate Dehydrogenase – LDH*) i białka C-reaktywnego (*C-Reactive Protein – CRP*) – tabela III.

Stwierdzono ujemną korelację pomiędzy BDNF i LDH, tj. wraz ze wzrostem stężenia LDH zmniejszało się stężenie BDNF, a uzyskana zależność była na granicy znamienności statystycznej ($p = 0,079$; ryc. 3). Stwierdzono ujemną korelację pomiędzy BDNF i CRP, tj. wraz ze wzrostem stężenia CRP zmniejszało się stężenie BDNF, a uzyskana zależność była znamienna statystycznie ($p < 0,05$; ryc. 4).

Stwierdzono, że po 6 cyklach chemioterapii u 28% badanych wystąpiła częściowa remisja choroby (*Partial Remission – PR*), u 60% stabilizacja (*Stable Disease – SD*), natomiast u 12% jej progresja (*Progressive Disease – PD*) – ryc. 5.

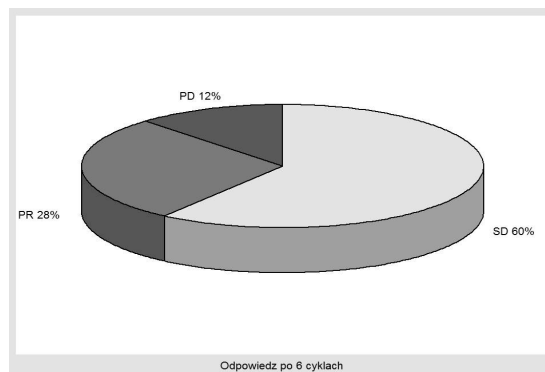


Fig. 5. Clinical response after 6 cycles of chemotherapy.

Ryc. 5. Odpowiedź kliniczna po 6 cyklach chemioterapii.

Nie wykazano różnic w stężeniu BDNF (oznaczanego przed rozpoczęciem CHTH) a odpowiedzią kliniczną na zastosowane leczenie (tab. IV).

DYSKUSJA

Pierwsze dowody wskazujące na obecność BDNF w surowicy i osoczu krwi pojawiły się w doniesieniach naukowych ponad 20 lat temu. Zróżnicowana synteza i uwalnianie BDNF mają związek z różnymi schorzeniami. Do dzisiejszego dnia badacze próbują zidentyfikować procesy regulacji i funkcji krążącego obwodowo BDNF. Lommazsch i wsp. [10] zbadali stężenia tej neurotrofiny w grupie 140 zdrowych osób w wieku 20–60 lat. Średnie stężenie BDNF w surowicy krwi wyniosło 22,6 ng/ml. Shimizu i wsp. [11] analizowali stężenie BDNF u 50 zdrowych osób, które wyniosło $27,7 \pm 11,4$ ng BDNF/ml. Podobne wyniki, tj. $26,5 \pm 7$ ng/ml oraz $25,3 \pm 15$ ng/ml, uzyskali inni autorzy [12,13]. Niższe stężenia zanotowali natomiast Toyooka i wsp. [14] $11,4 \pm 7,7$ ng/ml ($n = 35$), Noga i wsp. [15]



Table IV. BDNF concentration in patients depending on treatment response

Tabela IV. Stężenie BDNF u pacjentów w zależności od odpowiedzi na leczenie

Response to treatment / Odpowiedź na leczenie	Stabilisation (SD) (n=15)/ Stabilizacja (SD) (n = 15)		Partial response (PR) (n = 7)/Częściowa odpowiedź (PR) (n = 7)		Progression (PD) (n = 3)/ Progresja (PD) (n = 3)		Kruskal-Wallis test/Test Kruskala- Wallisa	p
	median/ mediana	mean / średnia	median/ mediana	mean/średnia	median / mediana	mean/średnia		
BDNF (ng/ml)	37,00	50,78	54,78	49,98	44,95	48,10	H = 0,326	0,849

lysed the BDNF concentration in 50 healthy subjects and it reached 27.7 ± 11.4 ng BDNF/ml. Similar results, namely 26.5 ± 7 ng/ml and 25.3 ± 15 ng/ml were obtained by other authors. On the other hand, lower concentrations were reported by Toyooka et al. [14] 11.4 ± 7.7 ng/ml (n = 35), Noga et al. [15] 17.3 ± 1.6 ng/ml (n = 20) and Rosenfeld et al. [16] 18.9 ± 5.7 ng/ml.

It was also found that the BDNF concentration decreases with age [10,17]. When considering gender as the differentiating factor, it was found that it mainly concerns women, whilst in men it remains at similar level. The neurotrophin concentration decline in women may be a result of the effect of oestrogens on BDNF synthesis. The post-menopausal decrease in oestrogen levels results in a significant decline in BDNF concentration in women [18,19]. The studies of Pillai et al. [20] demonstrated a lower BDNF concentration in serum of depression-affected women than men. It may be added that available literature contains materials presenting opposing results. Thus, Lang et al. [21] analysed the serum BDNF concentrations in 64 healthy men and 54 women aged from 29 to 55. The concentration of this neurotrophin correlated positively with age but did not differ in terms of gender. Laske et al. [22] demonstrated no correlation between age or gender and serum BDNF concentrations in 41 fibromyalgia patients. Similarly, Shimizu et al. [23] did not notice a correlation between serum BDNF levels and age in a group of 33 depressed patients. No correlation between the BDNF concentration and gender or age was observed in our study.

Evaluation of the correlation between the expression of BDNF and the development of neurological diseases and malignant neoplasms of the nervous system has also become the subject of many studies. The latest research results indicate the presence of endogenous expression of BDNF also in non-neuronal tumour cells. Increasingly more scientific evidence confirms the role of BDNF in the proliferation, invasion and metastasis of malignancies such as breast cancer, ovarian cancer, lung cancer, prostate cancer, hepatocellular cancer, pancreatic cancer, bladder cancer, melanoma, multiple myeloma and colorectal cancer [5,24].

Yang et al. [7] attempted to analyse BDNF expression in 66 samples from tumours and 88 samples from adjacent healthy tissue of patients with colorectal cancer. Additionally, the expression of this neurotrophin was studied in three cell lines of colorectal cancer. The BDNF expression was significantly higher in the tumour cells than in the healthy tissue cells. A positive correlation between increased expression of BDNF and differentiation of colorectal tumours was also observed in the

17.3 ± 1.6 ng/ml (n = 20) oraz Rosenfeld i wsp. [16] 18.9 ± 5.7 ng/ml.

Stwierdzono ponadto, że stężenie BDNF maleje wraz z wiekiem [10,17], przy czym – uwzględniając płeć jako czynnik różnicujący – stwierdzono, że głównie dotyczy to kobiet, zaś u mężczyzn pozostaje na podobnym poziomie. Możliwym wytłumaczeniem spadku stężenia neurotrofiny u kobiet jest wpływ estrogenów na syntezę BDNF. Pomenopauzalny spadek stężenia estrogenów skutkuje znacznym obniżeniem stężenia BDNF u kobiet [18,19]. W badaniu Pillai i wsp. [20] zaobserwowano niższe stężenia BDNF w osoczu chorujących na depresję kobiet niż mężczyzn. Warto dodać, że w dostępnym piśmiennictwie można doszukać się przeciwnych wyników. Lang i wsp. [21] przeanalizowali stężenia BDNF w surowicy 64 zdrowych mężczyzn i 54 kobiet w wieku 29–55 lat, stwierdzając, że korelowały one dodatkowo z wiekiem, ale nie różniły się pod względem płci. Laske i wsp. [22] nie wykazali zależności pomiędzy wiekiem i płcią a stężeniem BDNF w surowicy krwi 41 osób chorujących na fibromialgię. Podobnie Shimizu i wsp. [23] nie zauważyli związku pomiędzy stężeniem BDNF w surowicy krwi a wiekiem w grupie 33 osób chorujących na depresję. W badaniu własnym również nie zaobserwowano zależności pomiędzy stężeniem BDNF a płcią i wiekiem.

Przedmiotem wielu badań stała się także ocena zależności pomiędzy ekspresją BDNF a rozwojem schorzeń neurologicznych oraz nowotworów złośliwych układu nerwowego. Najnowsze wyniki prac badawczych wskazują na obecność endogennej ekspresji BDNF również w nieneuronalnych komórkach nowotworowych. Coraz więcej dowodów naukowych potwierdza rolę tej neurotrofiny w proliferacji, inwazji i przerzutowaniu nowotworów złośliwych, takich jak rak piersi, jajników, płuc, prostaty, wątrobowokomórkowy, płuc, trzustki, pęcherza moczowego, czerniak, szpiczak mnogi czy rak jelita grubego [5,24].

Yang i wsp. [7] podjęli próbę analizy ekspresji BDNF w 66 wycinkach pobranych z guza oraz 88 wycinkach sąsiadującej tkanki zdrowej należących do pacjentów chorych na RJG. Dodatkowo ekspresję tej neurotrofiny zbadano w trzech liniach komórkowych RJG. Ekspresja BDNF była istotnie większa w komórkach nowotworowych niż komórkach tkanki zdrowej. W badanych tkankach zauważono także dodatnią korelację pomiędzy wzrostem ekspresji BDNF a zróżnicowaniem guzów jelita grubego. Zwiększona ekspresja BDNF wiązała się również z gorszym rokowaniem. Jeżeli chodzi o linie komórkowe, to wszystkie trzy wykazały silną ekspresję BDNF. Co ważne, zmniejszenie ekspresji



studied tissues. Increased BDNF expression was also associated with a worse prognosis. As far as cell lines are concerned, all three showed strong BDNF expression. Importantly, a reduction in the expression of this neurotrophin using anti-BDNF ribozymes in colorectal cancer cell lines resulted in inhibition of the proliferation and induction of apoptosis. Brunetto de Farias et al. [25] also analysed the expression of BDNF in tumour tissue samples in 30 colorectal cancer patients. BDNF was found in 93.3% of the preparations. Quantitative evaluation of BDNF protein revealed a higher level of BDNF in cancer cells than in neighbouring healthy tissues.

Akil et al. [9] conducted a study on tumour and non-cancer tissue material from 16 patients with diagnosed colorectal cancer and four human cell lines of colorectal cancer. The control group consisted of 4 patients. The expression of both BDNF and the TrkB receptor was higher in the cell lines and cells of the tumour than in the healthy and control tissues. These results indicate the potential prognostic and therapeutic value of this neurotrophin.

Recent studies have shown that cancer may significantly contribute to changes in serum BDNF levels [26]. Brierley et al. [5] examined two cohorts, each consisting of a control group and a group of over 90 patients with diagnosed colorectal cancer. In the first cohort, the serum BDNF concentrations were significantly decreased in the patients (median – 18.8 ng/ml) compared to the healthy control subjects (median – 23.4 ng/ml). This result was confirmed in the second cohort where the mean BDNF concentration in the group of patients with colorectal cancer was lower than in the control group. Taking into account scientific studies confirming the excessive expression of BDNF in tumour cells, the results of the cited researchers may suggest that the concentrations of peripherally circulating BDNF do not reflect changes in the tumour microenvironment. In one of the authors' own studies, the BDNF concentration was significantly higher and amounted to 50.24 ± 23.37 ng/ml, of which 49.58 ± 21.94 ng/ml in men and 52.83 ± 31.27 ng/ml in women ($p = 0.261$). This result may be influenced by a number of factors, including the number of subjects tested, the severity of the disease and the methodological differences in determining BDNF.

BDNF plays a key role in maintaining energy homeostasis, regulating appetite and maintaining of proper body weight. In their reports, Lommatzsch et al. [10] showed a correlation between body weight gain and a decreased BDNF concentration in the plasma of 140 healthy individuals. An 8-year-old girl with chromosomal inversion including the BDNF gene had lower plasma neurotrophin levels in comparison to the control group matched in terms of age and BMI. Moreover, the child suffered from obesity, hyperphagia and had a complex neurobehavioral phenotype [27]. The most frequently studied *BDNF* gene polymorphism (Val66Met) is associated with the presence of methionine in 66 positions of the polypeptide chain. This reduces the secretion of neurotrophin outside the cell. Gunstad et al. [28] stu-

tej neurotrofyny przy użyciu rybozymów anti-BDNF w liniach komórkowych raka jelita grubego skutkowało zahamowaniem proliferacji oraz indukcją apoptozy. Również Brunetto de Farias i wsp. [25] analizowali ekspresję BDNF w próbkach tkanek guza u 30 pacjentów chorych na raka jelita grubego. BDNF stwierdzono w 93,3% preparatów. Ilościowa ocena białka BDNF ujawniła wyższy poziom BDNF w komórkach raka niż w sąsiednich, zdrowych tkankach.

Akil i wsp. [9] prowadzili badania nad materiałem pobranym z guza oraz tkanki nienowotworowej pochodzącym od 16 pacjentów ze zdiagnozowanym RJG i czterema ludzkimi liniami komórkowymi raka jelita grubego. Grupę kontrolną stanowiło 4 pacjentów. Ekspresja zarówno BDNF, jak i receptora TrkB była wyższa w liniach komórkowych i komórkach guza niż w tkankach zdrowych oraz kontrolnych. Wyniki te wskazują na potencjalną wartość prognostyczną i terapeutyczną tej neurotrofyny.

Badania ostatnich lat wykazały, że nowotwór może w znacznym stopniu przyczynić się do zmian stężeń BDNF w surowicy krwi [26]. Brierley i wsp. [5] przebadali dwie kohorty, każdą złożoną z grupy kontrolnej i grupy ponad 90 pacjentów ze zdiagnozowanym RJG. W pierwszej kohorcie stężenia BDNF w surowicy były znacząco obniżone u pacjentów chorych (mediana – 18,8 ng/ml) w porównaniu ze zdrowymi osobami z grupy kontrolnej (mediana – 23,4 ng/ml). Ten wynik potwierdził się w drugiej kohorcie, gdzie średnie stężenie BDNF w grupie osób z RJG było niższe niż w grupie kontrolnej. Biorąc pod uwagę prace naukowe potwierdzające nadmierną ekspresję BDNF w komórkach guza, wyniki cytowanych badaczy mogą sugerować, że stężenia krążącego obwodowo BDNF nie odzwierciedlają zmian w mikrośrodkowisku guza. W badaniu własnym wykazano, że stężenie BDNF było znacznie wyższe i wyniosło $50,24 \pm 23,37$ ng/ml, z czego u mężczyzn $49,58 \pm 21,94$ ng/ml oraz u kobiet $52,83 \pm 31,27$ ng/ml ($p = 0,261$). Wpływ na taki wynik może mieć wiele czynników, w tym liczba przebadanych osób, zaawansowanie choroby oraz różnice metodyczne w oznaczaniu BDNF.

BDNF odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy energetycznej, regulacji apetytu i utrzymaniu prawidłowej masy ciała. Lommatzsch i wsp. [10] w swoich doniesieniach wykazali związek pomiędzy przyrostem masy ciała a zmniejszonym stężeniem BDNF w osoczu 140 zdrowych osób. U 8-letniej dziewczynki z chromosomalną inwersją obejmującą gen *BDNF* odnotowano niższe stężenia neurotrofyny w osoczu krwi niż w dobranej pod względem wieku oraz wskaźnika BMI grupie kontrolnej. Dodatkowo u dziecka występowała otyłość, hiperfagia oraz złożony fenotyp neurobehavioralny [27]. Najczęściej badany polimorfizm genu *BDNF* (Val66Met) wiąże się z obecnością metioniny w 66 pozycji łańcucha polipeptydowego. Wpływa to na zmniejszenie wydzielania neurotrofyny poza komórkę. Gunstad i wsp. [28] badali związek pomiędzy wskaźnikiem BMI a polimorfizmem BDNF u 481 zdrowych dorosłych w wieku 18–82 lat. Badacze zaobserwowa-



died the correlation between the BMI and BDNF polymorphism in 481 healthy adults aged 18 to 82. The researchers observed lower BMI values in the healthy subjects with the Met66Met polymorphism compared to the Val66Met polymorphism. Pillai et al. [20] noted an inverse correlation between body weight and BDNF concentrations in the plasma of women with depressive disorders and of healthy women. A study by El-Gharbawa et al. [29] conducted among 224 obese children and 104 children with normal body weight did not show any correlation between the BMI and BDNF levels in serum. Similar conclusions were reached by other authors while examining 34 elderly people [30]. Nakzato et al. [31] did not show any correlation between the body mass index and BDNF concentration in serum in healthy subjects. It is possible that low levels of neurotrophin in patients with colorectal cancer may reflect a BMI value indicating obesity, which is one of the risk factors for sporadic colorectal cancer [5]. In our study, we observed an upward trend in the BDNF concentration in blood serum with an increasing BMI, but it was not statistically significant. Moreover, there was no correlation between the BDNF concentration and liver indicator enzymes or CEA marker. It was also observed that there were no differences in the BDNF concentration (determined before the start of CHTH) and clinical response to treatment. In other words, BDNF cannot be considered as a prognostic factor. Nonetheless, as indicated in studies by other authors, BDNF expression in a biopsy from a tumour may be a prognostic factor in women with breast cancer [32].

Importantly, this study found a negative correlation between BDNF and CRP as well as between BDNF and LDH, i.e. the BDNF concentration decreased with an increasing CRP or LDH concentration. The obtained results indicate that inflammation (CRP) and a high tumour mass (high LDH) negatively influence BDNF secretion. The above correlates well with other results of this study, i.e. the BDNF concentration was significantly higher in patients with primary tumour resection before CHTH (compared to non-operated patients). There is no data on this subject in the available literature.

CONCLUSIONS

1. There was no correlation between the BDNF concentration and age, gender, BMI, CEA marker or liver enzymes in patients with colorectal cancer.
2. A negative correlation was found between BDNF and CRP and BDNF and LDH.
3. It was shown that the BDNF concentration was significantly higher in patients with colorectal cancer, in whom the primary tumour was removed before the administration of CHTH.
4. No differences were found in the BDNF concentration (before the administration of CHTH) and the clinical response to treatment.
5. BDNF cannot constitute a prognostic factor in patients with colorectal cancer.

li niższe wartości wskaźnika BMI u zdrowych osób z polimorfizmem Met66Met w porównaniu z osobami z polimorfizmem Val66Met. Pillai i wsp. [20] zauważyli odwrotną korelację pomiędzy masą ciała a stężeniem BDNF w osoczu krwi kobiet chorujących na zaburzenia depresyjne oraz kobiet zdrowych. W badaniu El-Gharbawy i wsp. [29], przeprowadzonym w grupie 224 otyłych dzieci oraz 104 z prawidłową masą ciała, nie wykazano zależności pomiędzy wskaźnikiem BMI a stężeniem BDNF w surowicy krwi. Do podobnych wniosków doszli inni autorzy, badając grupę 34 osób w wieku podeszłym [30]. Nakzato i wsp. [31] nie wykazali korelacji pomiędzy wskaźnikiem masy ciała a stężeniem BDNF w surowicy osób zdrowych. Istnieje możliwość, że niskie stężenia neurotrofiny u pacjentów z rakiem jelita grubego mogą odzwierciedlać wartość wskaźnika BMI wskazującą otyłość, która jest jednym z czynników ryzyka sporadycznego raka jelita grubego [5]. W badaniu własnym zaobserwowano trend wzrostowy stężenia BDNF w surowicy krwi wraz ze wzrostem wskaźnika BMI, jednak nie był on istotny statystycznie. Nie wykazano również zależności pomiędzy stężeniami BDNF i enzymów wskaźnikowych wątroby oraz markerem CEA. Zaobserwowano także, że nie ma różnic w stężeniu BDNF (oznaczanego przed rozpoczęciem CHTH) a odpowiedzią kliniczną na zastosowane leczenie. Innymi słowy BDNF nie może być uznany za czynnik prognostyczny. Jak wskazują badania innych autorów, ekspresja BDNF w biopsjach uzyskanych z guza może być czynnikiem prognostycznym u kobiet z rakiem piersi [32].

Co ważne, w niniejszej pracy stwierdzono ujemną korelację pomiędzy BDNF i CRP oraz BDNF i LDH, tzn. że wraz ze wzrostem stężenia CRP lub LDH zmniejszało się stężenie BDNF. Uzyskane wyniki wskazują na negatywny wpływ stanu zapalnego (CRP) oraz dużej masy guza (wysokie LDH) na sekrecję BDNF. Powyższe dobrze koresponduje z innymi wynikami tej pracy, a mianowicie stężenie BDNF było znamienne wyższe u chorych, u których przed CHTH usunięto guza pierwotnego (w porównaniu z pacjentami nieoperowanymi). W dostępnym piśmiennictwie brak jest jakichkolwiek danych na ten temat.

WNIOSKI

1. Nie wykazano zależności pomiędzy wiekiem, płcią, wskaźnikiem BMI, markerem CEA oraz enzymami wskaźnikowymi wątroby a stężeniem BDNF u pacjentów z RJG.
2. Stwierdzono ujemną korelację pomiędzy BDNF i CRP oraz BDNF i LDH.
3. Wykazano, że stężenie BDNF było znamienne wyższe u chorych z RJG, u których przed rozpoczęciem CHTH usunięto guza pierwotnego.
4. Nie wykazano różnic w stężeniu BDNF przed rozpoczęciem CHTH a odpowiedzią kliniczną na zastosowane leczenie.
5. BDNF nie może być czynnikiem prognostycznym u chorych z rakiem jelita grubego.

**Author's contribution**

Study design – M. Olborska, G. Słomian, P. Nowak
Data collection – A. Głogowska-Gruszka, G. Słomian, M. Buczkowska
Data interpretation – M. Olborska, P. Nowak
Statistical analysis – P. Nowak
Manuscript preparation – A. Głogowska-Gruszka, R. Szkilnik
Literature research – M. Olborska, R. Szkilnik

REFERENCES

1. Żelobowska K., Gumprecht J., Grzeszczak W. Neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF) – udział w patogenie insulinooporności i cukrzycy typu 2. *Przew. Lek.* 2007; 4: 79–83.
2. Khan N., Smith M.T. Neurotrophins and Neuropathic Pain: Role in Pathobiology. *Molecules* 2015; 20(6): 10657–10688, doi: 10.3390/molecules200610657.
3. Urbaniak A. Receptor p75^{NTR} – rola w procesach wzrostu i śmierci komórki. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2012; 66: 304–310.
4. Cunha C., Brambilla R., Thomas K.L. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol. Neurosci.* 2010; 3(1): 1–14, doi: 10.3389/fnro.02.001.2010. eCollection 2010.
5. Brierley G., Priebe I., Purins L., Fung K., Tabor B., Lockett T., Nice E., Gibbs P., Tie J., McMurrick P., Moore J., Ruszkiewicz A., Burgess A., Cosgrove L.J. Serum concentrations of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) are decreased in colorectal cancer patients. *Cancer Biomark.* 2013; 13(2): 67–73, doi: 10.3233/CBM-130345.
6. Roesler R., de Farias C.B., Abujamra A.L., Brunetto A.L., Schwartzmann G. BDNF/TrkB signaling as anti-tumor target. *Expert Rev. Anticancer Ther* 2011; 11(10): 1473–1475, doi: 10.1586/era.11.150.
7. Yang X., Martin T.A., Jiang W.G. Biological influence of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on colon cancer cells. *Exp. Ther. Med.* 2013; 6(6): 1475–1481, doi: 10.3892/etm.2013.1330.
8. Sarabi M., Perraud A., Mazouffre C., Nouaille M., Jauberteau M.O., Mathonnet M. Psychoactive drugs influence brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 4/5 levels in the serum of colorectal cancer patients. *Biomed. Rep.* 2017; 6(1): 89–94, doi: 10.3892/br.2016.801.
9. Akil H., Perraud A., Mélin C., Jauberteau M.O., Mathonnet M. Fine-tuning roles of endogenous brain-derived neurotrophic factor, TrkB and sortilin in colorectal cancer cell survival. *PLoS One* 2011; 6(9): e25097, doi: 10.1371/journal.pone.0025097. Epub 2011 Sep 26.
10. Lommatzsch M., Zingler D., Schuhbaeck K., Schloetcke K., Zingler C., Schuff-Werner P., Virchow J.C. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging* 2005; 26(1): 115–123, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.03.002.
11. Shimizu E., Hashimoto K., Okamura N., Koike K., Komatsu N., Kumakiri C., Nakazato M., Watanabe H., Shinoda N., Okada S., Iyo M. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol. Psychiatry* 2003; 54(1): 70–75, doi: 10.1016/s0006-3223(03)00181-1.
12. Karege F., Perret G., Bondolfi G., Schwald M., Bertschy G., Aubry J.M. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res.* 2002; 109(2): 143–148, doi: 10.1016/s0165-1781(02)00005-7.
13. Fujimura H., Altar C.A., Chen R., Nakamura T., Nakahashi T., Kambayashi J., Sun B., Tandon N.N. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost* 2002; 87(4): 728–734.
14. Toyooka K., Asama K., Watanabe Y., Muratake T., Takahashi M., Someya T., Nawa H. Decreased levels of brain-derived neurotrophic factor in serum of chronic schizophrenic patients. *Psychiatry Res.* 2002; 110(3): 249–257, doi: 10.1016/s0165-1781(02)00127-0.
15. Noga O., Hanf G., Schäper C., O'Connor A., Kunkel G. The influence of inhalative corticosteroids on circulating Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3 in allergic asthmatics. *Clin. Exp. Allergy* 2001; 31(12): 1906–1912, doi: 10.1046/j.1365-2222.2001.01249.x.
16. Rosenfeld R.D., Zeni L., Haniu M., Talvenheimo J., Radka S.F., Bennett L., Miller J.A., Welcher A.A. Purification and identification of brain-derived neurotrophic factor from human serum. *Protein Expr. Purif.* 1995; 6(4): 465–471, doi: 10.1006/prep.1995.1062.
17. Ziegenhorn A.A., Schulte-Herbrüggen O., Danker-Hopfe H., Malbranc M., Hartung H.D., Anders D., Lang U.E., Steinhagen-Thiessen E., Schaub R.T., Hellweg R. Serum neurotrophins—a study on the time course and influencing factors in a large old age sample. *Neurobiol. Aging* 2007; 28(9): 1436–1445, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.06.011.
18. Bus B.A., Tendolkar I., Franke B., de Graaf J., den Heijer M., Buitelaar J.K., Oude Voshaar R.C. Serum brain-derived neurotrophic factor: determinants and relationship with depressive symptoms in a community population of middle-aged and elderly people. *World J. Biol. Psychiatry* 2012; 13(1): 39–47, doi: 10.3109/15622975.2010.545187.
19. Scharfman H.E., MacLusky N.J. Estrogen and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus: complexity of steroid hormone-growth factor interactions in the adult CNS. *Front Neuroendocrinol* 2006; 27(4): 415–435, doi: 10.1016/j.yfrne.2006.09.004.
20. Pillai A., Bruno D., Sarreal A.S., Hernando R.T., Saint-Louis L.A., Nierenberg J., Ginsberg S.D., Pomara N., Mehta P.D., Zetterberg H., Blennow K., Buckley P.F. Plasma BDNF levels vary in relation to body weight in females. *PLoS One* 2012; 7(7): e39358, doi: 10.1371/journal.pone.0039358.
21. Lang U.E., Hellweg R., Gallinat J. BDNF serum concentrations in healthy volunteers are associated with depression-related personality traits. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29(4): 795–798, doi: 10.1038/sj.npp.1300382.
22. Laske C., Stransky E., Eschweiler G.W., Klein R., Wittorf A., Leyhe T., Richartz E., Köhler N., Bartels M., Buchkremer G., Schott K. Increased BDNF serum concentration in fibromyalgia with or without depression or antidepressants. *J. Psychiatr. Res.* 2007; 41(7): 600–605, doi: 10.1016/j.jpsy-chires.2006.02.007.
23. Shimizu E., Hashimoto K., Okamura N., Koike K., Komatsu N., Kumakiri C., Nakazato M., Watanabe H., Shinoda N., Okada S., Iyo M. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol. Psychiatry* 2003; 54(1): 70–75, doi: 10.1016/s0006-3223(03)00181-1.
24. Tanaka K., Okugawa Y., Toiyama Y., Inoue Y., Saigusa S., Kawamura M., Araki T., Uchida K., Mohri Y., Kusunoki M. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced tropomyosin-related kinase B (Trk B) signaling is a potential therapeutic target for peritoneal carcinomatosis arising from colorectal cancer. *PLoS One* 2014; 9(5): e96410, doi: 10.1371/journal.pone.0096410.
25. Brunetto de Farias C., Rosemberg D.B., Heinen T.E., Koehler-Santos P., Abujamra A.L., Kapczinski F., Brunetto A.L., Ashton-Prolla P., Meurer L., Reis Bogo M., Damin D.C., Schwartzmann G., Roesler R. BDNF/TrkB content and interaction with gastrin-releasing peptide receptor blockade in colorectal cancer. *Oncology* 2010; 79(5-6): 430–439, doi: 10.1159/000326564.
26. Yang Z.F., Ho D.W., Lau C.K., Tam K.H., Lam C.T., Yu W.C., Poon R.T., Fan S.T. Significance of the serum brain-derived neurotrophic factor and platelets in hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.* 2006; 16(6): 1237–1243.
27. Rosas-Vargas H., Martinez-Ezquerro J.D., Bienvenu T. Brain-derived neurotrophic factor, food intake regulation, and obesity. *Arch. Med. Res.* 2011; 42(6): 482–494, doi: 10.1016/j.arcmed.2011.09.005.
28. Gunstad J., Schofield P., Paul R.H., Spitznagel M.B., Cohen R.A., Williams L.M., Kohn M., Gordon E. BDNF Val66Met polymorphism is associated with body mass index in healthy adults. *Neuropsychobiology* 2006; 53(3): 153–156, doi: 10.1159/000093341.
29. El-Gharbawy A.H., Adler-Wailes D.C., Mirch M.C., Theim K.R., Ranzhofer L., Tanofsky-Kraff M., Yanovski J.A. Serum brain-derived neurotrophic factor concentrations in lean and overweight children and adolescents. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006; 91(9): 3548–3552, doi: 10.1210/jc.2006-0658.
30. Stanek K., Gunstad J., Leahey T., Glickman E., Alexander T., Spitznagel M.B., Juvancic Heltzel J., Murray L. Serum brain-derived neurotrophic factor is associated with reduced appetite in healthy older adults. *J. Nutr. Health Aging* 2008; 12(3): 183–185, doi: 10.1007/bf02982616.
31. Nakazato M., Hashimoto K., Shimizu E., Kumakiri C., Koizumi H., Okamura N., Mitsumori M., Komatsu N., Iyo M. Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in female patients with eating disorders. *Biol. Psychiatry* 2003; 54(4): 485–490, doi: 10.1016/s0006-3223(02)01746-8.
32. Patani N., Jiang W.G., Mokbel K. Brain-derived neurotrophic factor expression predicts adverse pathological & clinical outcomes in human breast cancer. *Cancer Cell. Int.* 2011; 11(1): 23, doi: 10.1186/1475-2867-11-23.