

Prof. dr hab. Wojciech Czarny
Uniwersytet Rzeszowski
Kolegium Nauk Medycznych
Instytut Nauk o Kulturze Fizycznej

Rzeszów 05.01.2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru
artykułów naukowych Pani magister Gilmary Gomes de Assis
pt. „*Efekt polimorfizmu Val66Met genu BDNF na ekspresję BDNF a aktywność
fizyczna.*”

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

Obecnie zagadnienia dotyczące badań zależności pomiędzy treningiem, a poprawą lub podtrzymaniem prawidłowego funkcjonowania mózgu zdecydowanie zyskują na popularności. W ciągu ostatnich lat, odkąd pionierskie doświadczenia w przeszłości wykazały, że aktywność fizyczna zwiększa ekspresję BDNF w mózgu przeprowadzono wiele badań w celu ustalenia związku tego białka z poprawą nastroju i funkcji poznawczych u ludzi po zakończonym wysiłku fizycznym. Badania nad BDNF dały początek poszukiwaniu molekularnych zmian łączących pracę mięśni z komórkami nerwowymi, które powstają w odpowiedzi na aktywność fizyczną. BDNF wspólnie z innymi białkami, takimi jak czynnik wzrostu i różnicowania nerwów NGF oraz neurotrofinami (białkami wspierającymi tworzenie się synaps) umożliwia prawidłowe funkcjonowanie neuronów oraz prawidłowe działanie ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Nazywany jest on czynnikiem troficznym, który odżywia mózg i umożliwia jego prawidłową pracę.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani Gilmary Gomes de Assis dotyczy kompilacji prac w których opisano badania powiązań pomiędzy Val66Met BDNF, a poziomem reakcji adaptacyjnej organizmu na wykonywany wysiłek fizyczny. W odniesieniu do tak zarysowanej problematyki pragnę stwierdzić na wstępie, że tytuł całego zbioru został w mojej opinii sformułowany prawidłowo i adekwatnie do treści całej dysertacji, a realizacja przyjętego projektu badawczego wydaje się być bardzo zasadna.

Rola recenzenta nie jest łatwa; mierzę się z nią ilekroć kierowana jest do mnie prośba o opinię na temat przesłanych mi prac. Zdaje sobie sprawę, że konieczne jest zawsze znalezienie równowagi między tym co „mi się wydaje” a tym, co jest obiektywne. Nie jest to zadanie łatwe, zatem w punkcie wyjścia, przystępując do napisania swojego zdania na jakiś temat, zakładam swoją otwartość na dyskusję z autorką podczas publicznej obrony.

Mając na uwadze powyższe sugestie należy przyjąć, że Pani mgr podjęła temat bardzo oryginalny, ważny poznawczo, cenny i niezwykle aktualny.

Struktura kompilacji jest typowa dla prac z dziedziny nauk medycznych i nauk o zdrowiu w nowym ujęciu. Pierwsza część- wprowadzająca ma przybliżyć potencjalnemu czytelnikowi omawiane zagadnienia, ich tło oraz dostępny stan wiedzy na temat, któremu poświęcono pracę, co Autorka tu czyni. Pod względem formalnym przedstawiona do recenzji praca stanowi oprawiony wydruk komputerowy, liczący 67 stron, podzielony na poszczególne rozdziały. Uzyskane w badaniach wyniki zamieszczono w 3 recenzowanych artykułach naukowych stanowiący spójny tematycznie zbiór, zaś na końcu rozprawy Autorka uzupełnia jeszcze dwie tematycznie powiązane publikacje których jest autorem lub współautorem. Układ i strukturę pracy należy uznać za poprawny i zawierający rozdziały niezbędne w tego typu dysertacjach. Założenia metodologiczne badań i poruszany w pracach problem badawczy wskazuje na oryginalność i aktualną wagę podjętego tematu, a materiał i metody badawcze zostały bardzo szczegółowo opisane w poszczególnych pracach co świadczy o dużej skrupulatności i dokładności Autorki. Z uwagi na charakterystykę materiałów badawczych większość obliczeń była oparta o elementy opisu statystycznego oraz statystyki matematycznej w sposób klasyczny. W prezentowanej dysertacji badania obejmowały: przeglądy piśmiennictwa, gromadzenie danych oraz analizy rezultatów wyników badań. W pracy zastosowano następujące metody: obserwacji indywidualnych przypadków, eksperymentalną oraz inne metody statystyczne. Odpowiednio do metod zastosowano techniki: analiz i szczegółowych pomiarów laboratoryjnych.

Omówienie wyników badań i dyskusje

Badania nad BDNF Autorka rozpoczęła 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. Fakt ten skłonił Ją do podjęcia decyzji o kontynuowaniu badań nad BDNF i jego właściwościami fizjologicznymi, w tym potencjalnymi implikacjami polimorfizmu Val66Met BDNF. Głównym celem realizowanego przez Nią projektu było zbadanie powiązań pomiędzy Val66Met BDNF, a poziomem reakcji adaptacyjnej organizmu na wykonywany wysiłek fizyczny. Pierwsze z podjętych zadań badawczych polegały na zestawieniu doniesień naukowych dotyczących mechanizmów łączących wysiłek fizyczny i wydzielanie BDNF. Szczególną uwagę Autorki zwróciły mechanizmy wywołane stresem oksydacyjnym, gdzie cała kaskada procesów metabolicznych regulowaną po aktywacji przez PGC-1 α ekspresją klastra genów związanych z komórkową odpowiedzią adaptacyjną wywołaną deficytem tlenu w konsekwencji zwiększa 19 ekspresję BDNF. Mechanizmy te okazały się być jednak nie do końca wyjaśnione i co istotniejsze, przez wielu naukowców wciąż uznawane były za nie potwierdzone. Początkowo realizowane przez Panią Gilmarę Gomes de Assis badania miały na celu sprawdzenie 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 przeprowadziła testy wydolności tlenowej (test VO₂max) i beztlenowej (test Wingate), które potwierdziły zwiększone wydzielanie BDNF pod wpływem wysiłków aerobowych. Zaobserwowała również, 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. Rozwinięciem opisanego projektu był kolejny protokół badawczy, który miał 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). Wykazała, 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 Jej spostrzeżenia, że stres oksydacyjny wpływa negatywnie na poziom ekspresji BDNF. Wykazała Ona także brak korelacji pomiędzy poziomem ekspresji BDNF a poziomem BDNF w krwiobiegu. Realizowane kolejno eksperymenty były przesłanką opracowania zupełnie nowego protokołu umożliwiającego wykrycie specyficznej ekspresji BDNF zależnej od allelu Val66Met. Do opracowania tego protokołu Doktorantka wykorzystwała 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 prowadziła równolegle, a krzywe topnienia stosowała jako kontrolę specyficzności produktu. Reakcje przeprowadziła w trzech powtórzeniach. W konsekwencji udało się opracować przez Autorkę efektywniejszą i tańszą metodę oznaczania ekspresji BDNF specyficznej dla poszczególnych alleli Val66Met.

Na uwagę zasługuje starannie wykonane omówienie wyników przeprowadzonych badań i odpowiednie interpretacje z dokonanych analiz statystycznych. Całość ułożona jest logicznie, a forma prezentacji wyników badań w poszczególnych publikacjach jest przejrzysta. Przedstawienie dużej ilości wszystkich wyników badań oraz precyzyjnej ich prezentacji, znacznie ułatwia potencjalnemu czytelnikowi odbiór omawianych problemów i opisanych w tym zjawisk. Prezentowane w pracach wyniki stanowią dalszy kierunek, który należy podjąć w celu optymalizacji wiedzy w badanym zakresie. Doktorantka dokładnie wie co badać i podąża konsekwentnie w prezentowanych pracach obraną wcześniej drogą.

Dyskusje na tle prezentowanych wyników innych autorów uwalniają nieco inwencje twórcze i pozwalają na pełniejsze rozwinięcie „skrzydeł”. Stąd też, jakkolwiek nie są to łatwe do napisania części, są także bardzo ważne i niezwykle istotne w tego typu pracach. Są to w mojej opinii newralgiczne części, które wskazują na dojrzałość i przygotowanie merytoryczne Doktorantki. Ten egzamin Kandydatka na stopień doktora zdała bardzo dobrze przeplatując dyskusje wraz z prezentacjami

i omówieniem wyników prezentowanych badań w sposób ciągły. Rozdziały te przeprowadzone są w sposób poprawny, zawierają wiele interesujących informacji wyjaśniających uzyskane wyniki i konfrontujących je z badaniami innych autorów. Prowadzenie poszczególnych dyskusji jest ostrożne, jasne i systematyczne. Wskazuje na dobrą umiejętność oceny i interpretacji wyników.

Wszystkie te rozdziały są bezpośrednio i merytorycznie powiązane ze sobą stanowiąc spójnie tematycznie zbiór.

Wnioski

Tych części nie będę szczegółowo omawiać, ponieważ w mojej opinii wnioski są trafne i czytelne we wszystkich prezentowanych pracach i odpowiadają na postawione wcześniej hipotezy czy pytania badawcze. Wskazują one, że uzyskane wyniki nie pozostają bez istotnego znaczenia w obszarze analizowanego tematu, będąc silną przesłanką do dalszych badań i analiz w tym zakresie.

Piśmiennictwo

Przedstawione zbiory piśmiennicze zawierają wiele pozycji polskich i zagranicznych autorów w zdecydowanej większości z ostatnich 10 lat, są dobrze dobrane i wykorzystane w całych tekstach prac.

Uwagi końcowe

Spoglądając na całokształt prezentowanych w dysertacji prac Pani Gilmary Gomes de Assis należy docenić wkład jaki włożyła w prowadzenie procesu badawczego oraz ich przygotowanie, jednak ważnym aspektem są również wnioski merytorycznie dla profilaktyki zdrowotnej na podstawie osiągniętych przez Niej wyników. Dokonując oceny prac pod względem technicznym i językowym, stwierdzam, że zostały one przygotowane bardzo starannie.

Podsumowując stwierdzam, że istnieje konieczność kontynuowania postępowania badawczego w tym zakresie. Jestem przekonany, że Doktorantka jest osobą dobrze przygotowaną pod względem merytorycznym i metodologicznym do sprostania w przyszłości temu wyzwaniu. Mam również nadzieję, że przedstawione

uwagi z których większość ma charakter subiektywny, pozwolą choć po części zainspirować do dalszej pracy naukowo-badawczej.

Konkluzja końcowa

W moim przekonaniu oceniana przeze mnie dysertacja w postaci spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych wcześniej opublikowanych w recenzowanych i uznanych przez międzynarodowe środowisko naukowe czasopismach Pani Gilmory Gomes de Assis spełnia wymogi ustawowe pod względem formalnym jak i merytorycznym, co kwalifikuje Ją do nadania stopnia doktora nauk o kulturze fizycznej. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej AWFIS w Gdańsku o dopuszczenie Pani Gilmory Gomes de Assis do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku,



Prof. Wojciech Czarny