



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Zakład Chirurgii Stomatologicznej

Kierownik: dr hab. n. med. Grzegorz Trybek

al. Powstańców Wielkopolskich 72, 71-111 Szczecin

tel.: 91 4661736, fax: 91 4661766, e-mail: kzchstom@pum.edu.pl

POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
W SZCZECINIE
ZAKŁAD CHIRURGII STOMATOLOGICZNEJ
70-111 Szczecin, al. Powstańców Wlkp. 72
tel. +48 91 466 1736, fax +48 91 466 1736
e-mail: kzchstom@pum.edu.pl

Szczecin, 10.01.2022 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Gilmary Gomes de Assis

pt. „*The effect of the BDNF Val66Met polymorphism on BDNF expression and the counteract power of the exercise*”

Promotor: prof. dr hab. Paweł Ciężczyk

Neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF) to neurotrofina silnie ekspresjonowana w tkance nerwowej zarówno podczas rozwoju mózgu jak i potem, przez całe życie. Przypuszczalnie pełniąc rolę w synaptogenezie i neuroplastyczności, BDNF jest zaangażowany w podstawowe mechanizmy poznawcze i zachowanie, takie jak pamięć, nastrój, funkcje motoryczne i wykonawcze. Ostatnio zaobserwowano wpływ ćwiczeń na poziom BDNF w krwiobiegu oraz ich pozytywny wpływ na procesy poznawcze, co wykazano w zadaniach poznawczych.

Jednym z najczęściej badanych polimorfizmów w ludzkim genie BDNF jest Val66Met (rs 6265), mający wpływ na postać prekursorowej izoformy pro-BDNF, mającej kluczowe znaczenie dla funkcjonalności BDNF. Badania z zakresu genetyki psychiatrycznej wykazały większą częstość występowania genotypu Val/Met genu BDNF w subpopulacji z różnymi diagnozami neuropsychiatrycznymi w porównaniu z grupą kontrolną bez rozpoznania. Może to

sugerować zwiększoną podatność na rozwój choroby psychicznej u heterozygot Val/Met genu BDNF.

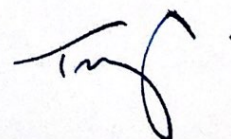
Przedstawiona mi do oceny dysertacja Pani Gilmary Gomes de Assis została napisana pod kierunkiem prof. dr hab. Pawła Cięszczyka w Akademii Wychowania Fizycznego i Sportu im. Jędrzeja Śniadeckiego w Gdańsku. Podstawę niniejszej rozprawy stanowi zbiór pięciu spójnych tematycznie artykułów, opublikowanych w czasopismach naukowych – Baltic Journal of Health and Physical Activity, Biomedical Journal of Scientific & Technical Research, Scientific Reports, Frontiers in Molecular Neuroscience oraz International Journal of Medical Sciences.

Doktorantka umiejętnie połączyła publikacje w jeden cykl, stanowiący rozprawę doktorską, który opatrzyła wstępem uzasadniającym wybór problemu naukowego jakim postanowiła się zająć oraz wprowadzającym czytelnika w zagadnienia będące tematem przeprowadzonych badań.

Zbiór artykułów pod wspólnym tytułem: „*The effect of the BDNF Val66Met polymorphism on BDNF expression and the counteract power of the exercise*”, stanowi integralną całość i porusza aktualną problematykę ekspresji BDNF w mózgu w związku z wysiłkiem fizycznym.

W skład cyklu prac wchodzi następujące publikacje:

1. **Gomes de Assis G, Cięszczyk P.** Exercise – A unique endogenous regulator of irisin, BDNF, leptin and cortisol against depression. *Balt J Health Phys Activ.* 2020;12(4):1-8. doi:10.29359/BJHPA.12.4.01
2. **Gilmara Gomes de Assis.** “BDNF and Neurodegeneration: The Rise of the Exercise as a Preventive Care”. *Biomed J Sci & Tech Res* 25(5)-2020. BJSTR. MS.ID.004265.
3. Murawska-Ciałowicz, Eugenia, **Gilmara Gomes de Assis**, Filipe Manuel Clemente, Yuri Feito, Petr Stastny, Jolanta Zuwała-Jagiełło, Bartosz Bibrowicz, and Paweł Wolański. 2021. “Effect of Four Different Forms of High Intensity Training on BDNF Response to Wingate and Graded Exercise Test.” *Scientific Reports* 11(1):8599. doi: 10.1038/s41598-021-88069-y.
4. **de Assis, Gilmara Gomes**, Jay R. Hoffman, Jacek Bojakowski, Eugenia Murawska-Ciałowicz, Paweł Cięszczyk, and Eugene V. Gasanov. 2021. “The Val66 and Met66 Alleles-Specific Expression of BDNF in Human Muscle and Their Metabolic Responsivity.” *Frontiers in Molecular Neuroscience* 14(May):1–12. doi: 10.3389/fnmol.2021.638176.



5. **de Assis GG, Hoffman JR, Gasanov EV.** BDNF Val66Met Polymorphism, the Allele-Specific Analysis by qRT-PCR - a Novel Protocol. *Int J Med Sci.* 2020;17(18):3058-3064. Published 2020 Oct 18. doi:10.7150/ijms.50643

Doktoranta w czterech wyżej wymienionych publikacjach jest pierwszym autorem. Dwie pierwsze publikacje są narracyjnymi przeglądami literatury, a pozostałe trzy są pracami badawczymi.

W opinii recenzenta taki układ prac jest właściwy, ponieważ pozwala na przedstawienie podstaw poruszanych w dysertacji tematów, kończąc pracami oryginalnymi, które pozwolą na analizę wyników badań własnych w odniesieniu do aktualnej literatury.

Głównym celem projektu realizowanego przez Doktorantkę było zbadanie powiązań pomiędzy Val66Met BDNF a poziomem reakcji adaptacyjnej organizmu na wykonywany wysiłek fizyczny.

Badania Doktorantki rozpoczęły się od obserwacji, pacjentów z zaawansowaną chorobą Parkinsona (stadium III i IV w skali Hohna i Yakra), którzy byli poddani terapii ruchem (4-tygodniowy program ćwiczeń aerobowych w wodzie). Przeprowadzone badania wykazały wzrost poziomu BDNF we krwi pod wpływem wykonywanego wysiłku. Skłoniło to Autorkę do podjęcia decyzji o kontynuowaniu badań nad BDNF i jego właściwościami fizjologicznymi, w tym potencjalnymi implikacjami polimorfizmu Val66Met BDNF, w ramach przewodu doktorskiego realizowanego w AWFIS.

W pierwszym badaniu Doktorantka podjęła się sprawdzenia hipotezy, czy wykonywany wysiłek fizyczny rzeczywiście wpływa na zwiększenie wydzielania BDNF. Grupa dorosłych ochotników realizowała specjalnie zaplanowany 9-tygodniowy program treningowy o wysokiej intensywności. Po zrealizowanym treningu przeprowadzono testy wydolności tlenowej (test VO2max) i beztlenowej (test Wingate), które potwierdziły zwiększone wydzielanie BDNF pod wpływem wysiłków aerobowych. Co ciekawe, zaobserwowano, że wydzielanie BDNF zmniejsza się wraz z poprawą kondycji fizycznej osób poddanych ćwiczeniu (wydzielanie BDNF było największe u osób najmniej aktywnych). Przeprowadzone z kolei testy wydolności beztlenowej wykazały, że wydzielanie BDNF zmniejsza się w warunkach stresu oksydacyjnego.

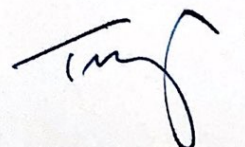
W kolejnej publikacji Autorka przeprowadziła badania, które miały na celu sprawdzenie

poziomu ekspresji BDNF w zależności od genotypowej postaci BDNF. Do badań przeprowadzonych wśród zdrowych, nietreningujących ochotników wykorzystano sondę molekularną do wykrywania produktów mRNA ze swoistych alleli BDNF (dodatnich lub ujemnych (+/-) dla polimorfizmu Val66Met). Wykazano, że do ekspresji BDNF dochodzi w przypadku obu alleli jednocześnie, przy czym u heterozygot Met66-BDNF ekspresja mRNA wynosi nie więcej niż $76,1 \pm 11,2\%$ ekspresji mRNA jaką można przypisać Val66-BDNF. Stosunek ten był niezależny od warunków metabolicznych. Przeprowadzona analiza parametrów z osocza potwierdziła także wcześniejsze spostrzeżenia, że stres oksydacyjny wpływa negatywnie na poziom ekspresji BDNF. Wykazano także brak korelacji pomiędzy poziomem ekspresji BDNF a poziomem BDNF w krwiobiegu.

Zrealizowane przez Doktorantkę badania zainspirowały ją do opracowania zupełnie nowego protokołu umożliwiającego wykrycie specyficznej ekspresji BDNF zależnej od allelu Val66Met. Do opracowania protokołu wykorzystano cDNA z mięśni 10 ochotników (pobór wykonany przed i po teście VO₂max). cDNA było podstawą do analizy RT-PCR ze specyficzną dla allelu próbką BDNF, zawierającą zhydrolizowane sondy (TaqMan) z systemem detekcji barwników fluorescencyjnych zarówno HEX (heksachlorofluoresceina), jak i FAM (6-karboksyfluoresceina) (odpowiednio dla kodowania produktów alleli Val66- i Met66-BDNF). Testy sondy ekspresji B2M opartej na HEX prowadzono równolegle, a krzywe topnienia stosowano jako kontrolę specyficzności produktu. Reakcje przeprowadzono w trzech powtórzeniach. W konsekwencji otrzymano udało się opracować efektywniejszą i tańszą metodę oznaczania ekspresji BDNF specyficznej dla poszczególnych alleli Val66Met.

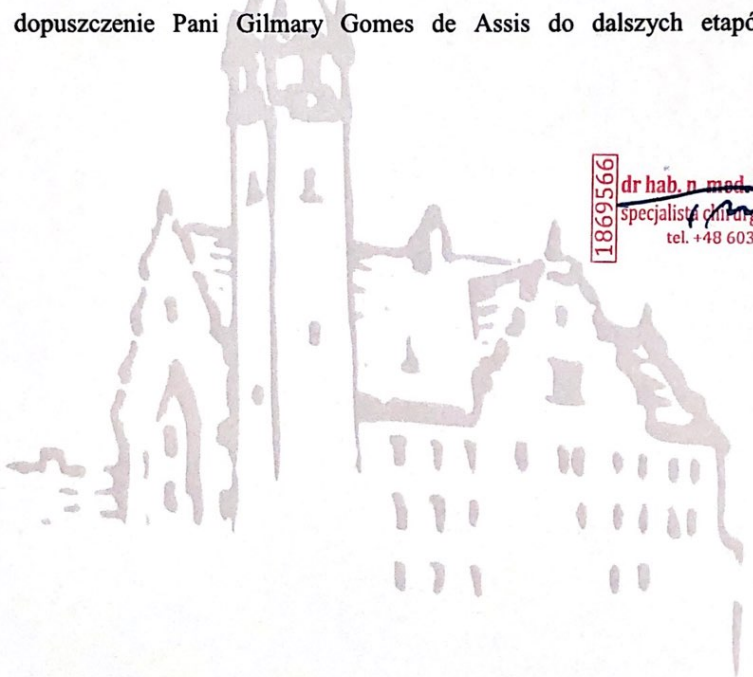
W opinii recenzenta w przedstawionej dysertacji zabrakło zbiorczego przedstawienia wniosków wynikających z przeprowadzonych badań.

Powyższe publikacje zostały przez Doktorantkę połączone w jeden cykl, który stanowi podstawę rozprawy doktorskiej. Przedstawiono streszczenie polskie i angielskie. Warto byłoby przedstawić objaśnienia skrótów i symboli użytych w pracy, także spis tabel i rycin. Doktorantka przedstawiła spis piśmiennictwa, jednakże publikacje wykorzystane przy opracowaniu dysertacji nie zostały ponumerowane. Powyższy cel badania, przedstawiony przez Doktorantkę został zrealizowany, a wyniki badań szczegółowo opisane w publikacjach naukowych. Doktorantka sformułowała trafne wnioski potwierdzające założony cel badania.



Reasumując, dysertacja Gilmary Gomes de Assis napisana jest poprawnie, w sposób właściwy porusza problematykę badanego tematu. Badania zostały zaplanowane, przeprowadzone i opisane w sposób prawidłowy. Doktorantka wykazała się wiedzą dotyczącą tematyki prowadzonych badań, zrealizowała cel pracy, uzyskane przez nią wyniki mają aspekt poznawczy i praktyczny. Przedstawione uwagi recenzenta nie wpływają na wartość merytoryczną i poznawczą pracy.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca pt. „*The effect of the BDNF Val66Met polymorphism on BDNF expression and the counteract power of the exercise*” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określonym w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym (art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2020 r., poz. 85 z późn. zm)). Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej AWF i S w Gdańsku o dopuszczenie Pani Gilmary Gomes de Assis do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



1869566 dr hab. n. med. Grzegorz Trybek
specjalista chirurgii stomatologicznej
tel. +48 603-621 689