



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



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.