



Akademia Wychowania Fizycznego  
im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu

**mgr Norbert Grzelak**

**Znaczenie osi sygnalizacyjnej BDNF/Trk-B w regulacji stężeń  
i aktywności biomarkerów zespołu metabolicznego  
w wątrobie i sercu szczura**

Rozprawa doktorska

Promotor:  
prof. AWF dr hab. Włodzimierz Mrówczyński

Promotor pomocniczy:  
dr Dominik Kaczmarek

Poznań 2025

„Bądź zadowolony, jeżeli choć krok zrobisz najmniejszy.  
I tego bądź przekonania, że w tym wypadku nic nie jest małe”.  
Marek Aureliusz, *Rozmyślania*

Dla tych, którzy byli ze mną w trudnych chwilach.

Dziękuję również każdemu,  
kto dołożył chociaż najmniejszą cegiełkę do tej pracy.

Niech ta praca będzie dla mnie inspiracją i motywacją  
do podejmowania nieoczywistych decyzji.

## SPIS TREŚCI

|                                        |    |
|----------------------------------------|----|
| DANE O KANDYDACIE .....                | 4  |
| WYKAZ SKRÓTÓW .....                    | 5  |
| STRESZCZENIE .....                     | 6  |
| ABSTRACT .....                         | 8  |
| 1. WSTĘP .....                         | 10 |
| 2. CELE I HIPOTEZY BADAŃ.....          | 13 |
| 3. CYKL PUBLIKACJI.....                | 14 |
| 4. MATERIAŁ I METODY BADAWCZE .....    | 15 |
| 5. WYNIKI .....                        | 18 |
| 6. DYSKUSJA .....                      | 21 |
| 7. WNIOSKI .....                       | 26 |
| 8. PIŚMIENNICTWO .....                 | 27 |
| PRZEBIEG PRACY NAUKOWO-ZAWODOWEJ ..... | 36 |
| ZAŁĄCZNIK 1. OŚWIADCZENIA .....        | 37 |
| ZAŁĄCZNIK 2. PUBLIKACJE .....          | 43 |

## **DANE O KANDYDACIE**

Data uzyskania tytułu magistra: 16.07.2018 r.

Nazwa jednostki organizacyjnej, w której nadany został tytuł: Wydział Wychowania Fizycznego, Sportu i Rehabilitacji Akademii Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu.

Kandydat nie ubiegał się uprzednio o nadanie stopnia doktora.



## WYKAZ SKRÓTÓW

- ALAT (ang. *alanine transaminase*) – aminotransferaza alaninowa
- ALP (ang. *alkaline phosphatase*) – fosfataza alkaliczna
- ANOVA (ang. *analysis of variance*) – analiza wariancji
- ASAT (ang. *aspartate transaminase*) – aminotransferaza asparaginowa
- BDNF (ang. *brain-derived neurotrophic factor*) – neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego
- CHOL – cholesterol
- CK (ang. *creatine kinase*) – kinaza kreatynowa
- CK-MB – kinaza kreatynowa – izoenzym sercowy
- ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) – test immunoenzymatyczny
- GGT (ang. *gamma glutamyl transferase*) – gamma-glutamylotransferaza
- IL-1 – interleukina 1
- IL-6 – interleukina 6
- INS – insulina
- LDH (ang. *lactate dehydrogenase*) – dehydrogenaza mleczanowa
- LDL (ang. *low-density lipoprotein*) – lipoproteina o niskiej gęstości
- LEPT – leptyna
- TG – trójglicerydy
- Trk-B (ang. *tyrosine receptor kinase B*) – receptor kinazy tyrozynowej B

## STRESZCZENIE

**Wstęp.** Neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF) to plejotropowe białko z rodziny neurotrofin, kluczowe dla wzrostu, rozwoju i przeżycia neuronów. Odgrywa ważną rolę w plastyczności synaptycznej, zwłaszcza w obszarach mózgu, takich jak hipokamp, kora wzrokowa, istota czarna oraz prążkowie. BDNF odgrywa również istotną rolę w metabolizmie wątroby i serca, jednak jego funkcja modulatora procesów i szlaków metabolicznych w tych narządach jest słabo poznana. Stąd głównym celem wykonanych eksperymentów było poznanie związku między osią sygnalizacyjną BDNF/Trk-B a biomarkerami wskazującymi efektywność procesów metabolicznych wątroby i mięśnia sercowego u szczurów. W badaniach określano koncentrację BDNF, receptora kinazy tyrozynowej B (Trk-B), jak również stężenia oraz aktywność podstawowych biomarkerów metabolicznych wątroby i mięśnia sercowego u szczurów pozbawionych jednego allele genu BDNF oraz u niemodyfikowanych genetycznie szczurów. Ponadto oceniano wpływ 5-tygodniowego treningu wytrzymałościowego o umiarkowanej intensywności jako czynnika modulującego poziom BDNF we krwi i tkankach oraz normującego potencjalne zmiany metaboliczne w obu analizowanych narządach wewnętrznych.

**Materiały i metody.** Badania przeprowadzono na czterech grupach zwierząt: niemodyfikowanych genetycznie ( $n = 11$ ), o zmienionym genotypie BDNF ( $n = 11$ ), trenowanych niemodyfikowanych genetycznie ( $n = 10$ ) oraz trenowanych o zmienionym genotypie BDNF ( $n = 9$ ). Po zakończeniu procedury treningowej szczury uśmiercano, a następnie pobierano od nich wątroby i serca. Pozyskane tkanki homogenizowano w celu wykonania oznaczeń za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA) i analizatora chemicznego w nadsączu tkanek. Oznaczono stężenia: BDNF i Trk-B, lipidów i lipoprotein – cholesterolu (CHOL), trójglicerydów (TG) oraz lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL), jak również aktywność enzymów metabolicznych – aminotransferazy alaninowej (ALAT), aminotransferazy asparaginowej (ASAT), gamma-glutamylotransferazy (GGT) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Dodatkowo w wątrobie mierzono aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP), a także stężenia i aktywności hormonów – insuliny (INS) i leptyny (LEPT) oraz interleukiny 6 (IL-6). Natomiast w sercu mierzono aktywność kinazy kreatynowej (CK) i kinazy kreatynowej – izoenzymu sercowego (CK-MB) oraz stężenia interleukiny 1 (IL-1). Do statystycznego porównania wyników uzyskanych we wszystkich badanych grupach szczurów zastosowana została dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA).

**Wyniki.** W wątrobie szczurów z grupy BDNF knockout wykazano statystycznie niższe stężenia BDNF, Trk-B, lipidów i lipoprotein (CHOL i LDL) oraz aktywności enzymów metabolicznych (ALAT i GGT), jak również wyższe stężenia TG i masy omawianego narządu w porównaniu ze szczurami niemodyfikowanymi genetycznie. Natomiast w sercu szczurów z grupy BDNF knockout stwierdzono statystycznie zarówno niższy poziom receptorów Trk-B, jak i niższe stężenia CHOL i LDL oraz niższe aktywności enzymów metabolicznych (ALAT, ASAT, GGT, CK i CK-MB) w porównaniu z grupami szczurów niemodyfikowanych genetycznie.

Po treningu wytrzymałościowym szczury z grupy BDNF knockout charakteryzowały się wyższymi aktywnościami enzymów metabolicznych (ALAT i ASAT) oraz stężeniami

IL-6 w wątrobie. Dodatkowo trening wytrzymałościowy powodował wyższe stężenia i aktywności INS i LEPT oraz niższe aktywności LDH w wątrobie, a także wyższą aktywność CK w sercu wszystkich zwierząt niezależnie od ich genotypu w porównaniu z grupami nietreningowanymi.

**Wnioski.** W wątrobie i mięśniu sercowym szczurów z ubytkiem genu BDNF wykazano znacząco niższe stężenie lipidów i lipoprotein (CHOL i LDL) oraz niższą aktywność enzymów metabolicznych (ALAT, ASAT i GGT). Wspomniane powyżej zmiany były powiązane z różnicami w koncentracji BDNF oraz receptora Trk-B zarówno w wątrobie (niższa zawartość BDNF/Trk-B), jak i sercu (wzrost poziomu receptorów Trk-B) tych zwierząt. Takie wyniki sugerują, że delecja genu BDNF powoduje zaburzenia w osi sygnalizacyjnej BDNF/Trk-B, co skutkuje zmianami w metabolizmie lipidów oraz aktywności enzymów w wątrobie i sercu szczurów z grupy BDNF knockout. Zmiany te mogą wskazywać na rozwój stłuszczenia wątroby oraz na niedotlenienie lub niedokrwienie mięśnia sercowego, co w konsekwencji może prowadzić do wystąpienia zespołu metabolicznego.

U szczurów z ubytkiem genu BDNF trening poprawiał wydajność szlaków metabolicznych w wątrobie, a wytwarzana przez mięśnie IL-6 mogła wspierać regenerację tego organu. U wszystkich trenowanych szczurów zaobserwowano lepszą regulację metabolizmu, spadek masy ciała i zwiększoną efektywność szlaków energetycznych w mięśniu sercowym.

## ABSTRACT

**Introduction.** Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a pleiotropic protein of the neurotrophin family, crucial for the growth, development and survival of neurons. It plays an important role in synaptic plasticity, especially in brain areas such as the hippocampus, visual cortex, substantia nigra and striatum. BDNF also plays an important role in liver and heart metabolism, but its function as a modulator of metabolic processes and pathways in these organs is poorly understood. Hence, the main purpose of the experiments performed was to recognize the relationship between the BDNF/Trk-B signalling axis and biomarkers indicating the efficiency of hepatic and myocardial metabolic processes in rats. In the study, the concentrations of BDNF, tyrosine receptor kinase B (Trk-B) as well as the concentrations and activities of basic metabolic biomarkers of liver and myocardium were determined in rats lacking one allele of the BDNF gene (BDNF knockout, SD-BDNF) and in non-genetically modified rats. In addition, the effect of 5-week moderate-intensity endurance training was evaluated as a factor modulating BDNF levels in blood and tissues and normalizing potential metabolic changes in both internal organs analyzed.

**Materials and Methods.** The study was conducted on four groups of animals: non-genetically modified (n = 11), BDNF knockout genotype (n = 11), non-genetically modified trained (n = 10) and BDNF knockout genotype trained (n = 9). After the training procedure, the rats were sacrificed and their livers and hearts were collected. The extracted tissues were homogenised for determination by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and chemical analyser in the tissue filtrate. Concentrations were determined for: BDNF and Trk-B, lipids and lipoproteins – cholesterol (CHOL), triglycerides (TG) and low-density lipoprotein (LDL), as well as metabolic enzyme activity – alanine transaminase (ALAT), aspartate transaminase (ASAT), gamma-glutamyltransferase (GGT) and lactate dehydrogenase (LDH). In addition, alkaline phosphatase (ALP) – enzyme activity – was measured in the liver, as well as hormone concentrations and activities – insulin (INS) and leptin (LEPT), and interleukin (IL-6). On the other hand, creatine kinase (CK) and creatine kinase – cardiac isoenzyme (CK-MB) – enzyme activities – and interleukin (IL-1) concentrations were measured in the heart. A two-factor analysis of variance (ANOVA) was used to statistically compare the results obtained in all the rat groups studied.

**Results.** The liver of rats in the BDNF knockout group showed statistically lower concentrations of BDNF, Trk-B, lipids and lipoproteins (CHOL and LDL) and metabolic enzyme activities (ALAT and GGT), as well as higher TG concentrations and weight in this organ compared to rats in the control group. Meanwhile, the hearts of rats in the BDNF knockout group had statistically lower concentrations of both Trk-B receptors and CHOL and LDL, as well as lower metabolic enzyme activities (ALAT, ASAT, GGT, CK and CK-MB) compared to the control group.

After endurance training, rats in the BDNF knockout group had higher metabolic enzyme activities (ALAT and ASAT) and liver IL-6 concentrations. In addition, endurance training resulted in higher INS and LEPT concentrations and activities, and lower LDH activities in the liver and higher CK activity in the heart of all animals, regardless of their genotype, compared to the untrained groups.

**Conclusions.** The liver and myocardium of rats with BDNF gene deficiency showed significantly lower concentrations of lipids and lipoproteins (CHOL and LDL) and lower activity of metabolic enzymes (ALAT, ASAT and GGT). The aforementioned changes were associated with differences in BDNF and Trk-B receptor concentrations in both the liver (lower BDNF/Trk-B content) and heart (increased Trk-B receptor levels) of these animals. Such results suggest that deletion of the BDNF gene causes disruption of the BDNF/Trk-B signaling axis, resulting in changes in lipid metabolism and enzyme activity in the liver and heart of BDNF knockout rats. These changes may indicate the development of hepatic steatosis and myocardial hypoxia or ischemia, resulting in metabolic syndrome.

In rats with BDNF gene defects, training improved the efficiency of metabolic pathways in the liver, and muscle-produced IL-6 could promote regeneration of this organ. In all trained rats, better metabolic regulation, weight loss and increased efficiency of myocardial energy pathways were observed.

# 1. WSTĘP

## *Udział BDNF w procesach fizjologicznych organizmu*

Neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF) jest jednym z najważniejszych białek, odgrywającym istotną rolę w wielu procesach biologicznych zarówno w ośrodkowym, jak i obwodowym układzie nerwowym. Największa ekspresja BDNF występuje w: hipokampie, korze wzrokowej, istocie czarnej oraz prążkowie (Li i in. 2022b). W tych strukturach BDNF wspiera wzrost, rozwój i przeżywalność neuronów (Bathina i Das 2015), uczestniczy w procesach plastyczności synaptycznej (Ji i in. 2010), długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (Schinder i Poo 2000), zdolności uczenia się i zapamiętywania (Vicario-Abejón i in. 2002), formowania połączeń nerwowych (Wang i in. 2022) oraz regeneracji aksonów (Gordon 2009; Lindsay 1988; Richner i in. 2014). Te różnorodne funkcje sprawiają, że BDNF odgrywa kluczową rolę w zapewnieniu prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego.

BDNF oddziałuje również na inne układy i tkanki, takie jak mięśnie poprzecznie prążkowane (Mousavi i Jasmin 2006), mięśnie gładkie (Aravamudan i in. 2016) oraz układ endokrynnny (Podyma i in. 2021). Ponadto BDNF wpływa na metabolizm tkanki tłuszczowej (Nakagomi i in. 2015) oraz na funkcjonowanie kluczowych organów, w tym trzustki (Fulgenzi i in. 2020), wątroby (Genzer i in. 2017) i serca (Pius-Sadowska i Machaliński 2017).

BDNF uczestniczy w licznych procesach fizjologicznych, wywierając swoje działanie przede wszystkim przez receptor kinazy tyrozynowej B (Trk-B) (Schirò i in. 2022; Tessarollo i Yanpallear 2022). Interakcja BDNF z receptorem Trk-B tworzy funkcjonalną oś sygnalizacyjną, która odgrywa kluczową rolę w regulacji wielu procesów biologicznych, takich jak metabolizm lipidów i glukozy (Han i in. 2016; Park i in. 2007), funkcjonowanie szlaków metabolicznych i energetycznych (Genzer i in. 2017; Iu i Chan 2022) oraz synteza białek i ich pochodnych (Canbay i in. 2007).

## *Rola osi sygnalizacyjnej BDNF/Trk-B w metabolizmie wątroby*

W wątrobie głównym miejscem występowania BDNF oraz Trk-B są komórki gwiazdaste (Cassiman i in. 2001) oraz hepatocyty, które stanowią dominujący rodzaj komórek omawianego narządu, odpowiadając za jego podstawowe funkcje (Genzer i in. 2017). Wykazano, że BDNF wiąże się ze swoimi receptorami w hepatocytach, co aktywuje szlaki metaboliczne odpowiedzialne za utlenianie kwasów tłuszczowych przy jednoczesnym hamowaniu glukoneogenezy i zwiększonym magazynowaniu glikogenu (Genzer i in. 2017). Ponadto udowodniono, że BDNF wzmacniał sygnalizację insulinową w wątrobie oraz wykazywał działanie hipoglikemiczne u myszy z indukowaną cukrzycą (Tsuchida i in. 2001) oraz że 3-tygodniowa iniekcja BDNF prowadziła do zmniejszenia zawartości trójglicerydów i stłuszczenia wątroby, a w konsekwencji – do obniżenia masy tego organu (Tsuchida i in. 2002).

Pomimo tych odkryć rola BDNF w metabolizmie wątrobowym jest nadal słabo rozumiana. Wynika to z faktu, że dotychczasowe badania skupiały się głównie na określaniu poziomów BDNF i biomarkerów we krwi, podczas gdy wpływ osi sygnalizacyjnej BDNF/



Trk-B na enzymy wątrobowe, szlaki metaboliczne, lipoproteiny oraz zmiany hormonalne w hepatocytach nie został szczegółowo poznany.

#### *Rola osi sygnalizacyjnej BDNF/Trk-B w funkcjonowaniu serca*

BDNF oraz jego receptor Trk-B są obecne w różnych typach komórek serca, w tym w kardiomiocytach i komórkach śródbłonna tętnic wieńcowych (Feng i in. 2015; Fulgenzi i in. 2015; Kermani i Hempstead 2007; Li i in. 2022a). Badania wykazały, że oś sygnalizacyjna BDNF/Trk-B odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu prawidłowej funkcji układu sercowo-naczyniowego, m.in. poprzez zwiększenie żywotności kardiomiocytów (Okada i in. 2012), poprawę funkcji serca związanej z jego skurczem i rozkurczem (Feng i in. 2015) oraz wspomaganie rozwoju naczyń krwionośnych w sercu (Kermani i Hempstead 2007). Ponadto wykazano, że zmiany w osi sygnalizacyjnej BDNF/Trk-B są silnie związane z rozwojem wielu chorób sercowo-naczyniowych, a poziom BDNF we krwi uznano za potencjalny biomarker tych chorób (Bahls i in. 2019). Obecnie wiadomo, że niższe stężenie BDNF w surowicy i osoczu krwi występuje u pacjentów z chorobami serca, takimi jak niedokrwienność serca, ostry zespół wieńcowy, niestabilna dławica piersiowa, naczyniowe uszkodzenie mózgu, przewlekła niewydolność serca, oraz u osób zagrożonych udarem (Ejiri i in. 2005; Kadowaki i in. 2016; Manni i in. 2005; Pikula i in. 2013). Badania wykazały również, że niski poziom BDNF wiąże się z wyższą śmiertelnością i częstszym występowaniem chorób sercowo-naczyniowych (Kaess i in. 2015). Dodatkowo eksperymenty polegające na usunięciu receptorów Trk-B u myszy prowadziły do zaburzenia funkcji skurczowej i rozkurczowej serca (Feng i in. 2015).

Mimo tych odkryć nadal nie wyjaśniono, czy sygnalizacja BDNF/Trk-B w mięśniu sercowym wpływa na enzymy metaboliczne, enzymy specyficzne dla mięśnia sercowego, czy lipoproteiny oddziałujące na funkcje metaboliczne serca.

#### *Związek pomiędzy treningiem wytrzymałościowym a BDNF w chorobach sercowo-naczyniowych i metabolicznych*

Aktywność fizyczna o charakterze wytrzymałościowym wpływa na modulację stężenia BDNF w surowicy i osoczu krwi, co potwierdziły liczne badania (Dinoff i in. 2016; Szuhany i in. 2015). W przypadku ludzi zaobserwowano, że regularny trening wytrzymałościowy, trwający kilka tygodni, prowadzi do zwiększenia poziomu BDNF w surowicy krwi (Rasmussen i in. 2009; Tang i in. 2008). Eksperymenty na szczurach również wykazały, że umiarkowanie intensywny trening wytrzymałościowy prowadził do zwiększenia stężenia BDNF w osoczu oraz poprawy tolerancji insuliny. Efekty te były jednak hamowane u zwierząt otrzymujących codzienne dootrzewnowe dawki blokerów receptorów Trk-B (Jiménez-Maldonado i in. 2014).

Ponadto wykazano, że trening wolincjonalny u szczurów zwiększał poziom BDNF nie tylko we krwi, ale także w tkance wątrobowej i sercu (Belviranlı i Okudan 2018). Zostało również udokumentowane, że biegi wytrzymałościowe posiadają szeroki potencjał prozdrowotny, przeciwdziałając wielu schorzeniom układu sercowo-naczyniowego (Nystoriak i Bhatnagar 2018). Tego rodzaju aktywność zwiększała wydolność tlenową serca (Dickhuth i in. 2004) i obniżała ryzyko śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych (Arem i in. 2015). Badania wskazały również na istnienie korelacji pomiędzy aktywnością fizyczną a wzrostem ekspresji BDNF w mięśniach szkieletowych, sercu oraz mózgu (Alo-mari i in. 2015; Maroofi i in. 2022; Prigent-Tessier i in. 2013; Wang i in. 2019). Natomiast wyniki badań Nakano i in. (2020) sugerowały, że produkcja BDNF zależy zarówno od

funkcji mięśni szkieletowych, jak i rodzaju aktywności fizycznej, szczególnie u pacjentów z niewydolnością serca. Z drugiej strony eksperymenty na myszach z obniżonym poziomem BDNF wykazały, że miały one podwyższone tętno, które zostało znormalizowane po infuzji BDNF bezpośrednio do mózgu, co sugeruje, że BDNF może regulować pracę serca poprzez aktywację neuronów przywspółczulnych w pniu mózgu (Wan i in. 2014).

#### *Zaburzenia osi sygnalizacyjnej BDNF/Trk-B a syndrom metaboliczny*

BDNF koordynuje procesy adaptacyjne zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym, jak i w tkankach, takich jak mięśnie, wątroba czy tkanka tłuszczowa (Di Rosa i in. 2021). Zaburzenia mechanizmów regulacyjnych zależnych od BDNF w wymienionych tkankach prowadzą do obniżenia jego stężenia w osoczu i surowicy krwi, co – jak wykazały badania Katuriego i in. (2021) oraz Kolevej i Orbetzovej (2022) – towarzyszy rozwojowi zaburzeń metabolicznych. Obecnie wiadomo, że obniżony poziom obwodowego BDNF u ludzi i gryzoni jest związany z dysfunkcjami metabolicznymi, takimi jak otyłość, zespół metaboliczny, cukrzyca czy choroby układu krążenia (Chaldakov i in. 2004; Motamedi i in. 2017). Wykazano również, że egzogenne podawanie BDNF myszom pozbawionych genu kodującego białko tego czynnika neurotroficznego pozwalało na odwrócenie skutków zespołu metabolicznego (Kernie i in. 2000; Lyons i in. 1999). W związku z tym syndrom metaboliczny należy postrzegać jako następstwo chorób metabolicznych i sercowo-naczyniowych, a tkankami, które najbardziej odczuwają skutki tych zaburzeń, są wątroba oraz serce. Jednak, jak dotąd, nie zbadano zależności pomiędzy osią sygnalizacyjną BDNF/Trk-B a biomarkerami odpowiedzialnymi za metabolizm obu tych narządów.



## 2. CELE I HIPOTEZY BADAŃ

Głównym celem badań było poznanie związku między osią sygnalizacyjną BDNF/Trk-B a biomarkerami wskazującymi efektywność procesów metabolicznych wątroby i serca. Założono hipotezę, że zaburzenia w sygnalizacji osi BDNF/Trk-B będą przyczyniały się do dysfunkcji metabolicznych obu tych narządów jako głównej przyczyny syndromu metabolicznego. W tym celu przeprowadzono badania porównawcze na heterozygotycznych szczurach z usuniętym jednym allelem genu BDNF oraz na szczurach typu dzikiego niemodyfikowanych genetycznie.

Dodatkowo u części szczurów z obydwu wymienionych powyżej grup zastosowano trening wytrzymałościowy o umiarkowanej intensywności w celu potencjalnego zwiększenia poziomu BDNF we krwi obwodowej oraz tkankach jako czynnika normującego ewentualne zmiany metaboliczne w obu wymienionych narządach wewnętrznych.

Założono dwie hipotezy badawcze:

1. Genotyp BDNF (niemodyfikowany vs. knockout) wpływa na modulację aktywności i stężeń biomarkerów metabolicznych w tkance wątrobowej oraz mięśniu sercowym poprzez zmiany w sygnalizacji osi BDNF/Trk-B w wątrobie i sercu (publikacja 1, publikacja 2).
2. Trening wytrzymałościowy o umiarkowanej intensywności wpływa na oś sygnalizacyjną BDNF/Trk-B w wątrobie oraz mięśniu sercowym szczurów niemodyfikowanych genetycznie i z genotypem BDNF knockout, co prowadzi do modulacji aktywności oraz stężeń biomarkerów wskazujących na efektywność procesów metabolicznych obu tych narządów (publikacja 1, publikacja 2).

### 3. CYKL PUBLIKACJI

Przedłożona dysertacja doktorska to cykl prac pod wspólnym tytułem: **Znaczenie osi sygnalizacyjnej BDNF/Trk-B w regulacji stężeń i aktywności biomarkerów zespołu metabolicznego w wątrobie i sercu szczura.**

W skład cyklu wchodzi dwa artykuły naukowe:

1. Grzelak N., Kaczmarek D., Mrówczyński W. (2023) Comparison of the effects of BDNF/TRKB signalling on metabolic biomarkers in the liver of sedentary and trained rats with normal and knockout BDNF genotypes. *Front Physiol*, 14, 1268648. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1268648>  
punktacja MEiN: 100; Impact Factor: 3,2
2. Grzelak N., Kaczmarek D., Poziemba K.M., Mrówczyński W. (2024) Myocardial disorders in BDNF-deficient rats: limited recovery post-moderate endurance training. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 17, 4649–4660. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S486807>  
punktacja MNiSW: 100; Impact Factor: 2,8

Łącznie: punktacja MEiN/MNiSW: 200; Impact Factor: 6,0

## 4. MATERIAŁ I METODY BADAWCZE

### *Zwierzęta*

Badania przeprowadzono na 41 szczurach płci męskiej szczepu Sprague Dawley (SD) w wieku około 4–5 miesięcy, pozyskanych z hodowli SAGE Labs (St. Louis, MO, USA). W tym celu wykorzystano 21 szczurów typu dzikiego (BDNF wild-type) niemodyfikowanych genetycznie oraz 20 heterozygotycznych szczurów (BDNF knockout, SD-BDNF) z delecją genu kodującego białko BDNF, który usunięto przy użyciu technologii *targeted zinc finger nuclease*.

Wszystkie zwierzęta do czasu wykonania eksperymentu przechowywano w standardowych klatkach laboratoryjnych (dwa osobniki o tym samym genotypie w jednej klatce) z nielimitowanym dostępem do wody i karmy. Szczury przebywały w pomieszczeniu z kontrolowanymi warunkami (odwrócony cykl dzień/noc 12 h : 12 h, wilgotność  $55 \pm 1\%$  i temperatura  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Przed pobraniem tkanek gryzonie zostały poddane eutanazji poprzez podanie letalnej dawki pentobarbitalu sodu ( $180 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Odpowiednie biomarkery wątroby oraz serca mierzono w czterech grupach zwierząt: (1) szczurach niemodyfikowanych genetycznie (Bdnf+/+), (2) heterozygotycznych szczurach z delecją genu BDNF (Bdnf+/-), (3) trenowanych szczurach niemodyfikowanych genetycznie (Bdnf+/+T) oraz (4) trenowanych heterozygotycznych szczurach z delecją genu BDNF (Bdnf+/-T).

Doświadczenia przeprowadzono zgodnie z polską ustawą o ochronie zwierząt, przepisami Unii Europejskiej i wytycznymi ARRIVE. Procedury doświadczalne zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Badań na Zwierzętach w Poznaniu (numer zgody: 58/2018).

### *Trening wytrzymałościowy*

Trening wytrzymałościowy o umiarkowanej intensywności przeprowadzano na bieżni elektrycznej dla małych gryzoni (Exer-6M, Columbus Instruments). Protokół treningowy dla obu grup trenowanych (Bdnf+/+T oraz Bdnf+/-T) składał się z tygodnia adaptacji ruchowej oraz 5 tygodni regularnego treningu. Okres adaptacji ruchowej miał na celu przyzwyczajenie zwierząt do bieżni elektrycznej oraz wysiłku o charakterze wytrzymałościowym. Odbывał się 2 razy dziennie, trwał od 10 do 45 minut i polegał na bieganiu zwierząt z prędkością  $10\text{--}13 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ . Podczas właściwego okresu treningu wytrzymałościowego szczury biegały przez 45 minut dziennie (5 razy w tygodniu przez 5 tygodni) przy progresywnie zwiększanej prędkości bieżni:  $15 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  w pierwszym tygodniu (średni dzienny dystans: 675 m),  $17,7 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  w drugim tygodniu (średni dzienny dystans: 797 m),  $19,3 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  w trzecim tygodniu (średni dzienny dystans: 869 m),  $21,5 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  w czwartym tygodniu (średni dzienny dystans: 963 m) oraz  $24 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  w piątym tygodniu (średni dzienny dystans: 1080 m). Według klasyfikacji dokonanej przez Lalanę i in. (2015) trening wytrzymałościowy zastosowany w badaniach uznaje się za trening o umiarkowanej intensywności.

### *Pobieranie tkanek*

Dzień po ostatniej jednostce treningu wytrzymałościowego, po eutanazji zwierząt, wykonywano torakotomię w celu pozyskania wątroby oraz serca. Pobrane tkanki ważono, a dalej umieszczano w fiolkach kriogenicznych odpowiednich dla wątroby (Yancheng Huida Medical Instruments, Chiny) oraz serca (NUNC/Thermo Fisher Scientific, USA). Następnie fiolki zanurzono w ciekłym azocie i umieszczono je w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu pomiarów.

### *Homogenizacja tkanek*

W przypadku wątroby do homogenizacji pobierano małe, dystalne części każdego z płatów. Natomiast w przypadku serca wycinano jego najbardziej zewnętrzne fragmenty w celu uzyskania czystej tkanki mięśniowej. Pobrane skrawki ważono i dodawano bufor fosforanowy z inhibitorami enzymów (Halt Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free [100X]; Thermo Fischer Scientific, USA) proporcjonalnie do masy tkanek (9 : 1). Homogenizację przeprowadzano z wykorzystaniem homogenizatora dyspersyjnego (VWR VDI 12, Singapur) w czterech cyklach, z których każdy trwał 30 sekund (pomiędzy cyklami próbkę z homogenatem chłodzono w lodzie). Tkanekę homogenizowano z prędkością 30 000 rpm, aby zapewnić skuteczną fragmentację tkanki, natomiast gotowy homogenat odwirowywano z prędkością 5000 rpm przez 5 minut w celu oddzielenia większej cząsteczki oraz pozostałości komórkowych od supernatantu. Uzyskany supernatant pobierano i przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do momentu pomiarów biochemicznych.

### *Pomiary za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA)*

W obydwu tkankach sprawdzono stężenie poziomu BDNF (czułość testu: 0,035 ng/ml-1, nr kat.: SRB-T-81493) oraz receptorów Trk-B (czułość testu: 12,337 pg/ml; nr kat.: 201-11-0426). W przypadku wątroby badano również koncentrację leptyny (LEPT; czułość testu: 7,054 pg/ml; nr kat.: 201-11-0456) i interleukiny-6 (IL-6; czułość testu: 1,822 pg/ml; nr kat.: 201-11-0136) oraz aktywność insuliny (INS; czułość testu: 0,102 mIU/L; nr kat.: 201-11-0708). Natomiast w sercu dodatkowo oszacowano stężenie interleukiny-1 (IL-1; czułość testu: 10,135 ng/L; nr kat.: 201-11-0108). W tym celu przeprowadzono pomiary za pomocą ELISA zgodnie z instrukcjami zestawów producenta (Sunredbio, Chiny). Podczas pomiaru użyto fali światła o długości 450 nm przy wykorzystaniu wielomodowego czytnika mikropłytek (Synergy 2 SIAFRT, BioTek, USA).

### *Analizy biochemiczne za pomocą analizatora biochemicznego*

Dla obu tkanek przeprowadzono analizę stężeń tłuszczów i lipoprotein, takich jak lipoproteina o niskiej gęstości (LDL; czułość testu: 3,9 mg/dl; nr kat.: 7-280 [Cormay, Polska]), cholesterol (CHOL; czułość testu: 1,95 mg/dl; nr kat.: 7-204 [Cormay, Polska]), trójglicerydy (TG; czułość testu: 1,4 mg/dl; nr kat.: 7-253 [Cormay, Polska]); enzymów, wliczając aminotransferazę alaninową (ALAT; czułość testu: 8 U/L; nr kat.: 7-216 [Cormay, Polska]), aminotransferazę asparaginową (ASAT; czułość testu: 7 U/L; nr kat.: 7-214 [Cormay, Polska]), gamma-glutamylotransferazę (GGT; czułość testu: 6,6 U/L; nr kat.: 7-239 [Cormay, Polska]) i dehydrogenazę mleczanową (LDH; czułość testu: 6,6 U/L; nr kat.: 7-239 [Cormay, Polska]). Dodatkowo w wątrobie zbadano aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP; czułość testu: 7,8 U/L; nr kat.: 7-212 [Cormay, Polska]), natomiast w sercu – aktywność

kinazy kreatynowej (CK; czułość testu: 7,4 U/L; nr kat.: 7-220 [Cormay, Polska]) i kinazy kreatynowej – izoenzymu sercowego (CK-MB; czułość testu: 4 U/L; nr kat.: 7-427 [Cormay, Polska]). Pomiary wykonano za pomocą analizatora biochemicznego (Accent 220S, Cormay, Polska).

#### *Analiza statystyczna*

Uzyskane wyniki wszystkich przeprowadzonych pomiarów zostały przedstawione jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe (SD). W celu porównania wszystkich badanych grup przeprowadzono dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Jeśli interakcja pomiędzy zmiennymi niezależnymi była istotna statystycznie, przeprowadzono test post-hoc Tukeya. Wszelkie analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu oprogramowania Statistica 13 (Statsoft, Polska, Kraków).

## 5. WYNIKI

### *Masa ciała oraz wątroby*

Poprzednie badania przeprowadzone na tych samych grupach zwierząt (Grzelak i in. 2023) wykazały, że heterozygotyczne szczury z delecją genu BDNF (Bdnf+/-) miały statystycznie wyższą masę ciała (o 21,5%) w stosunku do szczurów niemodyfikowanych genetycznie (Bdnf+/+), natomiast mniejsza masa ciała charakteryzowała szczury z obu trenowanych grup (o 12,5%) (Bdnf+/+T, Bdnf+/-T). W niniejszych badaniach wykazano, że średnia masa wątroby szczurów z grupy Bdnf+/- była o 19% wyższa w porównaniu ze szczurami niemodyfikowanymi genetycznie (Bdnf+/+). Natomiast między nietrenowanymi (Bdnf+/+ i Bdnf+/-) i trenowanymi szczurami (Bdnf+/+T, Bdnf+/-T) nie wykazano żadnych istotnych statystycznie różnic w masach tego narządu.

### *Stężenia BDNF i Trk-B w wątrobie i mięśniu sercowym*

Stężenia BDNF oraz Trk-B w wątrobie były znacząco niższe u obu heterozygotycznych grup szczurów z delecją genu BDNF (Bdnf+/- i Bdnf+/-T) w porównaniu z odpowiadającymi im grupami szczurów niemodyfikowanych genetycznie (Bdnf+/+ i Bdnf+/+T). Z drugiej strony nie zaobserwowano żadnych różnic w koncentracji wątrobowego BDNF i Trk-B pomiędzy odpowiednimi trenowanymi (Bdnf+/+T i Bdnf+/-T) i nietrenowanymi (Bdnf+/+ i Bdnf+/-) grupami szczurów.

Natomiast w mięśniu sercowym nie wykazano żadnych różnic w poziomie BDNF pomiędzy odpowiednimi grupami szczurów niemodyfikowanych genetycznie (Bdnf+/+ i Bdnf+/+T) a grupami heterozygotycznych szczurów z delecją genu BDNF (Bdnf+/- i Bdnf+/-T). Jednak w obu grupach heterozygotycznych szczurów pozbawionych genu BDNF (Bdnf+/- i Bdnf+/-T) zaobserwowano statystycznie wyższe stężenie receptorów Trk-B w porównaniu z odpowiadającymi im grupami szczurów niemodyfikowanych genetycznie (Bdnf+/+ i Bdnf+/+T). Ponadto poziomy sercowego BDNF i Trk-B nie różniły się pomiędzy grupami szczurów trenowanych (Bdnf+/+T i Bdnf+/-T) i nietrenowanych (Bdnf+/+ i Bdnf+/-).

### *Stężenia lipidów w wątrobie i mięśniu sercowym*

Wykazano statystycznie niższe stężenia lipidów CHOL i LDL (oraz wyższe stężenie TG) w wątrobie szczurów z delecją genu BDNF (Bdnf+/- i Bdnf+/-T) w porównaniu z odpowiadającymi im grupami szczurów niemodyfikowanych genetycznie (Bdnf+/+ i Bdnf+/+T). Istotnie niższe stężenie CHOL i LDL (oraz brak zmian stężeń TG) wykazano również w mięśniu sercowym obu grup szczurów z delecją genu BDNF (Bdnf+/- i Bdnf+/-T) w porównaniu z populacją szczurów niemodyfikowanych genetycznie (Bdnf+/+ i Bdnf+/+T). Natomiast nie zaobserwowano żadnych różnic w stężeniach CHOL, LDL i TG pomiędzy grupami szczurów trenowanych (Bdnf+/+T i Bdnf+/-T) i nietrenowanych (Bdnf+/+ i Bdnf+/-) zarówno w wątrobie, jak i mięśniu sercowym.

### *Aktywność enzymów w wątrobie i mięśniu sercowym*

Zaobserwowano znacząco niższe aktywności enzymów ALAT i GGT w wątrobach oraz ALAT, ASAT i GGT w mięśniu sercowym w obu grupach szczurów z delecją genu BDNF (Bdnf+/- i Bdnf+/-T) w porównaniu z odpowiadającymi im grupami szczurów niemodyfikowanych genetycznie (Bdnf +/+ i Bdnf +/+T). Natomiast nie wykazano istotnie statystycznych różnic w aktywnościach pozostałych enzymów (LDH i ALP) badanych w wątrobie i sercu pomiędzy szczurami o genotypie BDNF knockout a szczurami niemodyfikowanymi genetycznie (Bdnf +/- i Bdnf +/-T vs. Bdnf +/+ i Bdnf +/+T).

W wątrobie umiarkowany trening wytrzymałościowy powodował, że aktywności ALAT i ASAT w grupie heterozygotycznych szczurów z delecją genu BDNF (Bdnf+/-) były wyższe, a aktywności LDH w obu grupach trenowanych szczurów (Bdnf+/-T i Bdnf+/-) – istotnie niższe w porównaniu z odpowiadającymi im grupami (Bdnf+/- i Bdnf+/-). Natomiast nie wykazano różnic w aktywnościach pozostałych badanych w wątrobie enzymów (ALP i GGT) między grupami szczurów trenowanych (Bdnf+/-T i Bdnf+/-) i nietrenowanych (Bdnf+/- i Bdnf+/-).

Jednocześnie w mięśniu sercowym nie wykazano żadnych istotnych statystycznie różnic w aktywnościach omawianych enzymów (ALAT, ASAT, GGT i LDH) pomiędzy grupami szczurów trenowanych (Bdnf+/-T i Bdnf+/-) i nietrenowanych (Bdnf+/- i Bdnf+/-).

### *Aktywność INS oraz LEPT w wątrobie*

Dodatkowe pomiary hormonów w wątrobie nie wykazały żadnych istotnych różnic w aktywności INS i stężeniu LEPT pomiędzy grupami szczurów o odmiennych genotypach BDNF (Bdnf +/- i Bdnf +/-T vs. Bdnf +/+ i Bdnf +/+T). Natomiast zaobserwowano znacząco wyższe stężenia i aktywności badanych hormonów u szczurów z obu trenowanych grup (Bdnf+/-T i Bdnf+/-) w porównaniu ze szczurami z grup nietrenowanych (Bdnf+/- i Bdnf+/-).

### *Stężenie IL-6 w wątrobie*

Zaobserwowano wyższe stężenie IL-6 u szczurów z populacji BDNF knockout (Bdnf+/- i Bdnf+/-T) w porównaniu ze szczurami niemodyfikowanymi genetycznie (Bdnf+/- i Bdnf+/-T). Jednak w tym przypadku wystąpiła istotna statystycznie interakcja pomiędzy genotypem a treningiem, stąd ta różnica była spowodowana znacząco wyższym stężeniem IL-6 u trenowanych szczurów z usuniętym genem BDNF w porównaniu z pozostałymi badanymi grupami.

### *Stężenie IL-1 w mięśniu sercowym*

W przypadku IL-1 nie wykazano żadnych istotnych różnic pomiędzy grupami szczurów z delecją genu BDNF (Bdnf+/- i Bdnf+/-T) a odpowiadającymi im grupami szczurów niemodyfikowanych genetycznie (Bdnf+/- i Bdnf+/-T), jak również pomiędzy grupami szczurów trenowanych (Bdnf+/-T i Bdnf+/-) i nietrenowanych (Bdnf+/- i Bdnf+/-).

### *Stężenie CK i CK-MB w mięśniu sercowym*

Aktywność CK i CK-MB w mięśniu sercowym u szczurów z grup o zmienionym genotypie BDNF (Bdnf+/- i Bdnf+/-T) była istotnie niższa w porównaniu z odpowiednimi grupa-



mi szczurów niemodyfikowanych genetycznie (Bdnf+/+ i Bdnf+/+T). Ponadto wykazano, że szczury z obu grup trenowanych (Bdnf+/+T i Bdnf+/-T) miały wyższe stężenie CK w sercu niż zwierzęta z grup nietrenowanych (Bdnf+/+ i Bdnf+/-). Natomiast aktywność CK-MB nie różniła się pomiędzy nietrenowanymi (Bdnf+/+ i Bdnf+/-) a trenowanymi (Bdnf+/+T i Bdnf+/-T) szczurami.



## 6. DYSKUSJA

### *Konsekwencje delekcji genu BDNF dla metabolizmu wątroby i mięśnia sercowego*

W dotychczasowych badaniach wykazano, że hepatocyty wątroby są głównym miejscem syntezy cząsteczek CHOL (Zhou i Sun 2021) oraz formowania LDL (Feingold 2022), który transportuje CHOL z wątroby do komórek innych narządów obwodowych (von Eckardstein 2020). Stąd badania przeprowadzone przez Abdel-Gayouma i Ahmidę (2017) oraz Ogunmoyole i in. (2019) wykazały odwrotnie proporcjonalną zależność stężenia CHOL i LDL w wątrobie w odniesieniu do ich stężeń we krwi.

Przeprowadzone przez nas eksperymenty udowodniły, że heterozygotyczne szczury z delecją genu BDNF ( $Bdnf+/-$  i  $Bdnf+/-T$ ) miały znacząco niższe stężenia niektórych lipidów (CHOL i LDL) w wątrobie w porównaniu ze szczurami niemodyfikowanymi genetycznie ( $Bdnf+/+$  i  $Bdnf+/+T$ ). Taki wynik wskazuje na zaburzenia akumulacji i magazynowania CHOL w wątrobie oraz sugeruje jego wyciek i akumulację do naczyń krwionośnych u szczurów pozbawionych jednego allele genu BDNF, który może przyczyniać się do tworzenia miażdżycy (Subczynski i Pasenkiewicz-Gierula 2020). W związku z tym można sądzić, że zwierzęta te charakteryzują się zwiększonym ryzykiem rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. Taki wniosek potwierdziły nasze badania wykonane na mięśniu sercowym, które również wykazały obecność znacząco niższych poziomów CHOL i LDL w tym narządzie, wskazującą na wyciek lipoprotein do krwiobiegu, która prowadzi do miażdżycy tętnic sercowych i powoduje w rezultacie niedotlenienie tkanek organizmu (Abe i in. 2017; Choy i in. 2001; Hou i in. 2023; Pober i Sessa 2007).

Dodatkowo heterozygotyczne szczury z delecją genu BDNF ( $Bdnf+/-$  i  $Bdnf+/-T$ ) charakteryzowały się mniejszą aktywnością niektórych enzymów metabolicznych wątroby (ALAT i GGT) w porównaniu ze szczurami niemodyfikowanymi genetycznie ( $Bdnf+/+$  i  $Bdnf+/+T$ ). ALAT jest kluczowy dla przemian aminokwasów (Glinghammar i in. 2009), podczas gdy GGT bierze udział w metabolizmie glutationu (Hanigan i in. 2015). W związku z tym niższa aktywność wymienionych enzymów wskazuje na ich mniej wydajne działanie w wątrobie, prawdopodobnie związane z ich uwalnianiem z cytoplazmy hepatocytów do krwi, które obserwuje się w różnych dysfunkcjach wątroby (Deoras i in. 1997; Ogunmoyole i in. 2019; Vermeulen i in. 1992). Należy podkreślić, że określenie aktywności ALAT i GGT we krwi ma znaczenie w diagnostyce chorób wątroby (Carobene i in. 2013; Green i Flamm 2002) powiązanych z nadwagą, otyłością, syndromem metabolicznym oraz chorobami sercowo-naczyniowymi (Johansen i in. 2020; Sookoian i Pirola 2015).

Ponadto w naszych badaniach zaobserwowano znacząco niższą aktywność enzymów metabolicznych, takich jak ALAT, ASAT i GGT, w mięśniu sercowym heterozygotycznych szczurów z delecją genu BDNF ( $Bdnf+/-$  i  $Bdnf+/-T$ ). Według Abdulkareema i in. (2019) zmniejszona aktywność tych enzymów w określonej tkance wynika z ich wycieku do krwiobiegu, gdzie widoczna jest ich zwiększona aktywność. W związku z tym zaobserwowany w naszych eksperymentach spadek aktywności enzymów metabolicznych w sercu szczurów z delecją genu BDNF mógł skutkować ich zwiększoną aktywnością we krwi obwodowej. Jiang (2013), Ndrepepa (2021), Ndrepepa i Kastrati (2016), Raval i in. (2019) oraz Washington i Van Hoosier (2012) wykazali, że podwyższone poziomy aktywności

ALAT i ASAT we krwi mogą świadczyć o uszkodzeniu serca oraz chorobie sercowo-naczyniowej, natomiast podwyższona aktywność GGT jest powiązana z występowaniem choroby wieńcowej (Jiang i in. 2013).

Podobieństwo uzyskanych przez nas wyników badań przeprowadzonych w wątrobie i mięśniu sercowym heterozygotycznych szczurów z ubytkiem jednego allela genu BDNF (spadek stężeń CHOL i LDL oraz obniżenie aktywności ALAT, ASAT i GGT) sugeruje silną interakcję pomiędzy czynnością wątroby i serca tych zwierząt, wskazując na istnienie osi serce–wątroba, zidentyfikowanej wcześniej u pacjentów ze współistniejącą chorobą serca i wątroby (Møller i Bernardi 2013). Jednocześnie wykazane powyżej nieprawidłowości w metabolizmie wątroby i serca wyraźnie wskazują na możliwość pojawienia się symptomów syndromu metabolicznego u zwierząt zmodyfikowanych genetycznie. Dodatkowo świadczy o tym podwyższony poziom TG obserwowany w wątrobie szczurów z ubytkiem jednego allela genu BDNF. TG są pozyskiwane ze źródeł pokarmowych oraz syntetyzowane w wątrobie i magazynowane w hepatocytach (Alves-Bezerra i Cohen 2017). U zwierząt z ubytkiem jednego allela genu BDNF zaobserwowano zwiększone spożycie pokarmu, które mogło być przyczyną podwyższenia stężenia TG w wątrobie, prowadzącego do powiększenia masy oraz stłuszczenia tego narządu (Garnol i in. 2016). W konsekwencji u szczurów z ubytkiem genu BDNF zanotowano znaczący wzrost średniej masy wątroby (o 4,6 g) w porównaniu ze zwierzętami o normalnym genotypie BDNF. Dodatkowo według Ahmadian i in. (2009) zwiększony poziom TG w wątrobie może być powiązany z akumulacją TG w tkance tłuszczowej i w konsekwencji prowadzić do wzrostu masy ciała, który również odnotowano u badanych szczurów pozbawionych jednego allela genu BDNF (o 138,43 g). Warto podkreślić, że eksperymenty, w których dokonywano podskórnej iniekcji BDNF, skutkowały zmniejszeniem masy i stężenia TG w wątrobie otyłych myszy z cukrzycą (Tsuchida i in. 2002).

Kolejnym argumentem świadczącym o możliwości wystąpienia objawów zespołu metabolicznego u heterozygotycznych szczurów z delecją genu BDNF była zmniejszona aktywność enzymów CK i CK-MB obserwowana w mięśniu sercowym tych zwierząt. W dotychczasowych badaniach mniejsza aktywność wymienionych enzymów wskazywała również na niewydolność lub dysfunkcję serca (Lygate i in. 2007; Nascimben i in. 1996) wynikającą z jego niedokrwienia, martwicy lub zawału (Patel i in. 2010; Sammeturi i in. 2019; Shen i in. 2019).

Zmianom stężeń oraz aktywności specyficznych biomarkerów metabolicznych w wątrobie i sercu heterozygotycznych szczurów z delecją genu BDNF towarzyszyły również różnice w koncentracji BDNF oraz odpowiedniego dla tego czynnika neurotroficznego receptora Trk-B, a więc zaburzenia osi sygnalizacyjnej BDNF/Trk-B. W związku z tym na podstawie naszych badań można zaproponować następującą ścieżkę negatywnych konsekwencji metabolicznych/zdrowotnych związanych z delecją genu BDNF: znacząco niższe stężenia BDNF i Trk-B w wątrobie szczurów BDNF knockout (Bdnf+/- i Bdnf+/-T) w porównaniu ze szczurami niemodyfikowanymi genetycznie (Bdnf+/+ i Bdnf+/+T), czyli zaburzenie osi sygnalizacyjnej BDNF/Trk-B, przyczynia się do zmiany metabolizmu lipidów i aktywności enzymów wątrobowych, prowadząc w efekcie do stłuszczenia wątroby oraz otyłości. Nasze obserwacje potwierdzają wcześniejsze badania, które wykazały znacząco niższe stężenie BDNF w osoczu krwi tych zwierząt w porównaniu ze zwierzętami niemodyfikowanymi genetycznie (Grzelak i in. 2023), jak również z badaniami Belviranlego i Okudan (2018), Chaldakova i in. (2004) oraz Sustar i in. (2019) wskazujących na związek obniżonego poziomu BDNF we krwi z częstszym występowaniem otyłości oraz chorób sercowo-naczyniowych, które są uważane za wskaźniki zespołu metabolicznego.

W niniejszych badaniach wykazano, że w mięśniu sercowym heterozygotycznych szczurów z delecją genu BDNF (Bdnf+/- i Bdnf+/-T) nie ma istotnych różnic w stężeniu BDNF, ale istnieje znacząco wyższy poziom receptorów Trk-B tych zwierząt w porównaniu ze szczurami niemodyfikowanymi genetycznie (Bdnf+/+ i Bdnf+/+T). Wyniki te są zgodne z tymi uzyskanymi przez Fenga i in. (2015) oraz Gongga i in. (2020), które wykazały podwyższone poziomy Trk-B w niewydolnych miocytach myszy pozbawionych allele genu BDNF oraz w mięśniu sercowym szczura po indukowanym niedotlenieniu. Wzrost poziomu receptorów Trk-B w mięśniu sercowym u szczurów z delecją genu BDNF mógł wynikać z obniżenia poziomu BDNF we krwi i kompensować niedobory BDNF w krwiobiegu (Okada i in. 2012). Innym wyjaśnieniem tego zjawiska może być zmniejszona skuteczność sygnalizacji receptorów Trk-B, która następuje w wyniku obniżenia poziomu CHOL w błonie kardiomiocytów, prowadzącego do zmiany ich średnicy (Casarotto i in. 2021).

Ponadto wykazano, że poziom IL-1, kluczowej ogólnoustrojowej cytokiny prozapalnej (Dinarello 2011; Dinarello i van der Meer 2013; Javan i in. 2022), nie ulegał zmianie w sercu zmodyfikowanych genetycznie zwierząt. Stąd zaobserwowany brak stanu zapalnego mięśnia sercowego u szczurów z delecją genu BDNF mógł wynikać z odnotowanego zwiększenia poziomu receptorów Trk-B, które według Hanga i in. (2015) stabilizują działanie osi BDNF/Trk-B, przeciwdziałając uszkodzeniom mięśnia sercowego oraz hamując apoptozę kardiomiocytów.

#### *Wpływ treningu wytrzymałościowego na metabolizm wątroby i serca szczurów z delecją genu BDNF*

Ćwiczenia aerobowe są rekomendowane w celu poprawy profilu lipidowego (Mann i in. 2014), poprawy stanu zdrowia (Moreira i in. 2020), optymalizacji czynności serca (Verboven i in. 2019) oraz przeciwdziałania objawom syndromu metabolicznego (Mrówczyński 2019). Nasze wcześniejsze badania wykazały, że trening wytrzymałościowy o umiarkowanej intensywności zwiększał stężenie BDNF, Trk-B, neurotroficznego czynnika pochodzenia glejowego oraz wybranych miokina (mioglobina i interleukina 15) w mięśniach kończyn tylnych trenowanych szczurów, a także wpływał na pobudliwość szybkich motoneuronów rdzenia kręgowego (Grzelak i in. 2023). Jednocześnie trening nie powodował wzrostu stężenia BDNF we krwi obwodowej, co było zgodne z wynikami Gaitán i in. (2021), którzy również nie odnotowali zmian poziomu BDNF we krwi po 26 tygodniach ćwiczeń aerobowych u dorosłych ludzi.

Uzyskane wyniki wykazały, że 5-tygodniowy trening wytrzymałościowy o umiarkowanej intensywności nie wpłynął na poziomy BDNF oraz Trk-B w wątrobie i sercu ani na stężenia CHOL, LDL i innych biomarkerów (lipidów, lipoprotein i enzymów metabolicznych) w mięśniu sercowym szczurów z obu trenowanych grup (Bdnf+/+T i Bdnf+/-T). Sugeruje to, że taki rodzaj treningu jest mniej skuteczny w modulowaniu osi sygnalizacyjnej BDNF/Trk-B, zwiększaniu poziomu BDNF we krwi oraz poprawie profilu lipidowego wątroby w porównaniu z treningiem interwałowym o wysokiej intensywności (Cao i in. 2022; Marrofi i in. 2022).

Trening wytrzymałościowy zwiększał jednak aktywność ALAT i ASAT w wątrobie heterozygotycznych szczurów z delecją genu BDNF (Bdnf+/-), co może wskazywać na poprawę funkcjonowania tego organu. Podobne wnioski przedstawili Haukeland i in. (2008) oraz Skrypnik i in. (2016), którzy zaobserwowali obniżenie poziomów tych enzymów we krwi u osób z otyłością lub zespołem metabolicznym.

Dodatkowo nasze badania wykazały, że trening wytrzymałościowy powodował znacznie niższą aktywność wątrobowego enzymu LDH, kluczowego dla metabolizmu komórko-

wego (glikolizy beztlenowej) (Farhana i Lappin 2023), u szczurów z obu trenowanych grup (Bdnf+/+T i Bdnf+/-T). Wynik ten sugerował więc pozytywny wpływ treningu wytrzymałościowego na funkcje metaboliczne wątroby, świadcząc o potreningowym zmniejszeniu ryzyka wystąpienia zaburzeń metabolicznych wątroby (Lupa i in. 1994), niezależnie od genotypu badanych zwierząt. Ponadto po treningu wytrzymałościowym obserwowano, również niezależnie od genotypu zwierząt, odpowiednio wyższe stężenie INS i aktywność LEPT w wątrobie, które uważa się za czynniki regulujące masę ciała i poziom glukozy (Karacabey 2009). Natomiast jedyną zmianą obserwowaną w mięśniu sercowym szczurów z obu trenowanych grup (Bdnf+/+T i Bdnf+/-T) była wyższa aktywność CK, która z kolei sugerowała zwiększoną produkcję i zużycie energii w mięśniu sercowym, co prawdopodobnie świadczyło o poprawie czynności serca trenowanych zwierząt (Zervou i in. 2015). W związku z tym zastosowanie treningu wytrzymałościowego wydaje się obiecującym zabiegiem terapeutycznym w zapobieganiu i leczeniu niedokrwiennej choroby sercowo-naczyniowej (Kitzenberg i in 2016).

Warto podkreślić, że u trenowanych szczurów z niedoborem BDNF (Bdnf+/-T) wykazano wyższe stężenie IL-6 w wątrobie w stosunku do szczurów nietrenowanych z niedoborem BDNF (Bdnf+/-). Wiadomo, że nawet pojedyncza iniekcja IL-6 może przywrócić ekspresję genu u myszy z niedoborem genu IL-6, skutkując proliferacją hepatocytów i hamowaniem procesu uszkodzenia wątroby (Cressman i in. 1996). Garnol i in. (2016) wykazali podwyższony poziom IL-6 w wątrobie po częściowej hepatektomii, co wskazywało, że jest on czynnikiem inicjującym regenerację wątroby. W związku z tym uważa się, że IL-6 odgrywa kluczową rolę w promowaniu proliferacji hepatocytów i regeneracji wątroby. Ponadto wiadomo, że produkcja IL-6 odbywa się przede wszystkim w komórkach mięśniowych podczas aktywności fizycznej (Steinbacher i Eckl 2015), z których jest ona uwalniana do krwiobiegu (Fischer 2006) i wychwytywana przez wątrobę (Febbraio i in. 2003). Stąd uzyskany wynik sugeruje, że trening wytrzymałościowy o umiarkowanej intensywności prowadził do zwiększenia proliferacji hepatocytów oraz inicjował regenerację wątroby zwierząt z obniżonym poziomem BDNF i Trk-B w tym narządzie.

Podsumowując, w wątrobie i mięśniu sercowym heterozygotycznych szczurów z ubytkiem jednego allele genu BDNF wykazano znacząco niższe stężenia lipidów i lipoprotein (CHOL i LDL), jak również niższe aktywności niektórych enzymów metabolicznych (ALAT, ASAT i GGT) niż u zwierząt niemodyfikowanych genetycznie, co sugeruje nieprawidłowości w metabolizmie wątroby i serca oraz wskazuje na możliwość pojawienia się symptomów syndromu metabolicznego u zwierząt zmodyfikowanych genetycznie. Spójność uzyskanych wyników sugeruje silną interakcję pomiędzy czynnością wątroby i mięśnia sercowego u heterozygotycznych szczurów z ubytkiem jednego allele genu BDNF (Bdnf+/-), wskazując na istnienie osi serce-wątroba. Należy podkreślić, że znaczna liczba genów odpowiedzialnych za rozwój syndromu metabolicznego znajduje się w pobliżu regionów występowania genów BDNF, podczas gdy szerokie spektrum szlaków sygnałowych kontrolujących rozwój zespołu metabolicznego jest regulowane przez ekspresję BDNF (Todosenko i in. 2024). Zatem szczury z delecją genu BDNF mogą charakteryzować się zaburzoną homeostazą procesów metabolicznych, które przyczyniają się do rozwoju zespołu metabolicznego.

Trening wytrzymałościowy o umiarkowanej intensywności indukował przede wszystkim wzrost aktywności wątrobowej ALAT i ASAT oraz stężenia IL-6 u szczurów z delecją BDNF. Takie wyniki wskazywały na poprawę wydajności szlaków metabolicznych w wątrobie oraz sugerowały udział wytwarzanej przez mięśnie szkieletowe IL-6 w procesie regeneracji tego organu. Dodatkowo zastosowany trening wytrzymałościowy powodował

wzrost stężeń INS i LEPT w wątrobie oraz zwiększenie aktywności CK w mięśniu sercowym wszystkich trenowanych szczurów, co sugerowało odpowiednio polepszenie metabolizmu tłuszczów prowadzące do obserwowanego ubytku masy ciała oraz poprawę efektywności działania szlaków energetycznych, niezależnie od genotypu badanych zwierząt doświadczalnych.



## 7. WNIOSKI

1. Delecja jednego allele genu BDNF przyczyniała się do zaburzenia osi sygnalizacyjnej BDNF/Trk-B zarówno w wątrobie (gdzie obserwowano niższą koncentrację BDNF i Trk-B), jak i w mięśniu sercowym (gdzie obserwowano znacząco wyższe stężenie poziomu receptorów Trk-B przy zachowanym stężeniu BDNF). W przypadku mięśnia sercowego zanotowany wzrost poziomu receptorów Trk-B mógł być mechanizmem kompensacyjnym w odpowiedzi na niższe stężenie BDNF w krwiobiegu lub na zmianę konformacji receptorów Trk-B wywołaną niskim stężeniem CHOL w błonie kardiomiocytów.
2. Zakłócenia osi sygnalizacyjnej BDNF/Trk-B były powiązane głównie z zaburzeniami gospodarki lipidowej i metabolizmu wątroby (niższe stężenia LDL i CHOL, wyższy poziom TG, wyższa aktywność ALAT i GGT) oraz mięśnia sercowego (niższe stężenia LDL i CHOL, mniejsza aktywność enzymów: ALAT, ASAT, GGT, CK i CK-MB). Podobieństwa zmian metabolicznych występujących w obu tych narządach sugerowały silną interakcję pomiędzy czynnością wątroby i mięśnia sercowego u heterozygotycznych szczurów z ubytkiem jednego allele genu BDNF (Bdnf+/-). Łącznie uzyskane wyniki sugerowały możliwość wystąpienia stłuszczenia wątroby oraz niedokrwienia lub niedotlenienia mięśnia sercowego, które mogą prowadzić do powstania syndromu metabolicznego u zmodyfikowanych genetycznie zwierząt.
3. Głównym efektem zastosowanego treningu wytrzymałościowego było wyższe stężenie IL-6, zanotowane u szczurów z grupy BDNF knockout, co sugeruje powysiłkową regenerację wątroby tych zwierząt. Natomiast trening przyczynił się również do większej koncentracji INS i LEPT oraz niższej aktywności LDH w wątrobie, a także wyższej aktywności CK w mięśniu sercowym badanych zwierząt, niezależnie od genotypu, które łącznie sugerują potreningową poprawę regulacji procesów metabolicznych prowadzących do niższej masy ciała oraz efektywności działania szlaków energetycznych mięśnia sercowego.

## 8. PIŚMIENNICTWO

- Abdel-Gayoum A.A., Ahmida M.H.S. (2017) Changes in the serum, liver, and renal cortical lipids and electrolytes in rabbits with cisplatin-induced nephrotoxicity. *Turk J Med Sci*, 47 (3), 1019–1027. <https://doi.org/10.3906/sag-1602-136>
- Abdulkareem A.O., Olafimihan T.F., Busari S.A., Garuba A., Oladipo S.O. (2019) Cardiorenal effects of pharmaceutical plant effluent in mice (*mus musculus*). *Niger J Physiol Sci*, 34, 215–221.
- Abe H., Semba H., Takeda N. (2017) The roles of hypoxia signaling in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *J Atheroscler Thromb*, 24 (9), 884–894. <https://doi.org/10.5551/jat.RV17009>
- Ahmadian M., Duncan R.E., Sul H.S. (2009) The skinny on fat: lipolysis and fatty acid utilization in adipocytes. *Trends Endocrinol Metab*, 20 (9), 424–428. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.06.002>
- Alomari M.A., Khabour O.F., Maikano A., Alawneh K. (2015) Vascular function and brain-derived neurotrophic factor: the functional capacity factor. *Vasc Med*, 20 (6), 518–526. <https://doi.org/10.1177/1358863X15598390>
- Alves-Bezerra M., Cohen D.E. (2017) Triglyceride metabolism in the liver. *Compr Physiol*, 8, 1–8. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170012>
- Aravamudan B., Thompson M.A., Pabelick C.M., Prakash Y.S. (2016) Mechanisms of BDNF regulation in asthmatic airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 311 (2), L270–279. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00414.2015>
- Arem H., Moore S.C., Patel A., Hartge P., Berrington de Gonzalez A., Visvanathan K., Campbell P.T., Freedman M., Weiderpass E., Adami H.O., Linet M.S., Lee I.-M., Matthews Ch.E. (2015) Leisure time physical activity and mortality: a detailed pooled analysis of the dose-response relationship. *JAMA Intern Med*, 175 (6), 959. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2015.0533>
- Bahls M., Könemann S., Markus M.R.P., Wenzel K., Friedrich N., Nauck M., Völzke H., Steveling A., Janowitz D., Grabe H.-J., Felix S.B., Dörr M. (2019) Brain-derived neurotrophic factor is related with adverse cardiac remodeling and high NTproBNP. *Sci Rep*, 9, 15421. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51776-8>
- Bathina S., Das U.N. (2015) Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Arch Med Sci*, 11 (6), 1164–1178. <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.56342>
- Belviranlı M., Okudan N. (2018) Exercise training increases cardiac, hepatic and circulating levels of brain-derived neurotrophic factor and irisin in young and aged rats. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 36 (3). <https://doi.org/10.1515/hmbci-2018-0053>
- Canbay A., Bechmann L., Gerken G. (2007) Lipid metabolism in the liver. *Z Gastroenterol*, 45 (1), 35–41. <https://doi.org/10.1055/s-2006-927368>
- Cao M., Li S., Tang Y., Zou Y. (2022) A meta-analysis of high-intensity interval training on glycolipid metabolism in children with metabolic disorders. *Front Pediatr*, 10, 887852. <https://doi.org/10.3389/fped.2022.887852>
- Carobene A., Braga F., Roraas T., Sandberg S., Bartlett W.A. (2013) A systematic review of data on biological variation for alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and  $\gamma$ -glutamyl transferase. *Clin Chem Lab Med*, 51 (10), 1997–2007. <https://doi.org/10.1515/cclm-2013-0096>

- Casarotto P.C., Giry M., Fred S.M., Kovaleva V., Moliner R., Enkavi G., Biojone C., Canarozzo C., Sahu M.P., Kaurinkoski K., Brunello C.A., Steinzeig A., Winkel F., Patil S., Vestring S., Serchov T., Diniz C.R.A.F., Laukkanen L., Cardon I., Antila H., Rog T., Piepponen T.P., Bramham C.R., Normann C., Lauri S.E., Saarma M., Vattulainen I., Castrén E. (2021) Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors. *Cell*, 184 (5), 1299–1313.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.034>
- Cassiman D., Denef C., Desmet V. J., Roskams T. (2001) Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology*, 33 (1), 148–158. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.20793>
- Chaldakov G.N., Fiore M., Stankulov I.S., Manni L., Hristova M.G., Antonelli A., Ghenev P.I., Aloe L. (2004) Neurotrophin presence in human coronary atherosclerosis and metabolic syndrome: a role for NGF and BDNF in cardiovascular disease?. *Prog Brain Res*, 146, 279–289. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(03\)46018-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(03)46018-4)
- Choy J.C., Granville D.J., Hunt D.W.C., McManus B.M. (2001) Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol*, 33 (9), 1673–1690. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1419>
- Cressman D.E., Greenbaum L.E., DeAngelis R.A., Ciliberto G., Furth E.E., Poli V., Taub R. (1996) Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science*, 274 (5291), 1379–1383. <https://doi.org/10.1126/science.274.5291.1379>
- Deoras D.P., Young-Curtis P., Dalvi R.R., Tippet F.E. (1997) Effect of gossypol on hepatic and serum gamma-glutamyltransferase activity in rats. *Vet Res Commun*, 21, 317–323. <https://doi.org/10.1023/a:1005856119553>
- Di Rosa M.C., Zimbone S., Saab M.W., Tomasello M.F. (2021) The pleiotropic potential of BDNF beyond neurons: implication for a healthy mind in a healthy body. *Life (Basel)*, 11 (11), 1256. <https://doi.org/10.3390/life11111256>
- Dickhuth H.H., Röcker K., Mayer F., König D., Korsten-Reck U. (2004) Ausdauersport und kardiale adaptation (Sporttherz). *Herz*, 29. <https://doi.org/10.1007/s00059-004-2582-4>
- Dinarelli C.A. (2011) Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, 117 (14), 3720–3732. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-273417>
- Dinarelli C.A., van der Meer J.W.M. (2013) Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin Immunol*, 25 (6), 469–484. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.008>
- Dinoff A., Herrmann N., Swardfager W., Liu C.S., Sherman C., Chan S., Lanctôt K.L. (2016) The effect of exercise training on resting concentrations of peripheral brain-derived neurotrophic factor (BDNF): a meta-analysis. *PLoS One*, 11 (9), e0163037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163037>
- von Eckardstein A. (2020) CME-Labor 61: Neue Europäische Konsensus-Empfehlungen zur Dyslipidämie [CME-Laboratory 61: New European Consensus Recommendations on Dyslipidemia]. *Praxis (Bern 1994)*, 109 (3), 215–220. <https://doi.org/10.1024/1661-8157/a003437>
- Ejiri J., Inoue N., Kobayashi S., Shiraki R., Otsui K., Honjo T., Takahashi M., Ohashi Y., Ichikawa S., Terashima M., Mori T., Awano K., Shinke T., Shite J., Hirata K-i, Yokozaki H., Kawashima S., Yokoyama M. (2005) Possible role of brain-derived neurotrophic factor in the pathogenesis of coronary artery disease. *Circulation*, 112 (14), 2114–2120. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.476903>
- Farhana A., Lappin S.L. (2023) Biochemistry, Lactate Dehydrogenase. W: StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557536/> (dostęp: 30.05.2023).



- Febbraio M.A., Ott P., Nielsen H.B., Steensberg A., Keller C., Krstrup P., Secher N.H., Pedersen B.K. (2003) Hepatosplanchnic clearance of interleukin-6 in humans during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285 (2), E397–E402. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00134.2003>
- Feingold K.R. (2022) Lipid and lipoprotein metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 51 (3), 437–458. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2022.02.008>
- Feng N., Huke S., Zhu G., Tocchetti C.G., Shi S., Aiba T., Kaludercic N., Hoover D.B., Beck S.E., Mankowski J.L., Tomaselli G.F., Bers D.M., Kass D.A., Paolocci N. (2015) Constitutive BDNF/TrkB signaling is required for normal cardiac contraction and relaxation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112 (6), 1880–1885. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417949112>
- Fischer C.P. (2006) Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance?. *Exerc Immunol Rev*, 12, 6–33.
- Fulgenzi G., Hong Z., Tomassoni-Ardori F., Barella L.F., Becker J., Barrick C., Swing D., Yanpallewar S., St Croix B., Wess J., Gavrilova O., Tessarollo L. (2020) Novel metabolic role for BDNF in pancreatic  $\beta$ -cell insulin secretion. *Nat Commun*, 11, 1950. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15833-5>
- Fulgenzi G., Tomassoni-Ardori F., Babini L., Becker J., Barrick C., Puverel S., Tessarollo L. (2015) BDNF modulates heart contraction force and long-term homeostasis through truncated TrkB.T1 receptor activation. *J Cell Biol*, 210 (6), 1003–1012. <https://doi.org/10.1083/jcb.201502100>
- Gaitán J.M., Moon H.Y., Stremlau M., Dubal D.B., Cook D.B., Okonkwo O.C., van Praag H. (2021) Effects of aerobic exercise training on systemic biomarkers and cognition in late middle-aged adults at risk for Alzheimer's disease. *Front Endocrinol*, 12, 660181. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.660181>
- Garnol T., Kučera O., Staňková P., Lotková H., Červinková Z. (2016) Does simple steatosis affect liver regeneration after partial hepatectomy in rats?. *Acta Med*, 59 (2), 35–42. <https://doi.org/10.14712/18059694.2016.87>
- Genzer Y., Chapnik N., Froy O. (2017) Effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on hepatocyte metabolism. *Int J Biochem Cell Biol*, 88, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.05.008>
- Glinghammar B., Rafter I., Lindström A.-K., Hedberg J.J., Andersson H.B., Lindblom P., Berg A.-L., Cotgreave I. (2009) Detection of the mitochondrial and catalytically active alanine aminotransferase in human tissues and plasma. *Int J Mol Med*, 23 (5), 621–631. [https://doi.org/10.3892/ijmm\\_00000173](https://doi.org/10.3892/ijmm_00000173)
- Gong J., Zhou F., Xie S., Wang X., Xu J., Xiao F. (2020) Caveolin-3 protects diabetic hearts from acute myocardial infarction/reperfusion injury through  $\beta$ 2AR, cAMP/PKA, and BDNF/TrkB signaling pathways. *Aging*, 12 (14), 14300–14313. <https://doi.org/10.18632/aging.103469>
- Gordon T. (2009) The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurg Focus*, 26 (2), E3. <https://doi.org/10.3171/FOC.2009.26.2.E3>
- Green R.M., Flamm S. (2002) AGA technical review on the evaluation of liver chemistry tests. *Gastroenterology*, 123 (4), 1367–1384. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.36061>
- Grzelak N., Krutki P., Bączyk M., Kaczmarek D., Mrówczyński W. (2023) Influence of altered serum and muscle concentrations of BDNF on electrophysiological properties of spinal motoneurons in wild-type and BDNF-knockout rats. *Sci Rep*, 13, 4571. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31703-8>
- Han H.-S., Kang G., Kim J.S., Choi B.H., Koo S.-H. (2016) Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp Mol Med*, 48, e218. <https://doi.org/10.1038/emmm.2015.122>

- Hang P, Zhao J, Cai B, Tian S, Huang W, Guo J, Sun Ch., Li Y, Du Z. (2015) Brain-derived neurotrophic factor regulates TRPC3/6 channels and protects against myocardial infarction in rodents. *Int J Biol Sci*, 11 (5), 536–545. <https://doi.org/10.7150/ijbs.10754>
- Hanigan M.H., Gillies E.M., Wickham S., Wakeham N., Wirsig-Wiechmann C.R. (2015) Immunolabeling of gamma-glutamyl transferase 5 in normal human tissues reveals that expression and localization differ from gamma-glutamyl transferase 1. *Histochem Cell Biol*, 143, 505–515. <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1295-x>
- Haukeland J.W., Schreiner L.T., Lorgen I., Frigstad S.-O., Bang C., Raknerud N., Konopski Z. (2008) ASAT/ALAT ratio provides prognostic information independently of Child-Pugh class, gender and age in non-alcoholic cirrhosis. *Scand J Gastroenterol*, 43 (10), 1241–1248. <https://doi.org/10.1080/00365520802158614>
- Hou P, Fang J., Liu Z., Shi Y., Agostini M., Bernassola F., Bove P., Candi E., Rovella V., Sica G., Sun Q., Wang Y., Scimeca M., Federici M., Mauriello A., Melino G. (2023) Macrophage polarization and metabolism in atherosclerosis. *Cell Death Dis*, 14 (10), 691. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06206-z>
- Iu E.C.Y., Chan C.B. (2022) Is brain-derived neurotrophic factor a metabolic hormone in peripheral tissues?. *Biology* 11 (7), 1063. <https://doi.org/10.3390/biology11071063>
- Javan H., Li L., Schaaf C.L., Lee Y.S., Salama M.E., Dinarello C.A., Selzman C.H. (2022) Interleukin-1 receptor antagonism abrogates acute pressure overload-induced murine heart failure. *Ann Thorac Surg*, 114 (1), 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2021.07.044>
- Ji Y., Lu Y., Yang F., Shen W., Tang T.T.-T., Feng L., Duan S., Lu B. (2010) Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons. *Nat Neurosci*, 13, 302–309. <https://doi.org/10.1038/nn.2505>
- Jiang S., Jiang D., Tao Y. (2013) Role of gamma-glutamyltransferase in cardiovascular diseases. *Exp Clin Cardiol*, 18, 53–56.
- Jiménez-Maldonado A., de Álvarez-Buylla E.R., Montero S., Melnikov V., Castro-Rodríguez E., Gamboa-Domínguez A., Rodríguez-Hernández A., Lemus M., Murguía J.M. (2014) Chronic exercise increases plasma brain-derived neurotrophic factor levels, pancreatic islet size, and insulin tolerance in a TrkB-dependent manner. *PLoS One*, 9 (12), e115177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115177>
- Johansen M.J., Gade J., Stender S., Frithioff-Bøjsøe C., Lund M.A.V., Chabanova E., Thomsen H.S., Pedersen O., Fonvig C.E., Hansen T., Holm J.-Ch. (2020) The effect of overweight and obesity on liver biochemical markers in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*, 105 (2), dgz010. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgz010>
- Kadowaki S., Shishido T., Honda Y., Narumi T., Otaki Y., Kinoshita D., Nishiyama S., Takahashi H., Arimoto T., Miyamoto T., Watanabe T., Kubota I. (2016) Additive clinical value of serum brain-derived neurotrophic factor for prediction of chronic heart failure outcome. *Heart Vessels*, 31, 535–544. <https://doi.org/10.1007/s00380-015-0628-6>
- Kaess B.M., Preis S.R., Lieb W., Beiser A.S., Yang Q., Chen T.C., Hengstenberg Ch., Erdmann J., Schunkert H., Seshadri S., Vasan R.S. (2015) Circulating brain – derived neurotrophic factor concentrations and the risk of cardiovascular disease in the community. *JAHA*, 4 (3), e001544. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.001544>
- Karacabey K. (2009) The effect of exercise on leptin, insulin, cortisol and lipid profiles in obese children. *J Int Med Res*, 37 (5), 1472–1478. <https://doi.org/10.1177/147323000903700523>
- Katuri R.B., Gaur G.S., Sahoo J.P., Bobby Z., Shanmugavel K. (2021) Association of circulating brain-derived neurotrophic factor with cognition among adult obese population. *J Obes Metab Syndr*, 30 (2), 163–172. <https://doi.org/10.7570/jomes20107>

- Kermani P, Hempstead B. (2007) Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, 17 (4), 140–143. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2007.03.002>
- Kernie S.G., Liebl D.J., Parada L.F. (2000) BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J*, 19 (6), 1290–1300. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.6.1290>
- Kitzenberg D., Colgan S.P., Glover L.E. (2016) Creatine kinase in ischemic and inflammatory disorders. *Clin Transl Med*, 5, e31. <https://doi.org/10.1186/s40169-016-0114-5>
- Koleva D.I., Orbetzova M.M. (2022) Relationship between serum levels of BDNF and HDL-cholesterol in women with metabolic syndrome. *Atherosclerosis*, 355, 120. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2022.06.583>
- Lalanza J.F., Sanchez-Roige S., Cigarroa I., Gagliano H., Fuentes S., Armario A., Capdevila L., Escorihuela R.M. (2015) Long-term moderate treadmill exercise promotes stress-coping strategies in male and female rats. *Sci Rep*, 5, 16166. <https://doi.org/10.1038/srep16166>
- Li L., Guo H., Lai B., Liang C., Chen H., Chen Y., Guo W., Yuan Z., Huang R., Zeng Z., Liang L., Zhao H., Zheng X., Li Y., Pu Q., Qi X., Cai D. (2022a) Ablation of cardiomyocyte-derived BDNF during development causes myocardial degeneration and heart failure in the adult mouse heart. *Front Cardiovasc Med*, 9, 967463. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.967463>
- Li Y., Li F., Qin D., Chen H., Wang J., Wang J., Song S., Wang Ch., Wang Y., Liu S., Gao D., Wang Z.-H. (2022b) The role of brain derived neurotrophic factor in central nervous system. *Front Aging Neurosci*, 14, 986443. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.986443>
- Lindsay R.M. (1988) Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal regeneration but are not required for survival of adult sensory neurons. *J Neurosci*, 8, (7), 2394–2405. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-07-02394.1988>
- Lupa V.A., Podolin D.A., Roth D.A., Mazzeo R.S. (1994) Influence of aging and endurance training on lactate dehydrogenase in liver and skeletal muscle. *Mech Ageing Dev*, 75 (3), 191–204. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(94\)90009-4](https://doi.org/10.1016/0047-6374(94)90009-4)
- Lygate C.A., Fischer A., Sebag-Montefiore L., Wallis J., Ten Hove M., Neubauer S. (2007) The creatine kinase energy transport system in the failing mouse heart. *J Mol Cell Cardiol*, 42 (6), 1129–1136. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.03.899>
- Lyons W.E., Mamounas L.A., Ricaurte G.A., Coppola V., Reid S.W., Bora S.H., Wihler C., Koliatsos V.E., Tessarollo L. (1999) Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 (26), 15239–15244. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.15239>
- Mann S., Beedie C., Jimenez A. (2014) Differential effects of aerobic exercise, resistance training and combined exercise modalities on cholesterol and the lipid profile: review, synthesis and recommendations. *Sports Med*, 44, 211–221. <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0110-5>
- Manni L., Nikolova V., Vyagova D., Chaldakov G.N., Aloe L. (2005) Reduced plasma levels of NGF and BDNF in patients with acute coronary syndromes. *Int J Cardiol*, 102 (1), 169–171. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2004.10.041>
- Maroofi A., Bagheri Rouch A., Naderi N., Damirchi A. (2022) Effects of two different exercise paradigms on cardiac function, BDNF-TrkB expression, and myocardial protection in the presence and absence of Western diet. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 40, 101022. <https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2022.101022>
- Møller S., Bernardi M. (2013) Interactions of the heart and the liver. *Eur Heart J*, 34 (36), 2804–2811. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh246>

- Moreira J.B.N., Wohlwend M., Wisløff U. (2020) Exercise and cardiac health: physiological and molecular insights. *Nat Metab*, 2, 829–839. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0262-1>
- Motamedi S., Karimi I., Jafari F. (2017) The interrelationship of metabolic syndrome and neurodegenerative diseases with focus on brain-derived neurotrophic factor (BDNF): kill two birds with one stone. *Metab Brain Dis*, 32, 651–665. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-9997-0>
- Mousavi K., Jasmin B.J. (2006) BDNF is expressed in skeletal muscle satellite cells and inhibits myogenic differentiation. *J Neurosci*, 26 (21), 5739–5749. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5398-05.2006>
- Mrówczyński W. (2019) Health benefits of endurance training: implications of the brain-derived neurotrophic factor – a systematic review. *Neural Plast*, 2019, 5413067. <https://doi.org/10.1155/2019/5413067>
- Nakagomi A., Okada S., Yokoyama M., Yoshida Y., Shimizu I., Miki T., Kobayashi Y., Minamino T. (2015) Role of the central nervous system and adipose tissue BDNF/TrkB axes in metabolic regulation. *NPJ Aging Mech Dis*, 1, 15009. <https://doi.org/10.1038/npjamd.2015.9>
- Nakano I., Kinugawa S., Hori H., Fukushima A., Yokota T., Takada S., Kakutani N., Obata Y., Yamanashi K., Anzai T. (2020) Serum brain-derived neurotrophic factor levels are associated with skeletal muscle function but not with muscle mass in patients with heart failure. *Int Heart J*, 61 (1), 96–102. <https://doi.org/10.1536/ihj.19-400>
- Nascimben L., Ingwall J.S., Pauletto P., Friedrich J., Gwathmey J.K., Saks V., Pessina A.C., Allen P.D. (1996) Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation*, 94 (8), 1894–1901. <https://doi.org/10.1161/01.cir.94.8.1894>
- Ndrepepa G. (2021) Aspartate aminotransferase and cardiovascular disease – a narrative review. *J Lab Precis Med*, 6, 6. <https://doi.org/10.21037/jlpm-20-93>
- Ndrepepa G., Kastrati A. (2016) Gamma-glutamyl transferase and cardiovascular disease. *Ann Transl Med*, 4 (24), 481. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.12.27>
- Nystoriak M.A., Bhatnagar A. (2018) Cardiovascular Effects and Benefits of Exercise. *Front Cardiovasc Med*, 5, 135. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00135>
- Ogunmoyole T., Oladele F.C., Aderibigbe A., Johnson O.D. (2019) Hepatotoxicity of *Telfaria occidentalis* root extracts on wistar albino rat. *Heliyon*, 5 (5), e01617. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01617>
- Okada S., Yokoyama M., Toko H., Tateno K., Moriya J., Shimizu I., Nojima A., Ito T., Yoshida Y., Kobayashi Y., Katagiri H., Minamino T., Komuro I. (2012) Brain-derived neurotrophic factor protects against cardiac dysfunction after myocardial infarction via a central nervous system-mediated pathway. *ATVB*, 32 (8), 1902–1909. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.248930>
- Park T.-S., Yamashita H., Blanner W.S., Goldberg I.J. (2007) Lipids in the heart: a source of fuel and a source of toxins. *Curr Opin Lipidol*, 18 (3), 277–282. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32814a57db>
- Patel V., Upaganlawar A., Zalawadia R., Balaraman R. (2010) Cardioprotective effect of melatonin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats: a biochemical, electrocardiographic and histoarchitectural evaluation. *Eur J Pharmacol*, 644 (1–3), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.06.065>
- Pikula A., Beiser A.S., Chen T.C., Preis S.R., Vargias D., DeCarli C., Au R., Kelly-Hayes M., Kase C.S., Wolf P.A., Vasan R.S., Seshadri S. (2013) Serum brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor levels are associated with risk of stroke



- and vascular brain injury: Framingham Study. *Stroke*, 44 (10), 2768–2775. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.001447>
- Pius-Sadowska E., Machaliński B. (2017) BDNF – a key player in cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol*, 110, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.07.007>
- Pober J.S., Sessa W.C. (2007) Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*, 7, 803–815. <https://doi.org/10.1038/nri2171>
- Podyma B., Parekh K., Güler A.D., Deppmann C.D. (2021) Metabolic homeostasis via BDNF and its receptors. *Trends Endocrinol Metab*, 32 (7), 488–499. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.04.005>
- Prigent-Tessier A., Quirié A., Maguin-Gaté K., Szostak J., Mossiat C., Nappey M., Devaux S., Marie Ch., Demougeot C. (2013) Physical training and hypertension have opposite effects on endothelial brain-derived neurotrophic factor expression. *Cardiovasc Res*, 100 (3), 374–382. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt219>
- Rasmussen P., Brassard P., Adser H., Pedersen M.V., Leick L., Hart E., Secher N.H., Pedersen B.K., Pilegaard H. (2009) Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Exp Physiol*, 94 (10), 1062–1069. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.048512>
- Raval N., Kalyane D., Maheshwari R., Tekade R.K. (2019) Surface Modifications of Biomaterials and Their Implication on Biocompatibility. W: Tekade R.K. (ed.), *Biomaterials and Bionanotechnology*. London: Academic Press, 639–674. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814427-5.00017-2>
- Richner M., Ulrichsen M., Elmegaard S.L., Dieu R., Pallesen L.T., Vaegter C.B. (2014) Peripheral nerve injury modulates neurotrophin signaling in the peripheral and central nervous system. *Mol Neurobiol*, 50, 945–970. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8706-9>
- Sammeturi M., Shaik A.H., Bongu S.B.R., Cheemanapalli S., Mohammad A., Kodidhela L.D. (2019) Protective effects of syringic acid, resveratrol and their combination against isoprenaline administered cardiotoxicity in wistar rats. *Saudi J Biol Sci*, 26 (7), 1429–1435. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.09.027>
- Schinder A.F., Poo M. (2000) The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci*, 23 (12), 639–645. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)01672-6](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01672-6)
- Schirò G., Iacono S., Ragonese P., Aridon P., Salemi G., Balistreri C.R. (2022) A brief overview on BDNF-Trk pathway in the nervous system: a potential biomarker or possible target in treatment of multiple sclerosis?. *Front Neurol*, 13, 917527. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.917527>
- Shen Z., Geng Q., Huang H., Yao H., Du T., Chen L., Wu Z., Miao X., Shi P. (2019) Antioxidative and cardioprotective effects of Schisandra chinensis bee pollen extract on isoprenaline-induced myocardial infarction in rats. *Molecules*, 24 (6), 1090. <https://doi.org/10.3390/molecules24061090>
- Skrypnik D., Ratajczak M., Karolkiewicz J., Mądry E., Pupek-Musialik D., Hansdorfer-Korzon R., Walkowiak J., Jakubowski H., Bogdański P. (2016) Effects of endurance and endurance-strength exercise on biochemical parameters of liver function in women with abdominal obesity. *Biomed Pharmacother*, 80, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.02.017>
- Sookoian S., Pirola C.J. (2015) Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: from systems biology to the personalized medicine. *WJG*, 21 (3), 711. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i3.711>
- Steinbacher P., Eckl P. (2015) Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Bio-molecules*, 5 (2), 356–377. <https://doi.org/10.3390/biom5020356>

- Subczynski W.K., Pasenkiewicz-Gierula M. (2020) Hypothetical pathway for formation of cholesterol microcrystals initiating the atherosclerotic process. *Cell Biochem Biophys*, 78, 241–247. <https://doi.org/10.1007/s12013-020-00925-2>
- Sustar A., Perkovic M.N., Erjavec G.N., Strac D.S., Pivac N. (2019) Association between reduced brain-derived neurotrophic factor concentration & coronary heart disease. *Indian J Med Res*, 150 (1), 43–49. [https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\\_1566\\_17](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1566_17)
- Szuhany K.L., Bugatti M., Otto M.W. (2015) A meta-analytic review of the effects of exercise on brain-derived neurotrophic factor. *J Psychiatr Res*, 60, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.10.003>
- Tang S.W., Chu E., Hui T., Helme D., Law C. (2008) Influence of exercise on serum brain-derived neurotrophic factor concentrations in healthy human subjects. *Neurosci Lett*, 431 (1), 62–65. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.11.019>
- Tessarollo L., Yanpallewar S. (2022) TrkB truncated isoform receptors as transducers and determinants of BDNF functions. *Front Neurosci*, 16, 847572. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.847572>
- Todosenko N., Yurova K., Khaziakhmatova O., Vulf M., Bograya M., Ivanov P., Litvinova L. (2024) (Epi)genetic aspects of metabolic syndrome pathogenesis in relation to brain-derived neurotrophic factor expression: a review. *Gene Expr*, 23 (2), 127–138. <https://doi.org/10.14218/GE.2023.00202>
- Tsuchida A., Nakagawa T., Itakura Y., Ichihara J., Ogawa W., Kasuga M., Taiji M., Noguchi H. (2001) The effects of brain-derived neurotrophic factor on insulin signal transduction in the liver of diabetic mice. *Diabetologia*, 44, 555–566. <https://doi.org/10.1007/s001250051661>
- Tsuchida A., Nonomura T., Nakagawa T., Itakura Y., Ono-Kishino M., Yamanaka M., Sugaru E., Taiji M., Noguchi H. (2002) Brain-derived neurotrophic factor ameliorates lipid metabolism in diabetic mice. *Diabetes Obes Metab*, 4, 262–269. <https://doi.org/10.1046/j.1463-1326.2002.00206.x>
- Verboven M., Van Ryckeghem L., Belkhouribchia J., Dendale P., Eijnde B.O., Hansen D., Bito V. (2019) Effect of exercise intervention on cardiac function in type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *Sports Med*, 49, 255–268. <https://doi.org/10.1007/s40279-018-1003-4>
- Vermeulen N.P.E., Bessems J.G.M., Van De Straat R. (1992) Molecular aspects of paracetamol-induced hepatotoxicity and its mechanism-based prevention. *Drug Metab Rev*, 24 (3), 367–407. <https://doi.org/10.3109/03602539208996298>
- Vicario-Abejón C., Owens D., McKay R., Segal M. (2002) Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization. *Nat Rev Neurosci*, 3, 965–974. <https://doi.org/10.1038/nrn988>
- Wan R., Weigand L.A., Bateman R., Griffioen K., Mendelowitz D., Mattson M.P. (2014) Evidence that BDNF regulates heart rate by a mechanism involving increased brainstem parasympathetic neuron excitability. *J Neurochem*, 129 (4), 573–580. <https://doi.org/10.1111/jnc.12656>
- Wang C.S., Kavalali E.T., Monteggia L.M. (2022) BDNF signaling in context: from synaptic regulation to psychiatric disorders. *Cell*, 185 (1), 62–76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.003>
- Wang T., Maltez M.T., Lee H.W., Ahmad M., Wang H., Leenen F.H.H. (2019) Effect of exercise training on the FNDC5/BDNF pathway in spontaneously hypertensive rats. *Physiol Rep*, 7 (24). <https://doi.org/10.14814/phy2.14323>
- Washington I.M., Van Hoosier G. (2012) *Clinical Biochemistry and Hematology*. W: Suckow M.A., Stevens K.A., Wilson R.P. (eds.), The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and

- other rodents. New York: Academic Press, 57–116. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00003-1>
- Zervou S., Whittington H.J., Russell A.J., Lygate, C.A. (2015). Augmentation of creatine in the heart. *MRMC*, 16 (1), 19–28. <https://doi.org/10.2174/1389557515666150722102151>
- Zhou F., Sun X. (2021) Cholesterol metabolism: a double-edged sword in hepatocellular carcinoma. *Front Cell Dev Biol*, 9, 762828. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.762828>



## PRZEBIEG PRACY NAUKOWO-ZAWODOWEJ

### Praca opublikowana poza cyklem

Grzelak N., Krutki P., Bączyk M., Kaczmarek D., Mrówczyński W. (2023) Influence of altered serum and muscle concentrations of BDNF on electrophysiological properties of spinal motoneurons in wild-type and BDNF-knockout rats. *Sci Rep*, 13, 4571. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31703-8>.

punktacja: MEiN: 140; Impact Factor: 3,8

### Bibliometryczne podsumowanie osiągnięć

Indeks H: 2

Liczba cytowań: 8

Łączny Impact Factor: 9,8

Łącznie punktacja MEiN/MNiSW: 340

### Staże naukowe

30-dniowy staż z programu PROM organizowany przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej – Department of Pharmacology and Anaesthesia, Dalhousie University (Halifax, NS, Kanada)

30-dniowy staż z programu PROM organizowany przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej – Department of Experimental Biochemistry and Molecular Biology, IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi (Mediolan, Włochy)

### Udział w realizacji projektów badawczych

Wykonawca: projekt badawczy w ramach grantu OPUS finansowanego z Narodowego Centrum Nauki pt. *Adaptacja cech elektrofizjologicznych motoneuronów rdzenia kręgowego szczura do zmian stężeń czynników neurotroficznych w osoczu krwi i mięśniach szkieletowych*

Wykonawca: projekt badawczy finansowany z programu Uczelni „Rozwój Młodych Pracowników Nauki” pt. *Rola stężenia BDNF w wątrobie i mięśniu sercowym szczura w modulowaniu czynników ryzyka syndromu metabolicznego*

### Udział w konferencjach naukowych

XVI Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Badań Układu Nerwowego, 20–23.09.2023, Toruń. Aktywny udział w sesji posterowej, współautor plakatu pt. *Changes in electrophysiological properties of spinal motoneurons in response to altered levels of Bdnf in blood serum and hindlimb muscles. Studies on wild-type and Bdnf knockout rats*. Autorzy: N. Grzelak, P. Krutki, M. Bączyk, D. Kaczmarek, W. Mrówczyński.

## ZAŁĄCZNIK 1. OŚWIADCZENIA

Poznań, 24.01.2025  
miejscowość, data

Norbert Grzelak  
Imię i nazwisko kandydatki/kandydata

**Oświadczenie autorki/autora o oryginalności rozprawy doktorskiej,  
samodzielności jej przygotowania i nienaruszeniu praw autorskich**

Ja, niżej podpisana/podpisany oświadczam, że:

- a) rozprawa doktorska pt. „Znaczenie osi sygnalizacyjnej BDNF/Trk-B w regulacji stężeń i aktywności biomarkerów zespołu metabolicznego w wątrobie i sercu szczura” jest wynikiem mojej działalności twórczej i powstała bez niedozwolonego udziału osób trzecich;
- b) wszystkie wykorzystane przeze mnie materiały źródłowe i opracowania zostały w niej wymienione, a napisana przez mnie praca nie narusza praw autorskich osób trzecich;
- c) załączona wersja elektroniczna pracy jest tożsama z wydrukiem rozprawy;
- d) praca nie była wcześniej podstawą nadania stopnia innej osobie.

Mam świadomość, że złożenie nieprawdziwego oświadczenia skutkować będzie niedopuszczeniem do dalszych czynności postępowania w sprawie nadania stopnia doktora lub cofnięciem decyzji o nadaniu mi stopnia doktora oraz wszczęciem postępowania dyscyplinarnego/karnego.

  
.....  
podpis kandydatki/kandydata

Poznań, 24.01.2025  
miejscowość, data

**Norbert Grzelak**  
imię i nazwisko kandydatki/kandydata

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Pani/Panu **mgr Norbert Grzelak**  
stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej w  
Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

**Oświadczenie kandydatki/kandydata**

Oświadczam, że mój wkład w powstanie przedłożonej rozprawy doktorskiej pt. „Znaczenie osi  
sygnalizacyjnej BDNF/Trk-B w regulacji stężeń i aktywności biomarkerów zespołu metabolicznego w  
wątrobie i sercu szczura”

polegał na\*:

- **publikacja 1** - Grzelak N., Kaczmarek D., Mrówczyński W. Comparison of the effects of BDNF/TRKB signalling on metabolic biomarkers in the liver of sedentary and trained rats with normal and knockout BDNF genotypes. Frontiers in Physiology, 2023, doi: 10.3389/fphys.2023.1268648.

- zaplanowanie badań,
- udział w wykonywanych badaniach biochemicznych,
- udział w analizie uzyskanych wyników,
- opracowanie statystyczne wyników,
- przygotowanie rycin,
- udział w pisanu wersji oryginalnej pracy oraz odpowiedzi na recenzje.

- **publikacja 2** - Grzelak N., Kaczmarek D., Poziemba KM., Mrówczyński W. Myocardial Disorders in BDNF-Deficient Rats: Limited Recovery Post-Moderate Endurance Training. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity, 2024;17 4649–4660. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S486807>

- zaplanowanie badań,
- udział w wykonywanych badaniach biochemicznych,
- udział w analizie uzyskanych wyników,
- opracowanie statystyczne wyników,
- przygotowanie rycin,
- udział w pisanu wersji oryginalnej pracy oraz odpowiedzi na recenzje.

  
podpis kandydatki/kandydata

dr hab. prof. AWF Włodzimierz Mrówczyński

Poznań, 27.01.2025

Zakład Neurobiologii

Akademia Wychowania Fizycznego

im. E. Piaseckiego w Poznaniu

### Oświadczenie

wskazujące zadania, jakie pełnił promotor rozprawy doktorskiej mgr Norberta Grzelaka zatytułowanej:  
„Znaczenie osi sygnalizacyjnej BDNF/Trk-B w regulacji stężeń i aktywności biomarkerów zespołu metabolicznego w wątrobie i sercu szczura”

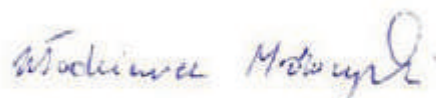
Jako osoba powołana na promotora pracy doktorskiej mgr Norberta Grzelaka:

1. od strony formalnej:

- udzielałem doktorantowi pomocy merytorycznej i metodycznej,
- pomagałem w przygotowaniu, modyfikowaniu i realizowaniu Indywidualnego Planu Badawczego,
- oceniałem stan zaawansowania pracy doktorskiej,
- opiniowałem wnioski dotyczące finansowania
- opiniowałem wnioski dotyczące wyjazdu na staż naukowy,
- opiniowałem wnioski dotyczące przedłużenia procesu kształcenia w Studium Doktoranckim.

2. od strony naukowej:

- organizowałem i planowałem badania,
- prowadziłem dyskusje i konsultacje naukowe,
- pomagałem w opracowaniu koncepcji i metodyki badawczej,
- współuczestniczyłem w interpretacji uzyskanych wyników badań,
- współuczestniczyłem w pisaniu oraz korekcie przygotowywanych manuskryptów,
- współuczestniczyłem w przygotowaniach odpowiedzi na recenzje,
- współuczestniczyłem w przygotowaniach ostatecznej wersji manuskryptów.



Włodzimierz Mrówczyński



Poznań, 24.01.2025  
miejscowość, data

Włodzimierz Mrówczyński  
imię i nazwisko współautorki/współautora

Akademia Wychowania Fizycznego w Poznaniu, Zakład Neurobiologii  
miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Pani/Panu **mgr Norbert Grzelak**  
stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej w  
Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Oświadczenie współautorki/współautora

Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt.

„Znaczenie osi sygnalizacyjnej BDNF/Trk-B w regulacji stężeń i aktywności biomarkerów zespołu  
metabolicznego w wątrobie i sercu szczura”

polegał na\*:

- **publikacja 1** - Grzelak N., Kaczmarek D., Mrówczyński W. Comparison of the effects of BDNF/TRKB signalling on metabolic biomarkers in the liver of sedentary and trained rats with normal and knockout BDNF genotypes. *Frontiers in Physiology*, 2023, doi: 10.3389/fphys.2023.1268648.

- stworzenie koncepcji i zaplanowanie badań,
- udział w wykonywanych badaniach oraz analizie uzyskanych wyników,
- udział w pisaniu wersji oryginalnej pracy oraz odpowiedzi na recenzje,
- pozyskiwanie funduszy na badania,
- administracja i nadzór na wykonywanym projektem badawczym.

- **publikacja 2** - Grzelak N., Kaczmarek D., Poziemba KM., Mrówczyński W. Myocardial Disorders in BDNF-Deficient Rats: Limited Recovery Post-Moderate Endurance Training. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 2024;17 4649–4660. <https://doi.org/10.2147/DMSO.5486807>

- stworzenie koncepcji i zaplanowanie badań,
- udział w wykonywanych badaniach oraz analizie uzyskanych wyników,
- udział w pisaniu wersji oryginalnej pracy oraz odpowiedzi na recenzje,
- pozyskiwanie funduszy na badania,
- administracja i nadzór na wykonywanym projektem badawczym.

  
.....  
podpis współautorki/współautora

\* należy podać bardzo precyzyjnie opisany wkład merytoryczny w powstanie poszczególnych publikacji, wchodzących w skład przedłożonej rozprawy doktorskiej

\*\* proszę dodać kolejne publikacje, jeśli rozprawa je obejmuje

Poznań, 24.01.2025  
miejscowość, data

**Dominik Kaczmarek**  
imię i nazwisko współautorki/współautora

**Akademia Wychowania Fizycznego w Poznaniu, Zakład Fizjologii i Biochemii**  
miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Pani/Panu **mgr Norbert Grzelak**  
stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej w  
Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

**Oświadczenie współautorki/współautora**

Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt.

**„Znaczenie osi sygnalizacyjnej BDNF/Trk-B w regulacji stężeń i aktywności biomarkerów zespołu  
metabolicznego w wątrobie i sercu szczura”**

polegał na\*:

- **publikacja 1** - Grzelak N., Kaczmarek D., Mrówczyński W. Comparison of the effects of BDNF/TRKB signalling on metabolic biomarkers in the liver of sedentary and trained rats with normal and knockout BDNF genotypes. Frontiers in Physiology, 2023, doi: 10.3389/fphys.2023.1268648.

- zaplanowanie badań biochemicznych,
- wykonywanie badań biochemicznych,
- udział w analizie wyników,
- udział w pisaniu wersji oryginalnej pracy oraz odpowiedzi na recenzje.

- **publikacja 2** - Grzelak N., Kaczmarek D., Poziemba KM., Mrówczyński W. Myocardial Disorders in BDNF-Deficient Rats: Limited Recovery Post-Moderate Endurance Training. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity, 2024:17 4649–4660. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S486807>

- zaplanowanie badań biochemicznych,
- wykonywanie badań biochemicznych,
- udział w analizie wyników,
- udział w pisaniu wersji oryginalnej pracy oraz odpowiedzi na recenzje.

  
podpis współautorki/współautora

\* należy podać bardzo precyzyjnie opisany wkład merytoryczny w powstanie poszczególnych publikacji, wchodzących w skład przedłożonej rozprawy doktorskiej

\*\* proszę dodać kolejne publikacje, jeśli rozprawa je obejmuje



Poznań, 24.01.2025  
miejscowość, data

Krystian Poziemba  
imię i nazwisko współautorki/współautora

Akademia Wychowania Fizycznego w Poznaniu,  
miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka) - student

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Pani/Panu mgr Norbert Grzelak  
stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej w  
Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Oświadczenie współautorki/współautora

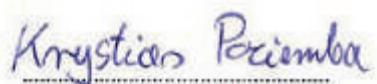
Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt.

„Znaczenie osi sygnalizacyjnej BDNF/Trk-B w regulacji stężeń i aktywności biomarkerów zespołu  
metabolicznego w wątrobie i sercu szczura”

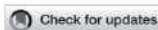
polegał na\*:

- publikacja 2 - Grzelak N., Kaczmarek D., Poziemba KM., Mrówczyński W. Myocardial Disorders in BDNF-Deficient Rats: Limited Recovery Post-Moderate Endurance Training. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity, 2024:17 4649–4660. <https://doi.org/10.2147/DMSO.5486807>

- udział w wykonywanych badaniach biochemicznych,
- udział w analizie części uzyskanych wyników.

  
podpis współautorki/współautora

- \* należy podać bardzo precyzyjnie opisany wkład merytoryczny w powstanie poszczególnych publikacji, wchodzących w skład przedłożonej rozprawy doktorskiej  
\*\* proszę dodać kolejne publikacje, jeśli rozprawa je obejmuje



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
Ganesh Kolumam,  
Calico Life Sciences LLC, United StatesREVIEWED BY  
Siresha Bathina,  
Baylor College of Medicine, United States  
Muaz Belviranlı,  
Selçuk University, Türkiye  
Hyo Youl Moon,  
Seoul National University, Republic of  
Korea\*CORRESPONDENCE  
Włodzimierz Mrówczyński,  
✉ mrowczyński@awf.poznan.plRECEIVED 28 July 2023  
ACCEPTED 04 December 2023  
PUBLISHED 13 December 2023CITATION  
Grzelak N, Kaczmarek D and  
Mrówczyński W (2023), Comparison of  
the effects of BDNF/TRKB signalling on  
metabolic biomarkers in the liver of  
sedentary and trained rats with normal  
and knockout BDNF genotypes.  
*Front. Physiol.* 14:1268648.  
doi: 10.3389/fphys.2023.1268648COPYRIGHT  
© 2023 Grzelak, Kaczmarek and  
Mrówczyński. This is an open-access  
article distributed under the terms of the  
Creative Commons Attribution License  
(CC BY). The use, distribution or  
reproduction in other forums is  
permitted, provided the original author(s)  
and the copyright owner(s) are credited  
and that the original publication in this  
journal is cited, in accordance with  
accepted academic practice. No use,  
distribution or reproduction is permitted  
which does not comply with these terms.

# Comparison of the effects of BDNF/TRKB signalling on metabolic biomarkers in the liver of sedentary and trained rats with normal and knockout BDNF genotypes

Norbert Grzelak<sup>1</sup>, Dominik Kaczmarek<sup>2</sup> and  
Włodzimierz Mrówczyński <sup>1\*</sup><sup>1</sup>Department of Neurobiology, Poznań University of Physical Education, Poznań, Poland, <sup>2</sup>Department of Physiology and Biochemistry, Poznań University of Physical Education, Poznań, Poland

**Introduction:** The effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on the modulation of metabolic processes in the liver is poorly understood. Therefore, the aim of this study was to investigate whether hepatic concentrations or activities of metabolic biomarkers depend on altered BDNF/TrkB content in the liver, resulting from different BDNF genotypes of rats. In addition, it was assessed whether 5-week moderate endurance training modifies the levels of BDNF/TrkB signaling and studied hepatic markers.

**Methods:** Experiments were performed on wild-type and heterozygous BDNF knockout (HET, SD-Bdnf) rats, which were divided into four groups: control with normal genotype (Bdnf+/+), control with BDNF knockout genotype (Bdnf+/-), trained with normal genotype (Bdnf+/+T) and trained with BDNF knockout genotype (Bdnf+/-T). BDNF/TrkB concentrations as well as selected metabolic biomarkers including lipids—total cholesterol (CHOL), low-density lipoprotein (LDL), triglycerides (TG); enzymes—alanine aminotransferase (ALAT), aspartate aminotransferase (ASAT), gamma-glutamyl transferase (GGT), lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP); hormones—insulin (INS) and leptin (LEPT) as well as interleukin-6 (IL-6) as regeneration indicator were measured directly in liver homogenates.

**Results and Discussion:** The study showed that Bdnf+/- rats exhibited reduced BDNF/TrkB signaling (BDNF,  $p < 0.0001$ ; TrkB,  $p = 0.0005$ ), altered lipid levels (CHOL,  $p < 0.0001$ ; LDL,  $p < 0.0001$ ; TG,  $p = 0.0006$ ) and reduced hepatic ALAT ( $p = 0.0004$ ) and GGT ( $p < 0.0001$ ) activity, which may contribute to hepatic steatosis and obesity, as well as indicate impairment of specific metabolic pathways in the liver. Interestingly, endurance training did not alter hepatic BDNF and TrkB content, but improved ALAT ( $p = 0.0366$ ) and ASAT ( $p = 0.0191$ ) activities and increased hepatic IL-6 ( $p = 0.0422$ ) levels in Bdnf+/- rats, suggesting enhanced liver regeneration in animals with BDNF allele loss.

## KEYWORDS

BDNF, knockout genotype, endurance training, liver, rats



## Introduction

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a protein involved in the modulation of numerous biological processes occurring in the central and peripheral nervous systems in mammals (Li et al., 2022). BDNF has been shown to have the ability to activate transmembrane tyrosine kinase B (Trk-B) receptors in neurons (Guo et al., 2014; Jin, 2020), which triggers various intracellular signaling pathways to alter specific neuronal functions (Yoshii and Constantine-Paton, 2010). However, BDNF and its high-affinity receptors have also been found in skeletal (Mousavi and Jasmin, 2006) and smooth muscles (Aravamudan et al., 2016), the endocrine system (Podyma et al., 2021), adipose tissue (Nakagomi et al., 2015) as well as some inner organs such as the heart (Pius-Sadowska and Machaliński, 2017), pancreas (Fulgenzi et al., 2020) and liver (Genzer et al., 2017), which plays a vital role in many biological processes, including metabolism (Han et al., 2016), detoxification (Grant, 1991), and the production of various hormones and proteins (Canbay et al., 2007).

In the liver, the sources of several neurotrophins and their receptors (including BDNF and Trk-B) are hepatic stellate cells (Cassiman et al., 2001) and hepatocytes (Genzer et al., 2017), which are the main cell types in this organ. The hepatic BDNF/Trk-B axis has been shown to play a key role in maintaining liver innervation and haematopoietic function (García-Suárez et al., 2006) and biliary remodelling during cholestasis (Vivacqua et al., 2014). In addition, it has been shown that hepatic BDNF levels can be useful for diagnosing liver function in patients with cirrhosis (Shu et al., 2019), and associated with liver fibrosis in alcohol use disorders (Girard et al., 2021). Studies in rodents and humans (Chaldakov et al., 2004; Motamedi et al., 2017) have shown that low levels of circulating BDNF are associated with metabolic dysfunctions such as obesity, metabolic syndrome and related disorders (e.g., diabetes, cardiovascular disease). Experiments on mice lacking the gene encoding BDNF (Lyons et al., 1999; Kermie et al., 2000) have shown that exogenous administration of BDNF can reverse the effects of metabolic syndrome. Furthermore, Genzer et al. (2017) showed that BDNF binding to specific receptors in rat liver hepatocytes activates catabolic pathways, such as fatty acid oxidation, in parallel with inhibition of gluconeogenesis and increased glycogen storage. All these reports indicate an important regulatory role for BDNF/TrkB axis in liver tissue (Hang et al., 2021).

It is well known that physical activity, especially of endurance nature, can modulate serum/plasma concentration of BDNF (Szuhany et al., 2015; Dinoff et al., 2016). The results of most human studies suggest considerable elevation of BDNF concentration in blood serum after acute endurance training lasting several weeks (Tang et al., 2008; Rasmussen et al., 2009; Arazi et al., 2021; Ribeiro et al., 2021). Moreover, Belviranlı and Okudan (2018) showed that voluntary wheel training in rats increased not only BDNF levels in plasma but also in liver tissue. In addition, another study in rats showed that the application of moderate to high-intensity training leads to both increased plasma BDNF levels and insulin tolerance, which are suppressed by daily intraperitoneal administration of the Trk-B blocker (Jiménez-Maldonado et al., 2014).

Hence, existing evidence suggests that there may be a strong association between BDNF/Trk-B axis and metabolic products in

the liver and physical activity. The purpose of this study was to investigate the potential link between changes in the hepatic BDNF/TrkB axis induced by different BDNF genotype (normal vs. knockout rats) and endurance training (trained vs. untrained rats) and the activity and concentration of metabolic biomarkers in the liver. Knockout rats were selected due to their reduced serum BDNF levels ranging from 20% (Grzelak et al., 2023) to 73% (Harris et al., 2016), while 5-week endurance training was used to increase BDNF levels in the rat liver.

For this reason, two types of rats were used in this study: wild-type and BDNF heterozygous knockout (HET, SD-Bdnf), some of which were subjected to an endurance training procedure. The following four groups of rats were studied in the experiments conducted: 1) with typical hepatic BDNF levels [control with a normal genotype, *Bdnf*<sup>+/+</sup>], 2) with altered hepatic BDNF levels [control with BDNF knockout genotype (HET, SD-BDNF, *Bdnf*<sup>+/-</sup>)], and (3, 4) trained with normal (*Bdnf*<sup>+/+</sup>T) and knockout genotype (*Bdnf*<sup>+/-</sup>T) that underwent 5-week endurance training procedure.

In liver homogenates of these rats levels of BDNF, Trk-B as well as concentration/activity of some lipids: total cholesterol (CHOL), low-density lipoprotein (LDL) and triglycerides (TG), enzymes: lactate dehydrogenase (LDH), alanine aminotransferase (ALAT), aspartate aminotransferase (ASAT), gamma-glutamyl transferase (GGT) and alkaline phosphatase (ALP) and hormones: insulin (INS) and leptin (LEPT) were measured. In addition, levels of hepatic interleukin-6 (IL-6) which is an essential factor indicating liver homeostasis, regeneration, infection defence and fine tuning of metabolic functions (Schmidt-Arras and Rose-John, 2016) were also measured in all four studied groups of animals.

Relationships between hepatic amounts of both BDNF/Trk-B and the aforementioned specific metabolic factors were determined separately for each group and then compared among all studied populations. We hypothesised that this approach would allow us to demonstrate how genotype and physical activity affect the association between BDNF/Trk-B axis and metabolic factors in the rat liver.

## Materials and methods

### Animals

Experiments were carried out in 41 Sprague-Dawley male rats aged 4–5 months, obtained from a breeding colony at SAGE Labs (St. Louis, MO, United States). 21 animals were wild-type and had the typical BDNF genotype (*Bdnf*-wild type), while the remaining 20 animals were heterozygotes, in which *Bdnf* was knocked out using targeted zinc finger nuclease technology (*Bdnf*-knockout, SD-BDNF). The respective liver biomarkers were measured separately in rats from four different randomly selected groups: control normal genotype rats (*Bdnf*<sup>+/+</sup>, *n* = 11, average weight before experiment—524 g), control knockout genotype rats (*Bdnf*<sup>+/-</sup>, *n* = 11, average weight before experiment—681 g), trained normal genotype rats (*Bdnf*<sup>+/+</sup>T, *n* = 10, average weight before experiment—484 g) and trained knockout rats (*Bdnf*<sup>+/-</sup>T, *n* = 9, average weight before experiment—588 g). All animals were kept in standard laboratory cages (2 rats of the same genotype per cage) with *ad libitum* access to food and water. The room in which the animals were housed had controlled environmental



conditions (a reverse 12 h:12 h light/dark cycle,  $55\% \pm 1\%$  humidity, and  $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ). The animals were euthanized with an overdose of sodium pentobarbital ( $180\text{ mg kg}^{-1}$ ) prior to liver collection. The experiments were conducted in accordance with the Polish Animal Protection Act, European Union regulations and ARRIVE guidelines. The experimental procedures were approved by the Local Ethics Committee for Animal Research in Poznań (approval number 58/2018).

## Endurance training protocol

In order to examine the effect of endurance training on BDNF/TrkB signaling and metabolic biomarkers in the liver, moderate intensity training on an electric treadmill for small rodents (Exer-6M, Columbus Instruments) was used in groups of *Bdnf*<sup>+/+</sup>T and *Bdnf*<sup>-/-</sup>T rats. The training regimen consisted of 1 week of adaptation and 5 weeks of core training (45 min per day, 5 days per week of continuous running with gradually increasing speed up to 25 m/min at the last week of the training session (Grzelak et al., 2023).

## Liver collection and homogenization

After anaesthesia, livers of experimental animals were collected, weighed and then placed in cryogenic vials (Yancheng Huida Medical Instruments, China), which were frozen by immersion in liquid nitrogen at  $-80^\circ\text{C}$  and stored for further measurements. Small distal portions of each lobe of the collected livers were cut off for homogenization. The obtained tissue sections were weighed, and depending on their weight, an appropriate amount (at a ratio of 1:9) of Phosphate Buffered Saline (PBS) with Halt Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free (100X) (Thermo Fischer Scientific, United States) was added. Tissue samples were homogenised with the prepared buffer using a dispersion homogenizer (VWR VDI 12, Singapore) in four cycles (each 30 s, with 1 min cooling in ice between cycles) to 30,000 revolutions per minute (rpm). The homogenate was centrifuged at 5,000 rpm by 5 min and the obtained supernatant was kept at  $-80^\circ\text{C}$ .

## Enzyme-linked immunosorbent assay

Levels of BDNF (sensitivity test:  $0.035\text{ ng mL}^{-1}$ , cat. number: SRB-T-81493), TrkB (sensitivity test:  $12.337\text{ pg/mL}$ ; cat. number: 201-11-0426), LEPT (sensitivity test:  $7.054\text{ pg/mL}$ ; cat. number: 201-11-0456), IL-6 (sensitivity test:  $1.822\text{ pg/mL}$ ; cat. number: 201-11-0136) and activity of INS (sensitivity test:  $0.102\text{ mIU/L}$ ; cat. number: 201-11-0708) were determined in liver by commercial ELISA kits according to descriptions of product (Sunredbio, China). A multi-mode microplate reader (Synergy 2 SIAFRT, BioTek, United States) was used for read of absorbance at 450 nm.

## Biochemistry analyses

Levels of LDL (sensitivity test:  $3.9\text{ mg/dL}$ ; cat. number: 7-280 [Cormay, Poland]), CHOL (sensitivity test:  $1.95\text{ mg/dL}$ ; cat. number: 7-204 [Cormay, Poland]), TG (sensitivity test:

$1.4\text{ mg/dL}$ ; cat. number 7-253 [Cormay, Poland]), activities of ALAT (sensitivity test:  $8\text{ U/L}$ ; cat. number 7-216 [Cormay, Poland]), ASAT (sensitivity test:  $7\text{ U/L}$ ; cat. number 7-214 [Cormay, Poland]), LDH (sensitivity test:  $6.6\text{ U/L}$ ; cat. number. 7-239 [Cormay, Poland]), GGT (sensitivity test:  $8\text{ U/L}$ ; cat. number 7-224, [Cormay, Poland]), and ALP (sensitivity test:  $7.8\text{ U/L}$ ; cat. number 7-212 [Cormay, Poland]) were measured with clinical chemistry analyzer (Accent 220S, Cormay, Poland).

## Statistical analysis

Statistical analyses were carried out with Statistica 13 software (Statsoft, Poland, Cracow). Data were presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) for all obtained results. Two-way analysis of variance (ANOVA) was used in order to perform inter-group comparison of molecules concentrations as well as enzymes and hormone activities. Tukey's HSD *post hoc* test was employed for determination of statistical significance between compared groups when the interaction between effects was statistically significant.

## Results

### Liver and body weights

The study showed that the average liver weight of knockout rats was 19% greater than rats with the normal genotype. However, the applied endurance training on treadmill led to a loss of liver weight only in normal genotype rats (by an average of 12%) and did not cause a reduction in the weight of this organ in the group with BDNF knockout genotype. Moreover, our previous study, performed on the same groups of animals (Grzelak et al., 2023), showed that knockout rats had a higher body mass than the normal genotype rats and also indicated that moderate-intensity running training caused weight loss in both trained normal (*Bdnf*<sup>+/+</sup>T) and knockout (*Bdnf*<sup>-/-</sup>T) rats. A detailed comparison of both body weight and liver weight in the four groups of rats tested (*Bdnf*<sup>+/+</sup>, *Bdnf*<sup>-/-</sup>, *Bdnf*<sup>+/+</sup>T, *Bdnf*<sup>-/-</sup>T) is shown in Figure 1.

### Genotype and training effects

**BDNF and TrkB** There was a statistically significant reduction in liver levels of both BDNF and TrkB in rats from the knockout population (*Bdnf*<sup>-/-</sup> and *Bdnf*<sup>-/-</sup>T) when compared to rats from normal genotype populations (*Bdnf*<sup>+/+</sup> and *Bdnf*<sup>+/+</sup>T) (Figures 2A, B; Table 1). Significantly lower level of TrkB was found in *Bdnf*<sup>-/-</sup> group of rats in relation to either *Bdnf*<sup>+/+</sup> or *Bdnf*<sup>+/+</sup>T groups of rats (Figure 2B; Table 1). However, no changes in hepatic BDNF and TrkB were found when populations of control (*Bdnf*<sup>+/+</sup> and *Bdnf*<sup>-/-</sup>) and trained (*Bdnf*<sup>+/+</sup>T and *Bdnf*<sup>-/-</sup>T) rats were compared (Figures 2A,B; Table 1).

**Lipids** CHOL and LDL levels were significantly lower, (but significantly higher for TG) in the population of knockout rats (*Bdnf*<sup>-/-</sup> and *Bdnf*<sup>-/-</sup>T) compared to the population of rats with typical genotype (*Bdnf*<sup>+/+</sup> and *Bdnf*<sup>+/+</sup>T) (Figure 3; Table 1). Endurance training did not change the liver contents of CHOL,

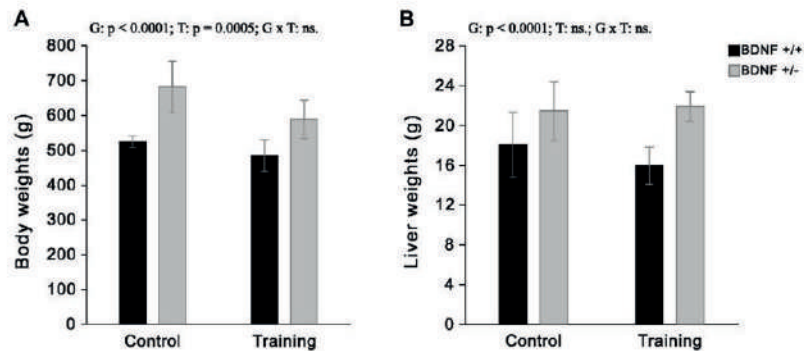


FIGURE 1

The mean values ( $\pm$ SD) of body weights (A) and liver weights (B) of rats from control (left side) and trained (right side) groups. *Bdnf*<sup>+/+</sup> rats are indicated by black, while *Bdnf*<sup>+/-</sup> rats are indicated by grey. Comparisons between groups were made by two-way ANOVA. (G) genotype (*Bdnf*<sup>+/+</sup> genotype vs. *Bdnf*<sup>+/-</sup> genotype); T—training (control vs. training); G  $\times$  T—the interaction between genotype and training. For significant interactions Tukey's post hoc test was performed. Significant results are denoted by p, while non-significant results are denoted by ns. Effects for body weights: Genotype— $F = 56.84$ ,  $p < 0.0001$ ,  $\eta^2 = 0.63$ ; Training— $F = 14.76$ ,  $p = 0.0005$ ,  $\eta^2 = 0.31$ ; Genotype  $\times$  Training— $F = 2.35$ ,  $p = 0.1351$ ,  $\eta^2 = 0.07$ . Effects for liver weights: Genotype— $F = 29.30$ ,  $p < 0.0001$ ,  $\eta^2 = 0.47$ ; Training— $F = 0.92$ ,  $p = 0.0005$ ,  $\eta^2 = 0.03$ ; Genotype  $\times$  Training— $F = 2.18$ ,  $p = 0.1494$ ,  $\eta^2 = 0.06$ .

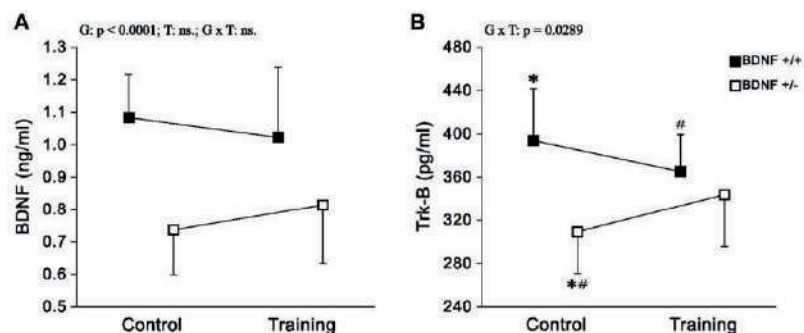


FIGURE 2

The mean values ( $\pm$ SD) of BDNF (A) and TrkB (B) concentrations in the liver of rats from control (left side) and trained (right side) groups. Control and trained *Bdnf*<sup>+/+</sup> groups are indicated by black square, while control and trained *Bdnf*<sup>+/-</sup> groups are indicated by white square. Comparisons between groups were made by two-way ANOVA. (G) genotype (*Bdnf*<sup>+/+</sup> genotype vs. *Bdnf*<sup>+/-</sup> genotype); T—training (control vs. training); G  $\times$  T, the interaction between genotype and training. For significant interactions Tukey's post hoc test was performed. Post-hoc results: \* = significant difference between control rats with *Bdnf*<sup>+/+</sup> genotype and control rats with *Bdnf*<sup>+/-</sup> genotype ( $p = 0.0006$ ); # = significant difference between trained rats with *Bdnf*<sup>+/+</sup> genotype and trained rats with *Bdnf*<sup>+/-</sup> genotype ( $p = 0.0351$ ). Detailed results of performed tests are given in Table 1.

LDL and TG. Their concentrations were similar in control (*Bdnf*<sup>+/+</sup> and *Bdnf*<sup>+/-</sup>) and trained (*Bdnf*<sup>+/+</sup>T and *Bdnf*<sup>+/-</sup>T) populations (Figure 3; Table 1). However, there was a clear downward trend in TG concentration in trained rats (*Bdnf*<sup>+/+</sup>T and *Bdnf*<sup>+/-</sup>T).

**Enzymes** Significantly lower activities of ALAT and GGT were observed in the population of knockout rats (*Bdnf*<sup>+/-</sup> and *Bdnf*<sup>+/-</sup>T) compared to the corresponding population of normal genotype rats (*Bdnf*<sup>+/+</sup> and *Bdnf*<sup>+/+</sup>T) (Figures 4A,D; Table 1). However, ALAT activity was lower in the control group of knockout rats compared to the other groups (Figures 4B,C,E; Table 1). In contrast, there was no statistically significant difference in hepatic ASAT, LDH, and ALP activities between normal genotype rats (*Bdnf*<sup>+/+</sup>

and *Bdnf*<sup>+/+</sup>T) and knockout genotype rats (*Bdnf*<sup>+/-</sup> and *Bdnf*<sup>+/-</sup>T). There were no differences in hepatic ALP and GGT activities between the control (*Bdnf*<sup>+/+</sup> and *Bdnf*<sup>+/-</sup>) and trained (*Bdnf*<sup>+/+</sup>T and *Bdnf*<sup>+/-</sup>T) populations of rats (Figures 4A,C,D; Table 1). On the other hand, there was increase in both ALAT (not significant) and ASAT activities (Figure 2B; Table 1) as well a statistically significant decrease in LDH activity (Figure 4E; Table 1) in the liver of trained (*Bdnf*<sup>+/+</sup>T and *Bdnf*<sup>+/-</sup>T) in compare to control rat population (*Bdnf*<sup>+/+</sup> and *Bdnf*<sup>+/-</sup>). However, this post-training elevation of ALAT and ASAT activities resulted from an increase of these enzymes activities the only in trained group of rats with BDNF knockout genotype (Figures 4A,B; Table 1).



TABLE 1 Results of significance (p), effect size ( $\eta^2$ ) and test power (F) for particular effects and interactions regarding studied biomarkers such as: BDNF and Trk-B (Figures 2A,B), lipids—CHOL, LDL and TG (Figures 3A–C), enzymes—ALAT, ASAT, ALP, GGT, LDH (Figures 4A–E), hormones—INS, LEP (Figures 5A,B) and IL-6 (Figure 6A). Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed. Genotype (*Bdnf*+/- genotype vs. *Bdnf*-/- genotype); Training (control group vs. trained group); Genotype/Training (the interaction between genotype and training).

| Studied biomarkers         |            | Genotype | Training | Genotype/Training |
|----------------------------|------------|----------|----------|-------------------|
| <b>BDNF/TrkB signaling</b> |            |          |          |                   |
| BDNF                       | $F_{1,37}$ | 27.45    | 0.03     | 1.68              |
|                            | p          | <0.0001  | 0.8737   | 0.2027            |
|                            | $\eta^2$   | 0.43     | 0        | 0.04              |
| Trk-B                      | $F_{1,34}$ | 14.59    | 0.05     | 5.21              |
|                            | p          | 0.0005   | 0.829    | 0.0289            |
|                            | $\eta^2$   | 0.3      | 0        | 0.13              |
| <b>Lipids</b>              |            |          |          |                   |
| CHOL                       | $F_{1,34}$ | 27.4     | 0        | 0.17              |
|                            | p          | <0.0001  | 0.9593   | 0.6793            |
|                            | $\eta^2$   | 0.45     | 0        | 0.01              |
| LDL                        | $F_{1,37}$ | 35.11    | 3.18     | 1.3               |
|                            | p          | <0.0001  | 0.0826   | 0.2611            |
|                            | $\eta^2$   | 0.49     | 0.08     | 0.03              |
| TG                         | $F_{1,33}$ | 14.56    | 3.85     | 0.32              |
|                            | p          | 0.0006   | 0.0582   | 0.5772            |
|                            | $\eta^2$   | 0.31     | 0.1      | 0.01              |
| <b>Enzymes</b>             |            |          |          |                   |
| LDH                        | $F_{1,34}$ | 0.01     | 60.1     | 1.43              |
|                            | p          | 0.9149   | <0.0001  | 0.2397            |
|                            | $\eta^2$   | 0        | 0.64     | 0.04              |
| ALAT                       | $F_{1,32}$ | 15.44    | 3.13     | 5.26              |
|                            | p          | 0.0004   | 0.0862   | 0.0285            |
|                            | $\eta^2$   | 0.33     | 0.09     | 0.14              |
| ASAT                       | $F_{1,33}$ | 1.26     | 9.74     | 2.40              |
|                            | p          | 0.2700   | 0.0037   | 0.1307            |
|                            | $\eta^2$   | 0.04     | 0.23     | 0.07              |
| GGT                        | $F_{1,36}$ | 59.88    | 3.43     | 0                 |
|                            | p          | <0.0001  | 0.0724   | 0.9718            |
|                            | $\eta^2$   | 0.62     | 0.09     | 0                 |
| ALP                        | $F_{1,33}$ | 0        | 1.56     | 0.14              |
|                            | p          | 0.981    | 0.2211   | 0.7152            |
|                            | $\eta^2$   | 0        | 0.05     | 0                 |
| <b>Hormones</b>            |            |          |          |                   |
| INS                        | $F_{1,34}$ | 0.48     | 25.16    | 1.2               |
|                            | p          | 0.4936   | <0.0001  | 0.2819            |
|                            | $\eta^2$   | 0.01     | 0.43     | 0.03              |

(Continued on following page)

**TABLE 1 (Continued)** Results of significance (p), effect size ( $\eta^2$ ) and test power (F) for particular effects and interactions regarding studied biomarkers such as: BDNF and Trk-B (Figures 2A,B), lipids—CHOL, LDL and TG (Figures 3A–C), enzymes—ALAT, ASAT, ALP, GGT, LDH (Figures 4A–E), hormones—INS, LEP (Figures 5A,B) and IL-6 (Figure 6A). Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed. Genotype (*Bdnf*<sup>+/+</sup> genotype vs. *Bdnf*<sup>+/−</sup> genotype); Training (control group vs. trained group); Genotype/Training (the interaction between genotype and training).

| Studied biomarkers |            | Genotype | Training | Genotype/Training |
|--------------------|------------|----------|----------|-------------------|
| LEPT               | $F_{1,38}$ | 0.69     | 21.22    | 2.98              |
|                    | p          | 0.4131   | <0.0001  | 0.0938            |
|                    | $\eta^2$   | 0.02     | 0.39     | 0.08              |
| <b>Interleukin</b> |            |          |          |                   |
| IL-6               | $F_{1,36}$ | 5.48     | 3.24     | 4.98              |
|                    | p          | 0.0249   | 0.0801   | 0.032             |
|                    | $\eta^2$   | 0.13     | 0.08     | 0.12              |

**Hormones** The concentrations and activities of INS and LEPT in the liver did not differ when the population of typical genotype rats (*Bdnf*<sup>+/+</sup> and *Bdnf*<sup>+/+</sup>T) was compared with the corresponding population of knockout genotype rats *Bdnf*<sup>+/−</sup> *Bdnf*<sup>+/−</sup>T) (Figure 5; Table 1). Liver concentrations of INS and LEPT were significantly higher in the population of trained rats (*Bdnf*<sup>+/+</sup>T and *Bdnf*<sup>+/−</sup>T) compared to the corresponding population of control rats (*Bdnf*<sup>+/+</sup> and *Bdnf*<sup>+/−</sup>) (Figure 5; Table 1).

**IL-6** The concentration of IL-6 in the liver of rats from the knockout population (*Bdnf*<sup>+/−</sup> and *Bdnf*<sup>+/−</sup>T) was demonstrated to be statistically higher than that of rats from the normal genotype population (*Bdnf*<sup>+/+</sup> and *Bdnf*<sup>+/+</sup>T) (Figure 6; Table 1). However, this difference in IL-6 levels shown between rat populations with different genotypes was caused by a significant increase in IL-6 concentration in the group of trained animals with BDNF gene knockout (see Figure 6 and Table 1). Comparing IL-6 levels in the liver between the control (*Bdnf*<sup>+/+</sup> and *Bdnf*<sup>+/−</sup>) and trained (*Bdnf*<sup>+/+</sup>T and *Bdnf*<sup>+/−</sup>T) populations, no significant difference in IL-6 levels was observed. However, the *Bdnf*<sup>+/−</sup>T group showed a significant increase in IL-6 levels compared to the other groups (Figure 6; Table 1).

## Discussion

In the current study, there was an increase in body and liver weight, as well as a decrease in liver BDNF and Trk-B concentrations in BDNF knockout rats (*Bdnf*<sup>+/−</sup> and *Bdnf*<sup>+/−</sup>T) compared to normal genotype rats (*Bdnf*<sup>+/+</sup> and *Bdnf*<sup>+/+</sup>T) (Figures 1A,B; Table 1). Moreover, our previous research (Grzelak et al., 2023) demonstrated that BDNF knockout rats had significantly lower serum BDNF levels than rats with normal genotype. Taken together, these results showed that rats with hemizygous deletion of the BDNF gene exhibited reduced serum BDNF levels and impaired hepatic BDNF/TrkB signaling in the liver. These both findings provide evidence to support the use of these rats as a genetic model to study metabolic syndrome. Moreover, this seems to be consistent with the report by Belviranlı and Okudan (2018), which suggests a strong connection between BDNF levels in the liver and circulating blood.

Additionally, our study indicated that reduced BDNF and Trk-B signaling in the liver, resulting from the absence of one BDNF allele,

has a particularly important impact on lipids metabolism in hepatocytes. Differences in lipid concentrations, including CHOL, LDL and TG, were evident when comparing the knockout with normal genotype rat populations. In particular, hepatic CHOL and LDL levels were significantly reduced in BDNF knockout rats (*Bdnf*<sup>+/−</sup> and *Bdnf*<sup>+/−</sup>T) compared to those with normal genotypes (*Bdnf*<sup>+/+</sup> and *Bdnf*<sup>+/+</sup>T). CHOL is synthesised directly by hepatocytes in the liver (Zhou and Sun, 2021), while LDL is formed in the liver from particles of very low-density lipoproteins (Feingold, 2022). LDL plays a key role in transporting cholesterol from the liver to peripheral cells, according to previous research (Eckardstein, 2020). Moreover, several studies have demonstrated an inverse relationship between the concentration of CHOL (Abdel-Gayoum and Ahmida, 2017) and LDL (Ogunmoyole et al., 2019) in the liver and their corresponding levels in serum. Thus, our results suggest that CHOL accumulation and storage in the liver may be impaired in rats with hemizygous BDNF deletion. This also indicates that knockout rats may be subject to CHOL accumulation in the arteries, which may lead to the formation of atherosclerotic plaques—a major contributor to atherosclerosis (Subczynski and Pasenkiewicz-Gierula, 2020). It is therefore reasonable that knockout rats may have an increased risk of developing cardiovascular. Such a suggestion is in line with previous human studies that have linked reduced serum or plasma BDNF levels to a higher incidence of various cardiovascular diseases (Chalakov et al., 2004; Sustar et al., 2019).

We also found that liver TGs levels were significantly higher in knockout rats compared to normal genotype rats. TGs are obtained from dietary sources as well as synthesised in the liver as part of the process of lipid metabolism, where they are stored in hepatocytes (Alves-Bezerra and Cohen, 2017). Elevated levels of TGs in the liver caused by increase food intake, as observed in knockout rats, can lead to increase liver weight and eventually induce fatty liver (Garnol et al., 2016). This may explain the considerable increase in liver weight observed in knockout rats. Furthermore, it can be supposed that elevated hepatic TGs levels may be responsible for increased body weight in these rats, as excess TGs are stored in adipose tissue, leading to obesity (Ahmadian et al., 2009). Based on all the aforementioned observations, it can be strongly inferred that the significant reduction in BDNF/Trk-B signaling in the liver, observed in genetically modified rats, plays a key role in inducing substantial



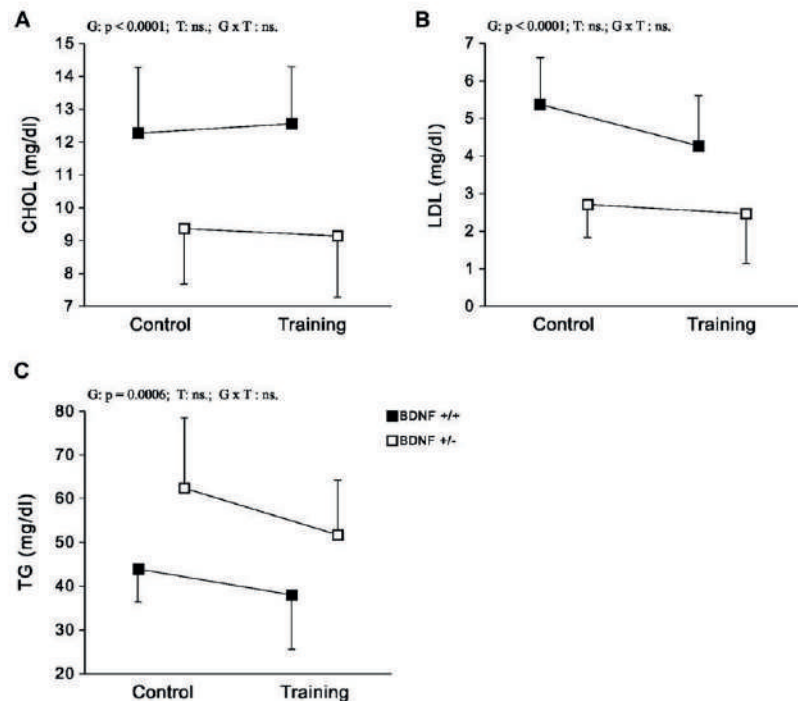


FIGURE 3

The mean values ( $\pm$ SD) of CHOL (A), LDL (B) and TG (C) concentrations in the liver of rats from control (left side) and trained (right side) groups. Control and trained *Bdnf* $+/+$  groups are indicated by black square, while control and trained *Bdnf* $+/-$  groups are indicated by white square. Comparisons between groups were made by two-way ANOVA. (G) genotype (*Bdnf* $+/+$  genotype vs. *Bdnf* $+/-$  genotype); T—training (control vs. training); G x T, the interaction between genotype and training. Significant results are denoted by p, while non-significant results are denoted by ns. Detailed results of performed tests are given in Table 1.

changes in hepatic lipid metabolism. This finding is also supported by the study conducted by Tsuchida et al. (2002), which demonstrated that subcutaneous administration of BDNF could lead to significant reductions in liver weight, TG concentrations, and the development of fatty liver in obese diabetic mice. Therefore, it can be concluded that a decrease in BDNF/Trk-B signaling in the liver is a crucial factor that contributes to the onset of metabolic syndrome symptoms.

The moderate-intensity endurance training applied in our research did not alter either the BDNF and Trk-B content (Figure 1 A and B; Table 1) or the CHOL and LDL concentrations in the liver of the studied rats. Long-term aerobic exercise, particularly at high intensity, is recommended as an effective therapy for improving lipid profiles (Mann et al., 2014) or to counteract metabolic syndrome (Mrówczyński, 2019). However, 5-weeks endurance training of graduate increasing intensity, utilized in the present study, did not result in elevated levels of BDNF and Trk-B in the liver, suggesting that it may have been insufficient to induce significant improvement in the lipid profile. It is important to emphasize that our previous research has shown that training at such intensity can lead to an increase in both BDNF and Trk-B levels in some fast hindlimb muscles (Grzelak

et al., 2023). However, there is no a significant effect on circulating levels of BDNF what seems to be in line with results of Gaitan et al. (2021) who found no increase of BDNF level in the blood of adult humans even after 26 weeks of aerobic exercise. However, it cannot be ruled out that the implementation of high-intensity or prolonged endurance activity may evoke increase in BDNF levels in both the serum and the liver which could improve of the lipid profile. It has been reported that high-intensity interval training has a particularly desirable effect on lipid metabolism by reducing their concentrations in the blood, including levels of CHOL, TGs and others (Cao et al., 2022).

Knockout rats (*Bdnf* $-/-$  and *Bdnf* $+/-$ T) showed a decrease in liver metabolic enzyme activities, specifically ALAT and GGT compared to rats with a normal genotype (*Bdnf* $+/+$  and *Bdnf* $+/-$ T). ALAT is a specific liver enzyme crucial for amino acid metabolism (Glinghammar et al., 2009) while GGT is a key enzyme in the metabolism of glutathione (Hanigan et al., 2015). Higher activities of these enzymes in the liver indicate more efficient enzyme function, as their levels in the liver are inversely proportional to those in the blood. However, liver disorders can cause the release of these enzymes from hepatocyte cytoplasm into the blood, where they serve as indicators of impaired metabolic function in liver disorders (Vermeulen et al., 1992; Deoras et al., 1997;

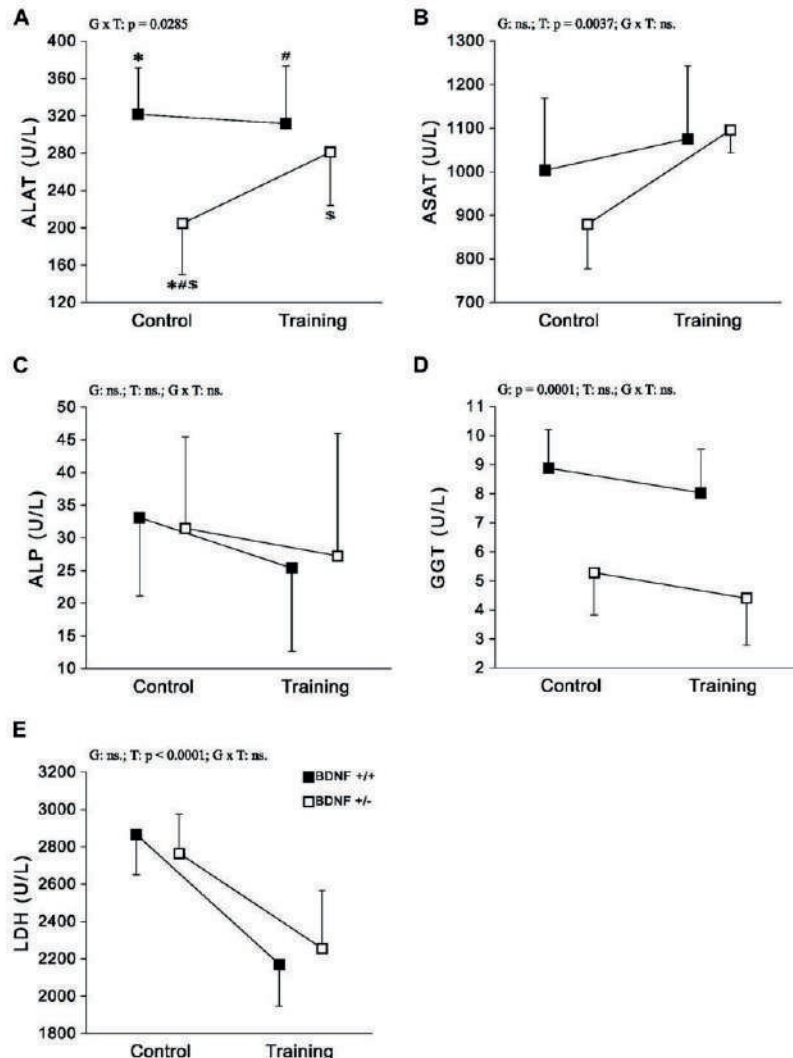


FIGURE 4

The mean values ( $\pm$ SD) of ALAT (A), ASAT (B), ALP (C), GGT (D) and LDH (E) activities in the liver of rats from control (left side) and trained (right side) groups. Control and trained *Bdnf* $+/+$  groups are indicated by black square, while control and trained *Bdnf* $+/-$  groups are indicated by white square. Comparisons between groups were made by two-way ANOVA. (G) genotype (*Bdnf* $+/+$  genotype vs. *Bdnf* $+/-$  genotype); T—training (control vs. training); G x T, the interaction between genotype and training. Significant results are denoted by p, while non-significant results are denoted by ns. For significant interactions Tukey's post hoc test was performed. Post-hoc results: \* = significant difference between control rats with *Bdnf* $+/+$  genotype and control rats with *Bdnf* $+/-$  genotype ( $p = 0.0003$ ); # = significant difference between trained rats with *Bdnf* $+/+$  genotype and control rats with *Bdnf* $+/-$  genotype ( $p = 0.0014$ ); \$ = significant difference between trained rats with *Bdnf* $+/-$  genotype and control rats with *Bdnf* $+/+$  ( $p = 0.0366$ ). Detailed results of performed tests are given in Table 1.

Ogunmoyole et al., 2019). ALAT and GGT levels are routinely measured in serum or plasma to investigate liver disease (Green and Flamm, 2002; Carobene et al., 2013) due to these both markers are particularly relevant in the context of pathogenesis of various liver diseases related to fat accumulation in liver such as obesity, metabolic syndrome and the cardiovascular disease (Sookoian and Pirola, 2015).

For example, elevated levels of these markers have been observed in children as a consequence of liver damage associated with overweight and obesity (Johansen et al., 2020). Therefore, it is reasonable to speculate that knockout rats would exhibit increased activities of ALAT and GGT in circulation, indicating disruptions in metabolic processes within the liver.



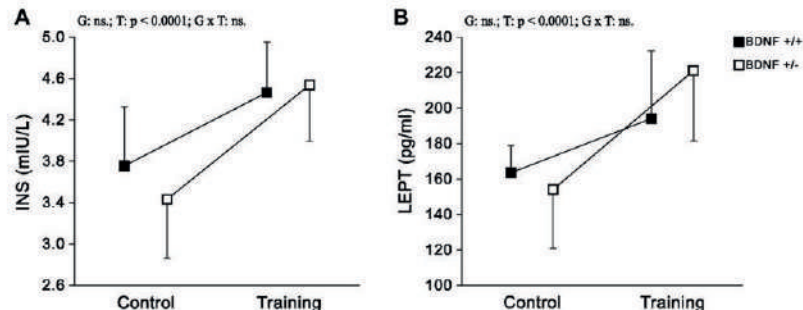


FIGURE 5

The mean values ( $\pm$ SD) of INS (A) and LEPT (B) concentrations in the liver of rats from control (left side) and trained (right side) groups. Control and trained *Bdnf*<sup>+/+</sup> groups are indicated by black square, while control and trained *Bdnf*<sup>+/-</sup> groups are indicated by white square. Comparisons between groups were made by two-way ANOVA. (G) genotype (*Bdnf*<sup>+/+</sup> genotype vs. *Bdnf*<sup>+/-</sup> genotype); T - training (control vs. training); G x T, the interaction between genotype and training. Significant results are denoted by p, while non-significant results are denoted by ns. Detailed results of performed tests are given in Table 1.

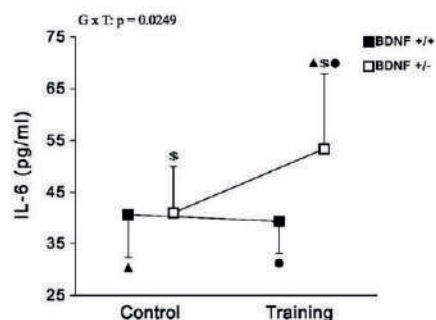


FIGURE 6

The mean values ( $\pm$ SD) of IL-6 (A) concentration in the liver of rats from control (left side) and trained (right side) groups. Control and trained *Bdnf*<sup>+/+</sup> groups are indicated by black square, while control and trained *Bdnf*<sup>+/-</sup> groups are indicated by white square. Comparisons between groups were made by two-way ANOVA. G—genotype (*Bdnf*<sup>+/+</sup> genotype vs. *Bdnf*<sup>+/-</sup> genotype); T - training (control vs. training); G x T, the interaction between genotype and training. For significant interactions Tukey's *post hoc* test was performed. Post-hoc results: ▲ = significant difference between trained rats with *Bdnf*<sup>+/-</sup> genotype and control rats with *Bdnf*<sup>+/+</sup> genotype ( $p = 0.0354$ ); ● = significant difference between trained rats with *Bdnf*<sup>+/-</sup> genotype and trained rats with *Bdnf*<sup>+/+</sup> genotype ( $p = 0.0201$ ); \$ = significant difference between trained rats with *Bdnf*<sup>+/-</sup> genotype and control rats with *Bdnf*<sup>+/-</sup> ( $p = 0.0422$ ). Detailed results of performed tests are given in Table 1.

Our results demonstrated that endurance training led to an increase in hepatic ALAT activity and a significant elevation in ASAT activity in knockout rats (*Bdnf*<sup>+/-</sup> and *Bdnf*<sup>+/-</sup>T). However, this effect was mainly observed in the group of trained knockout rats (Figures 5B,C,E; Table 1). It is well-established that endurance training can improve liver function and reduce liver enzyme levels in the bloodstream, such as ALAT and ASAT, particularly in individuals with obesity or metabolic

syndrome (Haukeland et al., 2008; Skrypnik et al., 2016). Therefore, our findings demonstrate an increase in ALAT and ASAT levels in the liver of knockout rats, confirmed previous observations. The implemented training regimen led to a significant reduction in hepatic LDH activity in the trained rat population (*Bdnf*<sup>+/+</sup>T and *Bdnf*<sup>+/-</sup>T), an enzyme crucial for cellular metabolism, particularly anaerobic glycolysis (Farhana and Lappin, 2023). Studies by Lupa et al. (1994), have previously demonstrated a decrease in hepatic LDH activity in response to endurance training in young rats. This finding suggests that endurance training may have a positive impact on liver health and metabolic function, potentially reducing the risk of liver-related disorders. Importantly, our results indicate that the decrease in hepatic LDH activity observed after endurance training is independent of the BDNF genotype.

No significant differences were observed in INS and LEPT hormone concentrations in the livers of rats with knockout (*Bdnf*<sup>+/-</sup> and *Bdnf*<sup>+/-</sup>T) and normal (*Bdnf*<sup>+/+</sup> and *Bdnf*<sup>+/+</sup>T) genotypes. These findings indicate that liver functions, including the regulation of glucose metabolism (Chadt and Al-Hasani, 2020) and maintenance of energy balance (Martinez-Uña et al., 2020) remain unchanged in knockout rats. This can be attributed to the fact that this liver function is closely related to hormones produced by other organs and transported to the liver via the circulation. However, it is worth noting that liver INS and LEPT levels were significantly higher after endurance training in our study. This observation is therefore consistent with previous reports emphasising the importance of regular exercise in regulating body weight and blood sugar levels in humans (Karacabey, 2009). Interestingly, our results indicate that these training effects are not dependent on BDNF genotypes, as observed for LDH activity.

It is important to note that a significant reduction in BDNF and Trk-B levels in liver of knockout rats (*Bdnf*<sup>+/-</sup> and *Bdnf*<sup>+/-</sup>T) seems to be also associated with a higher concentration of hepatic IL-6 compared to rats with the normal genotype (*Bdnf*<sup>+/+</sup> and *Bdnf*<sup>+/+</sup>T). However, such difference is caused by significant increase in IL-6 concentration in



the group of trained animals with BDNF gene deficiency (see Figure 2 and Table 1). Cressman et al. (1996) discovered that even a single dose of IL-6 can restore gene expression in mice lacking IL-6 gene, resulting in hepatocyte proliferation and inhibition of liver damage. Garnol et al. (2016) observed heightened levels of IL-6 in the liver after partial hepatectomy, considering it as an essential factor for initiating liver regeneration. Therefore, elevated levels of IL-6 play a crucial role in promoting hepatocyte proliferation and are commonly regarded as a key factor in driving liver regeneration. Accordingly, our findings have demonstrated a significant increase in hepatic IL-6 levels, particularly in the trained knockout rat group (Figure 2; Table 1). This suggests that endurance training has the potential to enhance hepatocyte proliferation and initiate liver regeneration processes, especially in animals with reduced levels of BDNF and Trk-B in the liver. Additionally, it is well-established that muscle cells are a major source of IL-6 production in response to exercise. Steinbacher and Eckl (2015) proposed that IL-6 produced by muscles during exercise exerts an anti-inflammatory effect, leading to a reduction in pro-inflammatory cytokine levels. Moreover, it has been observed that muscles release a substantial amount of IL-6 into the bloodstream even after a single exercise session (Fischer, 2006), and this IL-6 can be captured by the liver (Febbraio et al., 2003). Therefore, our results suggest that the production of IL-6 during training plays a crucial role in promoting liver regeneration, particularly in animals with metabolic liver disorders like knockout rats. Furthermore, the elevated IL-6 levels in BDNF-deficient rats may be a potential factor contributing to the increase in ALAT and ASAT activity. This suggests that IL-6 might play a regenerative role by enhancing the efficiency of some metabolic pathways.

## Conclusion

The study revealed that BDNF knockout rats loss exhibited a significant reduction in BDNF/Trk-B content within the liver. This reduction was accompanied by lower levels of lipids, such as CHOL and LDL, and a simultaneous increase in TGs levels. In addition, there was a reduction in the activity of two liver enzymes—ALAT and GGT. These alterations in lipid metabolism and enzyme activity contributed to increase in obesity, as evidenced by elevated liver weight and body weight in the rats. Our findings suggest that a reduction in BDNF/Trk-B signaling contributes to changes in lipid metabolism that lead to hepatic steatosis and obesity, which are symptoms of the metabolic syndrome.

Moderate endurance training induced an increase in hepatic ALAT and ASAT activity in knockout rats, suggesting improved metabolic pathway efficiency in the liver. Furthermore, a significant increase in hepatic IL-6 levels was demonstrated in trained animals with the BDNF knockout genotype, suggesting that the initiation of liver regeneration is mediated by IL-6 produced by contracting skeletal muscle. It cannot be excluded that it is responsible for improving the efficiency of metabolic pathways by increasing ALAT and ASAT activity. On the other hand, the effect of endurance exercise on LEPT and INS concentrations, as well as LDH activity, was not dependent on a specific BDNF genotype.

Future studies should focus on investigating the effects of the BDNF/Trk-B axis on the pathways of the above-mentioned enzymes, which play a key role in liver metabolic functions.

Furthermore, upcoming studies should aim to provide a more complex analysis of the role of IL-6 in liver regeneration.

## Limitations

Measurement of the biomarkers tested in blood was not possible due to the fact that blood samples were collected to assess neurotrophin levels, as shown in our previous work performed on the same group of animals (Grzelak et al., 2023). The volume of blood samples collected was also limited due to the *in vivo* electrophysiology experiment being conducted in parallel. In addition, we did not conduct immunochemistry research in liver.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Ethics statement

The animal study was approved by the Local Ethics Committee for Animal Research in Poznań. The study was conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements.

## Author contributions

NG: Data curation, Formal Analysis, Investigation, Methodology, Software, Writing—original draft, Writing—review and editing. DK: Formal Analysis, Investigation, Methodology, Writing—original draft, Writing—review and editing. WM: Conceptualization, Formal Analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Supervision, Writing—original draft, Writing—review and editing.

## Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This study was funded by the Polish National Science Center Grant No. 2017/27/B/NZ7/01113.

## Acknowledgments

The authors thank Dr. Tomasz Podgórski and Dr. Joanna Kamińska for technical support and meaningful discussion.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.



## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated

organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## References

- Abdel-Gayoum, A. A., and Ahmida, M. H. S. (2017). Changes in the serum, liver, and renal cortical lipids and electrolytes in rabbits with cisplatin-induced nephrotoxicity. *Turk. J. Med. Sci.* 47, 1019–1027. doi:10.3906/sag-1602-136
- Ahmadian, M., Duncan, R. E., and Sul, H. S. (2009). The skinny on fat: lipolysis and fatty acid utilization in adipocytes. *Trends Endocrinol. Metabolism* 20, 424–428. doi:10.1016/j.tem.2009.06.002
- Alves-Bezerra, M., and Cohen, D. E. (2017). Triglyceride metabolism in the liver. *Compr. Physiol.* 8, 1–8. doi:10.1002/cphy.c170012
- Aravamudan, B., Thompson, M. A., Pabelick, C. M., and Prakash, Y. S. (2016). Mechanisms of BDNF regulation in asthmatic airway smooth muscle. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 311, L270–L279. doi:10.1152/ajplung.00414.2015
- Arazi, H., Babaei, P., Moghimi, M., and Asadi, A. (2021). Acute effects of strength and endurance exercise on serum BDNF and IGF-1 levels in older men. *BMC Geriatr.* 21, 50. doi:10.1186/s12877-020-01937-6
- Belviranlı, M., and Okudan, N. (2018). Exercise training increases cardiac, hepatic and circulating levels of brain-derived neurotrophic factor and irisin in young and aged rats. *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.* 36. doi:10.1515/hmbci-2018-0053
- Canbay, A., Bechmann, L., and Gerken, G. (2007). Lipid metabolism in the liver. *Z Gastroenterol.* 45, 35–41. doi:10.1055/s-2006-927368
- Cao, M., Li, S., Tang, Y., and Zou, Y. (2022). A meta-analysis of high-intensity interval training on glycolipid metabolism in children with metabolic disorders. *Front. Pediatr.* 10, 887852. doi:10.3389/fped.2022.887852
- Carobene, A., Braga, F., Roraas, T., Sandberg, S., and Bartlett, W. A. (2013). A systematic review of data on biological variation for alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and  $\gamma$ -glutamyl transferase. *Clin. Chem. Lab. Med.* 51, 1997–2007. doi:10.1515/cklm-2013-0096
- Cassiman, D., Denef, C., Desmet, V. J., and Roskams, T. (2001). Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology* 33, 148–158. doi:10.1053/jhep.2001.20793
- Chadi, A., and Al-Hasani, H. (2020). Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. *Physiol. Arch.* 472, 1273–1298. doi:10.1007/s00424-020-02417-x
- Chaldakov, G. N., Fiore, M., Stankulov, I. S., Manni, L., Hristova, M. G., Antonelli, A., et al. (2004). Neurotrophin presence in human coronary atherosclerosis and metabolic syndrome: a role for NGF and BDNF in cardiovascular disease? *Prog. Brain Res.* 146, 279–289. doi:10.1016/S0079-6123(03)46018-4
- Cressman, D. E., Greenbaum, L. E., DeAngelis, R. A., Ciliberto, G., Furth, E. E., Poli, V., et al. (1996). Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 274, 1379–1383. doi:10.1126/science.274.5291.1379
- Deoras, D. P., Young-Curtis, P., Dulvi, R. R., and Tippet, F. E. (1997). Effect of gossypol on hepatic and serum gamma-glutamyltransferase activity in rats. *Vet. Res. Commun.* 21, 317–323. doi:10.1023/a:1005856119553
- Dinoff, A., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, C. S., Sherman, C., Chan, S., et al. (2016). The effect of exercise training on resting concentrations of peripheral brain-derived neurotrophic factor (BDNF): a meta-analysis. *PLoS One* 11, e0163037. doi:10.1371/journal.pone.0163037
- Eckardstein, A. von (2020). CME-laboratory 61: new European consensus recommendations on dyslipidemia. *Prax. (Bern 1994)* 109, 215–220. doi:10.1024/1661-8157/a003437
- Farhana, A., and Lappin, S. L. (2023). "Biochemistry, lactate dehydrogenase," in *StatPearls* (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557536/> (Accessed May 30, 2023).
- Febbraio, M. A., Ott, P., Nielsen, H. B., Steensberg, A., Keller, C., Krstrup, P., et al. (2003). Hepatosplanchnic clearance of interleukin-6 in humans during exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E397–E402. doi:10.1152/ajpendo.00134.2003
- Feingold, K. R. (2022). Lipid and lipoprotein metabolism. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 51, 437–458. doi:10.1016/j.ecd.2022.02.008
- Fischer, C. P. (2006). Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc. Immunol. Rev.* 12, 6–33.
- Fulgenzi, G., Hong, Z., Tomassoni-Ardori, F., Barella, L. F., Becker, J., Barrick, C., et al. (2020). Novel metabolic role for BDNF in pancreatic  $\beta$ -cell insulin secretion. *Nat. Commun.* 11, 1950. doi:10.1038/s41467-020-15833-5
- Gaitán, J. M., Moon, H. Y., Stremlau, M., Dubal, D. B., Cook, D. B., Okonkwo, O. C., et al. (2021). Effects of aerobic exercise training on systemic biomarkers and cognition in late middle-aged adults at risk for Alzheimer's disease. *Front. Endocrinol.* 12, 660181. doi:10.3389/fendo.2021.660181
- García-Suárez, O., González-Martínez, T., Pérez-Pérez, M., Germana, A., Blanco-Gelaz, M. A., Monjil, D. F., et al. (2006). Expression of the neurotrophin receptor TrkB in the mouse liver. *Anat. Embryol. Berl.* 211, 465–473. doi:10.1007/s00429-006-0098-9
- Garnol, T., Kučera, O., Staňková, P., Lotková, H., and Červinková, Z. (2016). Does simple steatosis affect liver regeneration after partial hepatectomy in rats? *Acta Medica (Hradec Kralove)* 59, 35–42. doi:10.14712/18059694.2016.87
- Genzer, Y., Chapnik, N., and Froy, O. (2017). Effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on hepatocyte metabolism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 88, 69–74. doi:10.1016/j.biocel.2017.05.008
- Girard, M., Carrier, P., Loustaud-Ratti, V., and Nubukpo, P. (2021). BDNF levels and liver stiffness in subjects with alcohol use disorder: evaluation after alcohol withdrawal. *Am. J. Drug Alcohol Abuse* 47, 191–198. doi:10.1080/00952990.2020.1833211
- Glinghammar, B., Rafter, L., Lindström, A.-K., Hedberg, J. J., Andersson, H. B., Lindblom, P., et al. (2009). Detection of the mitochondrial and catalytically active alanine aminotransferase in human tissues and plasma. *Int. J. Mol. Med.* 23, 621–631. doi:10.3892/ijmm.00000173
- Grant, D. M. (1991). Detoxification pathways in the liver. *J. Inher. Metab. Dis.* 14, 421–430. doi:10.1007/BF01797915
- Green, R. M., and Flamm, S. (2002). AGA technical review on the evaluation of liver chemistry tests. *Gastroenterology* 123, 1367–1384. doi:10.1053/gast.2002.36061
- Grzelak, N., Krutki, P., Bączek, M., Kaczmarek, D., and Mrówczyński, W. (2023). Influence of altered serum and muscle concentrations of BDNF on electrophysiological properties of spinal motoneurons in wild-type and BDNF-knockout rats. *Sci. Rep.* 13, 4571. doi:10.1038/s41598-023-31703-8
- Guo, W., Ji, Y., Wang, S., Sun, Y., and Lu, B. (2014). Neuronal activity alters BDNF-TrkB signaling kinetics and downstream functions. *J. Cell Sci.* 127, 2249–2260. doi:10.1242/jcs.139964
- Han, H.-S., Kang, G., Kim, J. S., Choi, B. H., and Koo, S.-H. (2016). Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp. Mol. Med.* 48, e218. doi:10.1038/emmm.2015.122
- Hang, P.-Z., Zhu, H., Li, P.-F., Liu, J., Ge, F.-Q., Zhao, J., et al. (2021). The emerging role of BDNF/TrkB signaling in cardiovascular diseases. *Life* 11, 70. doi:10.3390/life11010070
- Hanigan, M. H., Gillies, E. M., Wickham, S., Wakeham, N., and Wirsig-Wiechmann, C. R. (2015). Immunolabeling of gamma-glutamyl transferase 5 in normal human tissues reveals that expression and localization differ from gamma-glutamyl transferase 1. *Histochem. Cell Biol.* 143, 505–515. doi:10.1007/s00418-014-1295-x
- Harris, A. P., Lennen, R. J., Brydges, N. M., Jansen, M. A., Pernet, C. R., Whalley, H. C., et al. (2016). The role of brain-derived neurotrophic factor in learned fear processing: an awake rat fMRI study. *Genes Brain Behav.* 15, 221–230. doi:10.1111/gbb.12277
- Haukeland, J. W., Schreiner, L. T., Lorgen, L., Frigstad, S.-O., Bang, C., Raknerud, N., et al. (2008). ASAT/ALAT ratio provides prognostic information independently of Child-Pugh class, gender and age in non-alcoholic cirrhosis. *Scand. J. Gastroenterology* 43, 1241–1248. doi:10.1080/00365520802158614
- Jiménez-Maldonado, A., de Álvarez-Buylla, E. R., Montero, S., Melnikov, V., Castro-Rodríguez, E., Gamboa-Domínguez, A., et al. (2014). Chronic exercise increases plasma brain-derived neurotrophic factor levels, pancreatic islet size, and insulin tolerance in a TrkB-dependent manner. *PLoS One* 9, e115177. doi:10.1371/journal.pone.0115177
- Jin, W. (2020). Regulation of BDNF-TrkB signaling and potential therapeutic strategies for Parkinson's disease. *J. Clin. Med.* 9, 257. doi:10.3390/jcm9010257
- Johansen, M. J., Gade, J., Stender, S., Frithioff-Bjørse, C., Lund, M. A. V., Chabanova, E., et al. (2020). The effect of overweight and obesity on liver biochemical markers in children and adolescents. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 105, dgz010. doi:10.1210/clinem/dgz010
- Karacabey, K. (2009). The effect of exercise on leptin, insulin, cortisol and lipid profiles in obese children. *J. Int. Med. Res.* 37, 1472–1478. doi:10.1177/147323000903700523
- Kernie, S. G., Liebl, D. J., and Parada, L. F. (2000). BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J.* 19, 1290–1300. doi:10.1093/emboj/19.6.1290



- Li, Y., Li, F., Qin, D., Chen, H., Wang, J., Wang, J., et al. (2022). The role of brain derived neurotrophic factor in central nervous system. *Front. Aging Neurosci.* 14, 986443. doi:10.3389/fnagi.2022.986443
- Lupa, V. A., Podolin, D. A., Roth, D. A., and Mazzeo, R. S. (1994). Influence of aging and endurance training on lactate dehydrogenase in liver and skeletal muscle. *Mech. Ageing Dev.* 75, 191–204. doi:10.1016/0047-6374(94)90009-4
- Lyons, W. E., Mamounas, L. A., Ricaurte, G. A., Coppola, V., Reid, S. W., Bora, S. H., et al. (1999). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 15239–15244. doi:10.1073/pnas.96.26.15239
- Mann, S., Beedie, C., and Jimenez, A. (2014). Differential effects of aerobic exercise, resistance training and combined exercise modalities on cholesterol and the lipid profile: review, synthesis and recommendations. *Sports Med.* 44, 211–221. doi:10.1007/s10279-013-0110-5
- Martínez-Uña, M., López-Mancheño, Y., Diéguez, C., Fernández-Rojo, M. A., and Novelle, M. G. (2020). Unraveling the role of leptin in liver function and its relationship with liver diseases. *IJMS* 21, 9368. doi:10.3390/ijms21249368
- Motamedi, S., Karimi, I., and Jafari, F. (2017). The interrelationship of metabolic syndrome and neurodegenerative diseases with focus on brain-derived neurotrophic factor (BDNF): kill two birds with one stone. *Metab. Brain Dis.* 32, 651–665. doi:10.1007/s11011-017-9997-0
- Mousavi, K., and Jasmin, B. J. (2006). BDNF is expressed in skeletal muscle satellite cells and inhibits myogenic differentiation. *J. Neurosci.* 26, 5739–5749. doi:10.1523/JNEUROSCI.5398-05.2006
- Mrówczyński, W. (2019). Health benefits of endurance training: implications of the brain-derived neurotrophic factor-A systematic review. *Neural Plast.* 2019, 5413067. doi:10.1155/2019/5413067
- Nakagomi, A., Okada, S., Yokoyama, M., Yoshida, Y., Shimizu, I., Miki, T., et al. (2013). Role of the central nervous system and adipose tissue BDNF/TrkB axes in metabolic regulation. *NPJ Aging Mech. Dis.* 1, 15009. doi:10.1038/npjamd.2015.9
- Ogunmoyole, T., Oladele, F. C., Aderibigbe, A., and Johnson, O. D. (2019). Hepatotoxicity of *Telfaria occidentalis* root extracts on wistar albino rat. *Heliyon* 5, e01617. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01617
- Plus-Šadowska, E., and Machaliński, B. (2017). BDNF - a key player in cardiovascular system. *J. Mol. Cell Cardiol.* 110, 54–60. doi:10.1016/j.yjmcc.2017.07.007
- Podyma, B., Parekh, K., Güler, A. D., and Deppmann, C. D. (2021). Metabolic homeostasis via BDNF and its receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* 32, 488–499. doi:10.1016/j.tem.2021.04.005
- Rasmussen, P., Brassard, P., Adser, H., Pedersen, M. V., Leick, L., Hart, E., et al. (2009). Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Exp. Physiol.* 94, 1062–1069. doi:10.1113/expphysiol.2009.048512
- Ribeiro, D., Petrigna, L., Pereira, F. C., Muscella, A., Bianco, A., and Tavares, P. (2021). The impact of physical exercise on the circulating levels of BDNF and nt 4/5: a review. *IJMS* 22, 8814. doi:10.3390/ijms22168814
- Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2016). IL-6 pathway in the liver: from physiopathology to therapy. *J. Hepatol.* 64, 1403–1415. doi:10.1016/j.jhep.2016.02.004
- Shu, H.-C., Hu, J., Jiang, X.-B., Deng, H.-Q., and Zhang, K.-H. (2019). BDNF gene polymorphism and serum level correlate with liver function in patients with hepatitis B-induced cirrhosis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 12, 2368–2380.
- Skrypnik, D., Ratajczak, M., Karolkiewicz, J., Mądry, E., Pupek-Musialik, D., Hansdorfer-Korzon, R., et al. (2016). Effects of endurance and endurance-strength exercise on biochemical parameters of liver function in women with abdominal obesity. *Biomed. Pharmacother.* 80, 1–7. doi:10.1016/j.biopha.2016.02.017
- Sookoian, S., and Pirola, C. J. (2015). Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: from systems biology to the personalized medicine. *WJG* 21, 711–725. doi:10.3748/wjg.v21.i3.711
- Steinbacher, P., and Eckl, P. (2015). Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules* 5, 356–377. doi:10.3390/biom5020356
- Subczynski, W. K., and Pasenkiewicz-Gierula, M. (2020). Hypothetical pathway for formation of cholesterol microcrystals initiating the atherosclerotic process. *Cell Biochem. Biophys.* 78, 241–247. doi:10.1007/s12013-020-00925-2
- Sustar, A., Perkovic, M. N., Erjavec, G. N., Strac, D. S., and Pivac, N. (2019). Association between reduced brain-derived neurotrophic factor concentration and coronary heart disease. *Indian J. Med. Res.* 150, 43–49. doi:10.4103/ijmr.IJMR\_1566\_17
- Szuhany, K. L., Bugatti, M., and Otto, M. W. (2015). A meta-analytic review of the effects of exercise on brain-derived neurotrophic factor. *J. Psychiatr. Res.* 60, 56–64. doi:10.1016/j.jpsychires.2014.10.003
- Tang, S. W., Chu, E., Hui, T., Helmeste, D., and Law, C. (2008). Influence of exercise on serum brain-derived neurotrophic factor concentrations in healthy human subjects. *Neurosci. Lett.* 431, 62–65. doi:10.1016/j.neulet.2007.11.019
- Tsuchida, A., Nonomura, T., Nakagawa, T., Itakura, Y., Ono-Kishino, M., Yamanaka, M., et al. (2002). Brain-derived neurotrophic factor ameliorates lipid metabolism in diabetic mice. *Diabetes Obes. Metab.* 4, 262–269. doi:10.1046/j.1463-1326.2002.00206.x
- Vermeulen, N. P. E., Bessems, J. G. M., and Van De Straat, R. (1992). Molecular aspects of paracetamol-induced hepatotoxicity and its mechanism-based prevention. *Drug Metab. Rev.* 24, 367–407. doi:10.3109/03602539208996298
- Vivacqua, G., Renzi, A., Carpino, G., Franchitto, A., and Gaudio, E. (2014). Expression of brain derived neurotrophic factor and of its receptors: TrkB and p75NT in normal and bile duct ligated rat liver. *Ital. J. Anat. Embryol.* 119, 111–129. doi:10.13128/IJAE-15138
- Yoshii, A., and Constantine-Paton, M. (2010). Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev. Neurobiol.* 70, 304–322. doi:10.1002/dneu.20765
- Zhou, F., and Sun, X. (2021). Cholesterol metabolism: a double-edged sword in hepatocellular carcinoma. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 762828. doi:10.3389/fcell.2021.762828

# Myocardial Disorders in BDNF-Deficient Rats: Limited Recovery Post-Moderate Endurance Training

Norbert Grzelak<sup>1</sup>, Dominik Kaczmarek<sup>2</sup>, Krystian Marek Poziemba<sup>2</sup>, Włodzimierz Mrówczyński<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Department of Neurobiology, Poznań University of Physical Education, Poznań, Poland; <sup>2</sup>Department of Physiology and Biochemistry, Poznań University of Physical Education, Poznań, Poland

Correspondence: Włodzimierz Mrówczyński, Department of Neurobiology, Poznań University of Physical Education, Poznań, Poland, Email [mrowczynski@awf.poznan.pl](mailto:mrowczynski@awf.poznan.pl)

**Introduction:** The study aimed to determine whether heterozygous BDNF-deficient (BDNF-knockout, SD-BDNF) rats exhibit pathological changes in the myocardium and to assess whether a 5-week moderate-intensity endurance training program can reverse adverse changes in the heart muscle.

**Methods:** Experiments were conducted on four groups of rats: control wild-type, control BDNF knockout, trained wild-type and trained BDNF knockout. Knockout rats were selected due to the presence of symptoms resembling metabolic syndrome in serum and liver while 5-week moderate endurance training was used as an intervention targeted at restoring heart function. Measurements of BDNF/Trk-B concentrations and molecules levels and activities, such as cardiac specific enzymes like creatine kinase and creatine kinase myocardial band, lipids as total cholesterol, low-density lipoprotein and triglycerides, metabolic enzymes including alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, gamma-glutamyl transferase and lactate dehydrogenase and interleukin-1 were carried out in myocardium homogenates.

**Results:** In BDNF-deficient rats, the myocardium showed significantly reduced lipid concentrations, decreased metabolic and cardiac enzyme activity, and elevated Trk-B levels, all of which are indicative of myocardial ischemia or hypoxia. These changes in critical biomarkers were consistent with those earlier observed in the livers of BDNF-deficient rats, suggesting a link between the liver and cardiac function. Moderate endurance training led to an increase in creatine kinase activity in the myocardium of trained rats, suggesting increased production and utilization of energy required for myocardial contraction in trained wild-type and knockout populations of rats.

**Discussion:** BDNF-deficient rats exhibited numerous myocardial abnormalities, most of which were not reversible after moderate-intensity endurance training. These findings provide a basis for a deeper understanding of the mechanisms underlying myocardial disorders in BDNF-deficient rats, which appear to be a suitable model for studying various aspects of metabolic disorders.

**Keywords:** BDNF, Trk-B, gene-deficiency rats, heart, endurance training

## Introduction

It has been shown that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a pleiotropic protein belonging to the neurotrophic factor family.<sup>1</sup> It was first discovered in the mammalian brain,<sup>2</sup> purified and described as a key factor involved in neuronal growth, development and survival.<sup>3</sup> This neurotrophic factor plays an important role in development and synaptic plasticity,<sup>4</sup> particularly in relation to neurons located in brain areas such as the hippocampus, visual cortex, substantia nigra and striatum.<sup>5</sup> Furthermore, extensive studies have shown that the action of BDNF is mediated by its specific binding to the tropomyosin-related kinase B receptor (Trk-B), which initiates a cascade of downstream signalling pathways, finally causing physiological changes in nervous tissue.<sup>6</sup>

Recent studies have shown that BDNF and its tropomyosin-related kinase B receptor (Trk-B) are also expressed in various types of cardiac cells such as cardiomyocytes<sup>7-9</sup> and endothelial cells lining the coronary arteries.<sup>10</sup> Studies

Received: 16 August 2024  
Accepted: 7 November 2024  
Published: 5 December 2024

Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity 2024:17 4649–4660

4649



© 2024 Grzelak et al. This work is published and licensed by Dove Medical Press Limited. The full terms of this license are available at <https://www.dovepress.com/terms.php> and incorporate the Creative Commons Attribution – Non Commercial (unported, v3.0) License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>). By accessing the work you hereby accept the Terms. Non-commercial uses of the work are permitted without any further permission from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. For permission for commercial use of this work, please see paragraphs 4.2 and 5 of our Terms (<https://www.dovepress.com/terms.php>).



indicate that the BDNF/Trk-B axis is crucial for maintaining normal cardiovascular function<sup>11</sup> by promoting cardiomyocytes survival,<sup>12</sup> improving cardiac function related to cardiac contraction and relaxation<sup>8</sup> and regulating the development of large blood vessels in heart tissue.<sup>10</sup> On the other hand, dysfunction of BDNF/Trk-B axis is associated with cardiovascular disease and related disorders,<sup>13</sup> while low levels of circulating BDNF have been recognized as an indicator for diagnosing adverse myocardial changes.<sup>14</sup> For example, BDNF levels in peripheral blood (serum or plasma) were significantly lower in patients with ischaemic heart disease or acute coronary syndrome,<sup>15</sup> with unstable angina,<sup>16</sup> at risk of stroke and vascular brain injury,<sup>17</sup> and with chronic heart failure<sup>18</sup> compared to healthy controls. Furthermore, Kaess et al<sup>19</sup> showed in a large human sample that low blood BDNF levels were associated with higher mortality and increased incidence of cardiovascular events. In turn, studies in Trk-B knockout mice have shown that the absence of the Trk-B receptor leads to impaired cardiac contraction and diastole.<sup>8</sup>

On the other hand, endurance running is considered as health-promoting therapy against numerous cardiovascular and heart diseases, as confirmed studies highlighting its beneficial effects.<sup>20</sup> This type of training increases the aerobic capacity of the exercised heart,<sup>21</sup> leading to a significant reduction in the risk of cardiovascular mortality.<sup>22</sup> Moreover, some research indicated a link between exercise training and increased BDNF expression in skeletal muscle, heart, and brain.<sup>23–26</sup> Nakano et al<sup>27</sup> suggested that BDNF production is dependent on muscle function and activity resulting from adequate skeletal muscle training in patients with heart failure. Lee et al<sup>28</sup> showed that 4-week treadmill running training significantly increased BDNF protein expression in the left ventricle of rats after myocardial infarction. Moreover, 12 weeks of voluntary wheel running in young and aged rats resulted in higher levels of BDNF in heart when compared to the sedentary counterparts.<sup>29</sup>

The first purpose of the study was to determine pathological changes in the myocardium of heterozygous knockout rats (BDNF-knockout, SD-BDNF), while the second was to evaluate the effect of a 5-week moderate-intensity endurance training program as a potential intervention to counteract adverse changes occurring in the myocardium of BDNF-deficient rats. Hence, the levels of BDNF, Trk-B and key metabolic biomarkers were measured in myocardial homogenate and compared between groups of rats with different BDNF genotypes (typical/knockout) and lifestyles (untrained/trained). Our hypothesis assumed that animals with different genotype and lifestyle would show various BDNF/Trk-B content and variations in levels of common myocardial biomarkers.

## Materials and Methods

### Animals

Heart biomarkers were measured in 41 male Sprague-Dawley rats aged 4–5 months, which were obtained from a breeding colony at SAGE Labs (St. Louis, MO, USA). 21 animals had the normal *BDNF* genotype (*BDNF*-wild type), while the remaining 20 rats had the heterozygous *BDNF* genotype (*BDNF*-knockout, SD-BDNF).<sup>30</sup>

Rats were randomly divided into the following four groups: control rats with the normal genotype (*BDNF*<sup>+/+</sup>, n=11), control rats with the knockout genotype (*BDNF*<sup>+/-</sup>, n=11), trained rats with the normal genotype (*BDNF*<sup>+/+</sup>T, n=10) and trained rats with the knockout genotype (*BDNF*<sup>+/-</sup>T, n=9). Prior to the experiments, the animals were kept in standard laboratory cages, with two rats of the same genotype housed together and provided with ad libitum access to food and water. The rats were housed in a room with controlled conditions, including an inverted 12-hour light/dark cycle, humidity of 55 ± 1% and temperature of 22 ± 2°C. To collect hearts, all animals were euthanized by an overdose of sodium pentobarbital (180 mg kg<sup>-1</sup>).

### Ethical Approval

The experiments conducted on animals complied with the regulations of the Polish Animal Protection Act, the European Union guidelines and the ARRIVE guidelines. Experimental protocols were reviewed and approved by the Local Ethical Committee in Poznań, with the number 58/2018 assigned.



## Endurance Training Protocol

A moderate-intensity endurance training was implemented to modulate the concentrations and activity of the tested biomarkers in heart tissue. Training was conducted using an electric treadmill designed for small rodents (Exer-6M, Columbus Instruments). The training programme consisted of a preliminary week followed by 5 weeks of the main training. Each training session lasted 45 minutes and the rats trained 5 days per week. During the training period, treadmill speed was gradually increased, reaching 25 m/min at the end of the total training time.<sup>31</sup>

## Tissue Collection

Following an overdose of sodium pentobarbital as an anaesthetic, cardiac muscle was collected. The tissue collected from the heart muscle was then weighed and transferred into cryogenic vials (NUNC/Thermo Fisher Scientific, USA). To preserve the tissue, the vials were rapidly frozen using liquid nitrogen and then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further measurement.

## Homogenization

The rats were killed by an overdose of sodium pentobarbital, a thoracotomy was performed to expose the myocardium, and the heart muscle was collected. To obtain pure heart muscle except for structures from the atria and ventricles, the most external parts of the heart were excised. The removed tissue sections were weighed and an appropriate amount of Phosphate-buffered saline (PBS) with the addition of Halt Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free (100X) (Thermo Fischer Scientific, USA) was added in proportion to the tissue weight. The tissue sections were then homogenized using a dispersion homogenizer (VWR VDI 12, Singapore) in four cycles. Each cycle consisted of homogenization for 30 seconds followed by a one-minute cooling period on ice. The homogenization speed was set at 30,000 revolutions per minute (rpm) to ensure effective fragmentation of the tissue. After homogenization, the homogenate was centrifuged at 5,000 rpm for five minutes. This centrifugation step separated the cellular debris and larger particles from the supernatant. The resulting supernatant, containing the desired myocardial components, was carefully collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis and measurement.

## Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

To assess the concentrations of BDNF (sensitivity test: 0.035 ng-mL<sup>-1</sup>, cat. no.: SRB-T-81493), Trk-B (sensitivity test: 12.337 pg/mL; cat. no.: 201-11-0426) and IL-1 (sensitivity test: 10.135 ng/L; cat. no.: 201-11-0108), immunoassays (ELISAs) were performed according to the manufacturer's instructions provided by Sunredbio, China. The absorbance of the resulting solution was measured at 450 nm using a multi-mode microplate reader (Synergy 2 SIAFRT, BioTek, USA).

## Biochemistry Analyses

Measurements of LDL concentrations (test sensitivity: 3.9 mg/dL; cat. no.: 7-280 [Cormay, Poland]), CHOL (test sensitivity: 1.95 mg/dL; cat. no.: 7-204 [Cormay, Poland]), TG (test sensitivity: 1.4 mg/dL; cat. no.: 7-253 [Cormay, Poland]), ALAT (sensitivity test: 8 U/L; cat. no.: 7-216 [Cormay, Poland]), ASAT (sensitivity test: 7 U/L; cat. no.: 7-214 [Cormay, Poland]), LDH (sensitivity test: 6.6 U/L; cat. no.: 7-239 [Cormay, Poland]), GGT (sensitivity test: 8 U/L; cat. no.: 7-224 [Cormay, Poland]), CK (sensitivity test: 7.4 U/L; cat. no.: 7-220 [Cormay, Poland]) and CK-MB (sensitivity test: 4 U/L; cat. no.: [Cormay, Poland]) were performed using a clinical chemistry analyzer (Accent 220S, Cormay, Poland).

## Statistical Analysis

Presented data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) for all studied factors. To compare all the studied groups, a two-way analysis of variance (ANOVA) was performed. If the interaction between the independent variables was found to be statistically significant, Tukey's post-hoc test was carried out. All statistical analyses were conducted using Statistica 13 software (StatSoft, Poland, Cracow).



## Results

### BDNF and Trk-B

There was no significant difference in cardiac BDNF levels between populations of rats with the normal genotype (*BDNF*<sup>+/+</sup> and *BDNF*<sup>+/+T</sup>) and rats with the knockout genotype (*BDNF*<sup>+/-</sup> and *BDNF*<sup>+/-T</sup>) (Figure 1A and Table 1). Despite this observation, heart Trk-B levels were significantly higher in the knockout rat population (*BDNF*<sup>+/-</sup> and *BDNF*<sup>+/-T</sup>) compared to the typical genotype rat population (*BDNF*<sup>+/+</sup> and *BDNF*<sup>+/+T</sup>) (Figure 1B and Table 1). On the other hand, BDNF and Trk-B levels in the heart of the trained population (*BDNF*<sup>+/+T</sup> and *BDNF*<sup>+/-T</sup>) were not significantly different compared to the control population of rats (*BDNF*<sup>+/+</sup> and *BDNF*<sup>+/-</sup>) (Figure 1A, B and Table 1).

### IL-1

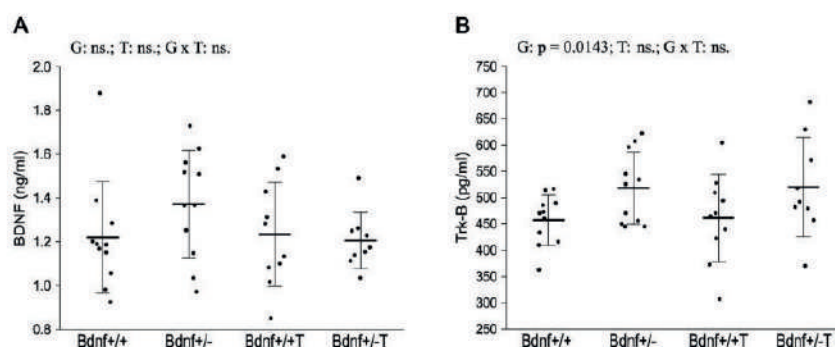
There were no changes in IL-1 levels when comparing the typical (*BDNF*<sup>+/+</sup> and *BDNF*<sup>+/+T</sup>) and knockout (*BDNF*<sup>+/-</sup> and *BDNF*<sup>+/-T</sup>) (Figure 2 and Table 1) as well as the sedentary (*BDNF*<sup>+/+</sup> and *BDNF*<sup>+/-</sup>) and trained (*BDNF*<sup>+/+T</sup> and *BDNF*<sup>+/-T</sup>) populations of rats (Figure 2 and Table 1).

### CK and CK-MB

Cardiac CK and CK-MB activity in population of knockout genotype rats (*BDNF*<sup>+/-</sup> and *BDNF*<sup>+/-T</sup>) was significantly lower compared to population of rats with the typical genotype (*BDNF*<sup>+/+</sup> and *BDNF*<sup>+/+T</sup>) (Figure 3A, B and Table 1). On the other hand, there was a statistically significant increase in CK activity in the trained population (*BDNF*<sup>+/+T</sup> and *BDNF*<sup>+/-T</sup>) compared to the control population of rats (*BDNF*<sup>+/+</sup> and *BDNF*<sup>+/-</sup>) (Figure 3A and Table 1), while no differences in CK-MB activity were found between the aforementioned rat populations (Figure 3B and Table 1).

### Lipids

CHOL and LDL concentrations were significantly lower in the population of rats with the knockout genotype (*BDNF*<sup>+/-</sup> and *BDNF*<sup>+/-T</sup>) compared to the population of rats with the normal genotype (*BDNF*<sup>+/+</sup> and *BDNF*<sup>+/+T</sup>) (Figure 4A, B and Table 1). Furthermore, interaction analysis for LDL showed significantly lower concentrations in the control group of rats with the knockout genotype (*BDNF*<sup>+/-</sup>), compared to the control and trained groups of rats with the normal genotype (*BDNF*<sup>+/+</sup>, *BDNF*<sup>+/+T</sup>) (Figure 4B and Table 1). On the other hand, there were no statistically significant differences in TGs levels between rat populations with different BDNF genotypes (Figure 4C and Table 1). Moreover, comparison of cardiac CHOL, LDL and TG levels between control (*BDNF*<sup>+/+</sup> and *BDNF*<sup>+/-</sup>) and trained (*BDNF*<sup>+/+T</sup> and *BDNF*<sup>+/-T</sup>) rat populations showed no significant changes (Figure 4A–C and Table 1), as well.



**Figure 1** The values of BDNF (A) and Trk-B (B) concentrations in the heart of studied rats along with their mean values (bold line) and standard deviation ( $\pm$ SD) (upper and lower whiskers). *BDNF*<sup>+/+</sup> - control group with normal genotype; *BDNF*<sup>+/-</sup> - control group with BDNF knockout genotype; *BDNF*<sup>+/+T</sup> - trained group with normal genotype; *BDNF*<sup>+/-T</sup> - trained group with BDNF knockout genotype. Comparisons between groups were made by two-way ANOVA. G - genotype (*BDNF*<sup>+/+</sup> genotype vs *BDNF*<sup>+/-</sup> genotype); T - training (control vs training); G  $\times$  T, the interaction between genotype and training. Non-significant results are denoted by ns. Detailed results of performed tests are given in Table 1.

**Table I** Interactions Between Studied Biomarkers

| Studied Biomarkers     |            | Genotype | Training | Genotype/Training |
|------------------------|------------|----------|----------|-------------------|
| <b>BDNF/Trk-B</b>      |            |          |          |                   |
| BDNF                   | $F_{1,37}$ | 0.76     | 1.17     | 1.61              |
|                        | p          | 0.3878   | 0.2873   | 0.2124            |
|                        | $\eta p^2$ | 0.02     | 0.03     | 0.04              |
| Trk-B                  | $F_{1,32}$ | 6.6      | 0.02     | 0                 |
|                        | p          | 0.0143   | 0.8994   | 0.9675            |
|                        | $\eta p^2$ | 0.15     | 0        | 0                 |
| <b>Interleukin</b>     |            |          |          |                   |
| IL-1                   | $F_{1,34}$ | 0.42     | 0.54     | 1.34              |
|                        | p          | 0.52     | 0.4649   | 0.2544            |
|                        | $\eta p^2$ | 0.01     | 0.01     | 0.03              |
| <b>Creatine Kinase</b> |            |          |          |                   |
| CK                     | $F_{1,37}$ | 16.69    | 5.76     | 0.32              |
|                        | p          | 0.0002   | 0.0215   | 0.5773            |
|                        | $\eta p^2$ | 0.31     | 0.13     | 0.01              |
| CK-MB                  | $F_{1,33}$ | 8.13     | 0.24     | 0.98              |
|                        | p          | 0.0071   | 0.6296   | 0.3296            |
|                        | $\eta p^2$ | 0.18     | 0.01     | 0.03              |
| <b>Lipids</b>          |            |          |          |                   |
| CHOL                   | $F_{1,33}$ | 27.61    | 0.56     | 2.2               |
|                        | p          | <0.0001  | 0.4604   | 0.1467            |
|                        | $\eta p^2$ | 0.43     | 0.01     | 0.06              |
| LDL                    | $F_{1,35}$ | 13.47    | 0.08     | 4.23              |
|                        | p          | 0.0008   | 0.7838   | 0.0468            |
|                        | $\eta p^2$ | 0.27     | 0        | 0.10              |
| TG                     | $F_{1,35}$ | 3.09     | 0.28     | 1.41              |
|                        | p          | 0.0873   | 0.6001   | 0.2418            |
|                        | $\eta p^2$ | 0.08     | 0.01     | 0.04              |
| <b>Enzymes</b>         |            |          |          |                   |
| LDH                    | $F_{1,37}$ | 0.69     | 1.48     | 0                 |
|                        | p          | 0.4107   | 0.2312   | 0.9964            |
|                        | $\eta p^2$ | 0.02     | 0.04     | 0                 |

(Continued)



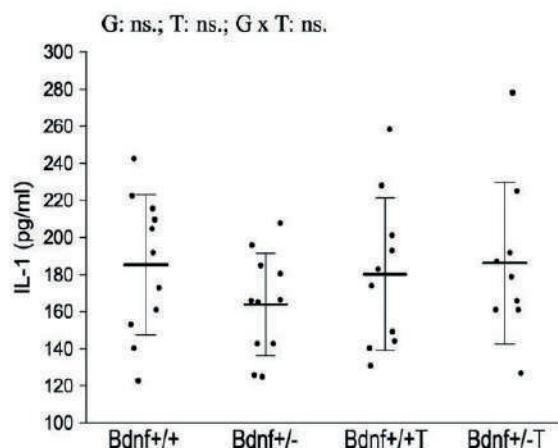
**Table 1** (Continued).

| Studied Biomarkers |            | Genotype | Training | Genotype/Training |
|--------------------|------------|----------|----------|-------------------|
| ALAT               | $F_{1,36}$ | 34.74    | 0.38     | 0.42              |
|                    | p          | <0.0001  | 0.5396   | 0.5218            |
|                    | $\eta p^2$ | 0.48     | 0.01     | 0.01              |
| ASAT               | $F_{1,36}$ | 22.93    | 1.04     | 0.24              |
|                    | p          | <0.0001  | 0.3149   | 0.6291            |
|                    | $\eta p^2$ | 0.38     | 0.03     | 0.01              |
| GGT                | $F_{1,35}$ | 53.2     | 0.71     | 1.22              |
|                    | p          | <0.0001  | 0.4104   | 0.2770            |
|                    | $\eta p^2$ | 0.59     | 0.02     | 0.03              |

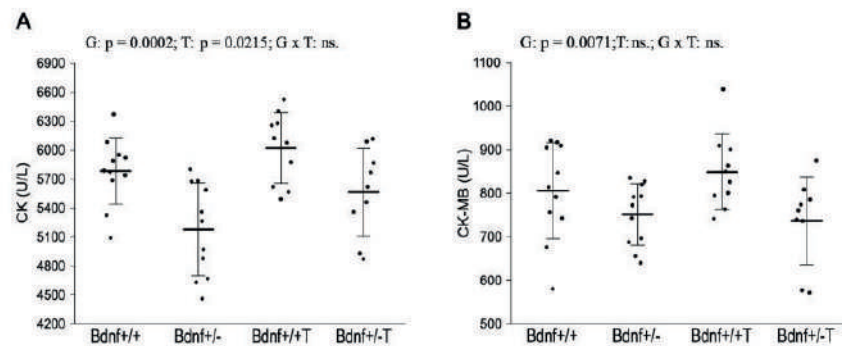
**Notes:** Results of significance (p), effect size ( $\eta p^2$ ) and test power (F) for particular effects and interactions regarding studied biomarkers such as: BDNF and Trk-B (Figure 1A and B), IL-1 (Figure 2), CK and CK-MB (Figure 3A and B), lipids – CHOL, LDL and TG (Figure 4A–C), enzymes – ALAT, ASAT, GGT, LDH (Figure 5A–D), BDNF/Trk-B, Interleukin, Creatine Kinase, Lipids, Enzymes: Groups of tested biomarkers. Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed. Genotype (*BDNF*<sup>+/+</sup> genotype vs *BDNF*<sup>+/–</sup> genotype); Training (control group vs trained group); Genotype/Training (the interaction between genotype and training).

## Enzymes

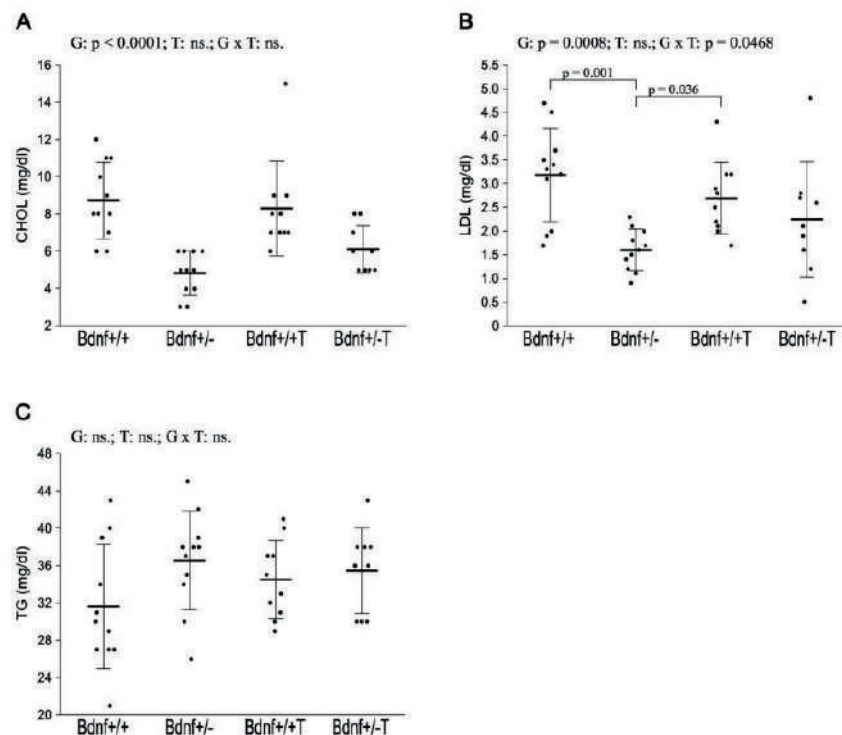
The activities of most of the enzymes tested (ALAT, ASAT and GGT) were significantly lower in the population of rats with the knockout genotype (*BDNF*<sup>+/–</sup> and *BDNF*<sup>+/–</sup>T) compared to the control population of rats with the normal genotype (*BDNF*<sup>+/+</sup> and *BDNF*<sup>+/+</sup>T) (Figure 5A–C, Table 1), with the exception of LDH, whose activity was comparable in both populations (Figure 5D and Table 1). On the other hand, there were no significant differences in ALAT, ASAT, GGT and LDH activities when comparing the control population (*BDNF*<sup>+/+</sup> and *BDNF*<sup>+/–</sup>) with the trained ones (*BDNF*<sup>+/+</sup>T and *BDNF*<sup>+/–</sup>T) (Figure 5A–D and Table 1).



**Figure 2** The values of IL-1 concentrations in the heart of studied rats along with their mean values (bold line) and standard deviation ( $\pm$ SD) (upper and lower whiskers). *BDNF*<sup>+/+</sup> – control group with normal genotype; *BDNF*<sup>+/–</sup> – control group with BDNF knockout genotype; *BDNF*<sup>+/+</sup>T – trained group with normal genotype; *BDNF*<sup>+/–</sup>T – trained group with BDNF knockout genotype. Comparisons between groups were made by two-way ANOVA. G – genotype (*BDNF*<sup>+/+</sup> genotype vs *BDNF*<sup>+/–</sup> genotype); T – training (control vs training); G x T, the interaction between genotype and training. Non-significant results are denoted by ns. Detailed results of performed tests are given in Table 1.



**Figure 3** The values of CK (A) and CK-MB (B) activities in the heart of studied rats along with their mean values (bold line) and standard deviation ( $\pm$ SD) (upper and lower whiskers). BDNF+/+ - control group with normal genotype; BDNF+/- - control group with BDNF knockout genotype; BDNF+/+T - trained group with normal genotype; BDNF+/-T - trained group with BDNF knockout genotype. Comparisons between groups were made by two-way ANOVA. G - genotype (BDNF+/+ genotype vs BDNF+/- genotype); T - training (control vs training); G x T, the interaction between genotype and training. Significant results are denoted by p, while non-significant results are denoted by ns. Detailed results of performed tests are given in Table 1.

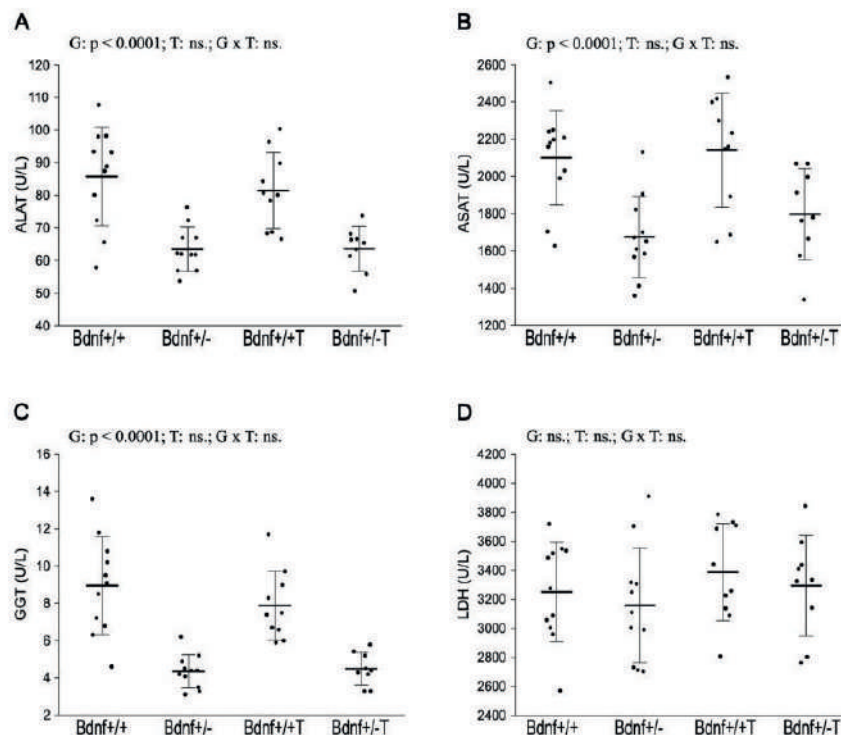


**Figure 4** The values of CHOL (A), LDL (B) and TG (C) concentrations in the heart of studied rats along with their mean values (bold line) and standard deviation ( $\pm$ SD) (upper and lower whiskers). BDNF+/+ - control group with normal genotype; BDNF+/- - control group with BDNF knockout genotype; BDNF+/+T - trained group with normal genotype; BDNF+/-T - trained group with BDNF knockout genotype. Comparisons between groups were made by two-way ANOVA. G - genotype (BDNF+/+ genotype vs BDNF+/- genotype); T - training (control vs training); G x T, the interaction between genotype and training. Significant results are denoted by p, while non-significant results are denoted by ns. Tukey's post-hoc test was conducted to assess the statistical significance of the interaction between genotype and training. Difference of LDL level between BDNF+/+ group and BDNF+/- group ( $p=0.001$ ) and between BDNF+/+ group and BDNF+/+T group ( $p=0.036$ ). Detailed results of performed tests are given in Table 1.

## Discussion

Our study showed that BDNF-deficient rats (BDNF+/- and BDNF+/-T) exhibit lower myocardial concentrations of CK and CK-MB compared to control rats (BDNF+/+ and BDNF+/+T). This reduction suggests cardiac dysfunction, as these





**Figure 5** The values of ALAT (A), ASAT (B), GGT (C) and LDH (D) activities in the heart of studied rats along with their mean values (bold line) and standard deviation ( $\pm$ SD) (upper and lower whiskers). BDNF+/+ - control group with normal genotype; BDNF+/- - control group with BDNF knockout genotype; BDNF+/+T - trained group with normal genotype; BDNF+/-T - trained group with BDNF knockout genotype. Comparisons between groups were made by two-way ANOVA. G - genotype (BDNF+/+ genotype vs BDNF+/- genotype); T - training (control vs training); G x T, the interaction between genotype and training. Significant results are denoted by p, while non-significant results are denoted by ns. Detailed results of performed tests are given in Table 1.

enzymes tend to decrease in failing hearts<sup>32,33</sup> and may leak into the bloodstream due to myocardial ischaemia, infarction or necrosis.<sup>34–36</sup> In addition, BDNF+/- rats showed significantly lower levels of CHOL and LDL in the heart, suggesting increased lipoprotein permeability and transport into the bloodstream. This process contributes to the progression of atherosclerosis and plaque rupture, leading to tissue hypoxia.<sup>37–40</sup> Significantly lower metabolic enzyme activities (ALAT, ASAT and GGT) were also observed in the myocardium of these rats.<sup>35,41</sup> Sammeturi et al<sup>35</sup> reported results consistent with ours, showing decreased ALAT, ASAT and GGT activity in the heart, along with their increased serum levels in rats with isoproterenol-induced myocardial infarction. Abdulkareem et al<sup>41</sup> suggested that organ damage leads to the release of enzymes from tissues into the bloodstream, resulting in their decreased activity in tissues and increased activity in peripheral blood. Hence, the decrease in cardiac enzymes that we demonstrated may contribute to the increased levels of these enzymes in the peripheral blood. Elevated ALAT and ASAT blood levels may indicate liver or heart damage,<sup>42,43</sup> while elevated serum GGT levels are associated with coronary artery disease.<sup>44</sup> Elevated blood levels of these enzymes are always associated with cardiac damage and cardiovascular disease.<sup>42–46</sup> It should be noted that the reductions in lipoprotein concentrations (LDL, CHOL) and enzyme activities (ALAT, ASAT, GGT) in the hearts of the studied rats were almost identical to those observed in their livers.<sup>47</sup> These similarities suggest a strong interaction between heart and liver function in BDNF knockout rats. Meller and Bernardi<sup>48</sup> reported that such a heart-hepatic axis has been identified in clinical practice in patients with coexisting heart and liver disease.

Additionally, a significant increase in Trk-B levels was observed in the myocardium of BDNF+/- and BDNF+/-T rats. This finding is also consistent with previous studies reporting elevated Trk-B levels in failing myocytes from BDNF knockout mice<sup>8</sup> and in myocardium under experimentally induced cardiac hypoxia.<sup>49</sup> Therefore, all the above observations suggest that BDNF+/- rats exhibit numerous disorders in the myocardium.



Results presented have demonstrated that myocardial BDNF levels in the knockout rats (*BDNF*<sup>+/-</sup> and *BDNF*<sup>+/-T</sup>) were not statistically different from those with normal genotype (*BDNF*<sup>+/+</sup> and *BDNF*<sup>+/+T</sup>). In our previous study we found a significant decrease in BDNF levels in both the blood serum<sup>31</sup> and liver<sup>47</sup> of these rats. However, we did not observe any changes in BDNF levels in fast-twitch muscles (tibialis, medial gastrocnemius) or slow-twitch muscles (soleus)<sup>31</sup> in BDNF-deficient rats population. Therefore, such results can suggest that the knockout procedure does not alter BDNF concentrations in the hind limb muscles and heart of BDNF knockout rats.

Therefore, according to obtained results both wild-type (*BDNF*<sup>+/+</sup> and *BDNF*<sup>+/+T</sup>) and knockout rats (*BDNF*<sup>+/-</sup> and *BDNF*<sup>+/-T</sup>) exhibit the same BDNF levels in the myocardium. This may additionally indicate that cardiac BDNF is not directly involved in the restoration of myocardial dysfunction induced by BDNF gene knockout, as previously suggested by Okada et al<sup>12</sup> in experiments on various animal and cellular models with BDNF and Trk-B knockouts. On the other hand, the aforementioned authors showed that Trk-B present in the myocardium can be effectively activated by BDNF from the bloodstream, resulting in improved cardiac function after myocardial infarction. Therefore, it cannot be ruled out that reduced BDNF levels in peripheral blood<sup>31</sup> may be factors responsible for the increase in myocardial Trk-B levels in BDNF knockout rats, in addition to the previously mentioned CHOL leakage from cardiac tissues.

Reduction in CHOL levels may alter the thickness of myocardial fiber membranes and affect Trk-B receptor orientation due to reduced signaling efficiency.<sup>50</sup> This disruption in membrane integrity could impair Trk-B receptor function, triggering a compensatory increase in Trk-B expression, which is necessary to maintain adequate signaling pathways in the myocardium. In addition, the increase in Trk-B levels in the heart may also be a compensatory factor for the reduced amount of BDNF in the blood,<sup>31</sup> which, according to Harris et al,<sup>51</sup> and Garner et al,<sup>52</sup> is due to reduced BDNF levels in the hippocampus, amygdala and frontal cortex in knockout rats. Therefore, it seems likely that the increase in cardiac Trk-B in BDNF-deficient rats (*BDNF*<sup>+/-</sup> and *BDNF*<sup>+/-T</sup>) may complement the BDNF deficiency required to stabilize the BDNF/Trk-B axis. This is confirmed by unaltered levels of IL-1, a key pro-inflammatory cytokine indicating systemic and local inflammation, including inflammation in the heart,<sup>53-55</sup> demonstrated in *BDNF*<sup>+/+T</sup> and *BDNF*<sup>+/-T</sup> rats. Hence, the lack of inflammation in the myocardium of knockout animals can be attributed to increased levels of Trk-B, which regulates the stability of the BDNF/Trk-B axis, responsible for attenuating myocardial ischaemic injury and inhibiting cardiomyocyte apoptosis.<sup>56</sup>

For our study, 5-week moderate-intensity endurance training on a treadmill was chosen because prolonged and regular physical activity has often been recommended as a beneficial strategy for heart health,<sup>57</sup> which optimizes cardiac function<sup>58</sup> and prevents cardiovascular disease.<sup>59</sup> Our previous studies have shown that a 5-week training regime increased levels of BDNF, GDNF and selected myokines (myoglobin and IL-15) in hind limb muscles, altered excitability of fast-type spinal motoneurons, elevated ALAT, ASAT and IL-6 levels, as well as insulin and leptin in the liver of knockout rats.<sup>31,47</sup> Additionally, according to Wang et al,<sup>60</sup> endurance training on a treadmill increases BDNF protein levels in the circulation and heart and improves vascularization and cardiac function in rats.

The only noticeable altering observed after the applied training in this experiment was an increase in cardiac CK activity in both populations of rats with different BDNF genotypes (*BDNF*<sup>+/+ T</sup> and *BDNF*<sup>+/-T</sup>, respectively). According to Zervou et al,<sup>61</sup> such an increase in CK levels may suggest increased production and energy consumption in the myocardium, which improves cardiac function and contributes to more efficient cardiac contractions. For this reason, the creatine/phosphocreatine metabolic pathway catalyzed by CK is emerging as a promising therapeutic direction for the prevention and treatment of ischaemic cardiovascular disease.<sup>62</sup> Hence, a training-induced increase in CK is undoubtedly an important factor in improving myocardial contractile properties. On the other hand, such a result suggests that moderate endurance activity does not substantially affect the tested levels of BDNF, Trk-B and related biomarkers in the myocardium. However, such a result is consistent with the observations of Maroofi et al,<sup>26</sup> who found that moderate-intensity endurance training did not increase BDNF and TrkB-T1 expression in the rat myocardium, nor did it alter systolic cardiac function, in contrast to high-intensity interval training.

In conclusion, our study demonstrates the reduced levels and activities of cardiac biomarkers (CK and CK-MB), metabolic enzymes (ALAT, ASAT, GGT), and lipoproteins (CHOL and LDL), along with elevated Trk-B levels in the myocardium of BDNF-knockout rats. Therefore, the altered levels of the aforementioned biomarkers clearly indicate serious disorder in myocardium of these rats. Furthermore, our results confirmed that the same lipoproteins and metabolic



enzymes are reduced in the heart of BDNF-deficient animals as in their liver<sup>47</sup> suggesting functional interaction between these organs. Therefore, we cannot exclude that the changes observed in heterozygous BDNF-deficient rats suggest the onset of metabolic syndrome symptoms in these animals. According to Todosenko et al,<sup>63</sup> a significant number of genes involved in the development of metabolic syndrome are located near regions of BDNF genes, while a broad spectrum of signaling pathways controlling the development of metabolic syndrome are regulated by BDNF expression. Thus, BDNF knockout rats may have impaired homeostasis of metabolic processes that contribute to metabolic syndrome. Such an association between BDNF content and appetite and obesity (as manifestations of the metabolic syndrome) has already been demonstrated by Kernie et al<sup>64</sup> in mice with BDNF gene ablation. Hence, it seems reasonable to recommend BDNF deficient rats for in-depth studies on various aspects of the metabolic disorder.

Surprisingly, used endurance training evoked a significant increase in myocardial CK content in both populations of trained rats, but it had no effect on the Trk-B, BDNF and related lipids and enzymes in cardiomyocytes. Therefore, moderate-intensity endurance training, which increases CK activity in rat hearts, appears to be responsible for improving cardiac contraction performance in rats regardless of their genotype.

## Data Sharing Statement

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author WM, on reasonable request.

## Funding

This study was funded by the Polish National Science Center Grant No. 2017/27/B/NZ7/01113.

## Disclosure

The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Sasi M, Vignoli B, Canossa M, Blum R. Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2017;469(5–6):593–610. doi:10.1007/s00424-017-1964-4
2. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*. 1982;1(5):549–553. doi:10.1002/j.1460-2075.1982.tb01207.x
3. Bathina S, Das UN. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *aoms*. 2015;6:1164–1178. doi:10.5114/aoms.2015.56342
4. Wang CS, Kavalali ET, Monteggia LM. BDNF signaling in context: from synaptic regulation to psychiatric disorders. *Cell*. 2022;185(1):62–76. doi:10.1016/j.cell.2021.12.003
5. Li Y, Li F, Qin D, et al. The role of brain derived neurotrophic factor in central nervous system. *Front Aging Neurosci*. 2022;14:986443. doi:10.3389/fnagi.2022.986443
6. Colucci-D'Amato L, Speranza L, Volpicelli F. Neurotrophic Factor, BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. *ILMS*. 2020;21(20):7777. doi:10.3390/ijms21207777
7. Fulgenzi G, Tomassoni-Ardori F, Babini L, et al. BDNF modulates heart contraction force and long-term homeostasis through truncated TrkB.T1 receptor activation. *J Cell Biol*. 2015;210(6):1003–1012. doi:10.1083/jcb.201502100
8. Feng N, Huke S, Zhu G, et al. Constitutive BDNF/TrkB signaling is required for normal cardiac contraction and relaxation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(6):1880–1885. doi:10.1073/pnas.1417949112
9. Li L, Guo H, Lai B, et al. Ablation of cardiomyocyte-derived BDNF during development causes myocardial degeneration and heart failure in the adult mouse heart. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:967463. doi:10.3389/fcvm.2022.967463
10. Kermani P, Hempstead B. Brain-Derived Neurotrophic Factor: a Newly Described Mediator of Angiogenesis. *Trend Cardiovasc Med*. 2007;17(4):140–143. doi:10.1016/j.tem.2007.03.002
11. Hang PZ, Zhu H, Li PF, et al. The Emerging Role of BDNF/TrkB Signaling in Cardiovascular Diseases. *Life*. 2021;11(1):70. doi:10.3390/life11010070
12. Okada S, Yokoyama M, Toko H, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Protects Against Cardiac Dysfunction After Myocardial Infarction via a Central Nervous System-Mediated Pathway. *ATVB*. 2012;32(8):1902–1909. doi:10.1161/ATVBAHA.112.248930
13. Pius-Sadowska E, Machaliński B. BDNF - A key player in cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol*. 2017;110:54–60. doi:10.1016/j.yjmcc.2017.07.007
14. Bahls M, Könnemann S, Markus MRP, et al. Brain-derived neurotrophic factor is related with adverse cardiac remodeling and high NTproBNP. *Sci Rep*. 2019;9(1):15421. doi:10.1038/s41598-019-51776-8
15. Manni L, Nikolova V, Vyagova D, Chaldakov GN, Aloe L. Reduced plasma levels of NGF and BDNF in patients with acute coronary syndromes. *Int J Cardiol*. 2005;102(1):169–171. doi:10.1016/j.ijcard.2004.10.041
16. Ejiri J, Inoue N, Kobayashi S, et al. Possible Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Pathogenesis of Coronary Artery Disease. *Circulation*. 2005;112(14):2114–2120. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.476903



17. Pikula A, Beiser AS, Chen TC, et al. Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Levels Are Associated With Risk of Stroke and Vascular Brain Injury: Framingham Study. *Stroke*. 2013;44(10):2768–2775. doi:10.1161/STROKEAHA.113.001447
18. Kadowaki S, Shishido T, Honda Y, et al. Additive clinical value of serum brain-derived neurotrophic factor for prediction of chronic heart failure outcome. *Heart Vessels*. 2016;31(4):535–544. doi:10.1007/s00380-015-0628-6
19. Kaess BM, Preis SR, Lieb W, et al. Circulating Brain-Derived Neurotrophic Factor Concentrations and the Risk of Cardiovascular Disease in the Community. *JAMA*. 2015;4(3):e001544. doi:10.1161/JAHA.114.001544
20. Nystoriak MA, Bhatnagar A. Cardiovascular Effects and Benefits of Exercise. *Front Cardiovasc Med*. 2018;5:135. doi:10.3389/fcvm.2018.00135
21. Dickhuth HH, Röcker K, Mayer F, König D, Korsten-Reck U. Ausdauersport und kardiale Adaptation (Sportherz). *Herz*. 2004;29(4). doi:10.1007/s00059-004-2582-4
22. Arem H, Moore SC, Patel A, et al. Leisure Time Physical Activity and Mortality: a Detailed Pooled Analysis of the Dose-Response Relationship. *JAMA Intern Med*. 2015;175(6):959. doi:10.1001/jamainternmed.2015.0533
23. Prigent-Tessier A, Quirré A, Maguin-Gaté K, et al. Physical training and hypertension have opposite effects on endothelial brain-derived neurotrophic factor expression. *Cardiovas Res*. 2013;100(3):374–382. doi:10.1093/cvr/cvt219
24. Alomari MA, Khabour OF, Maikano A, Alawneh K. Vascular function and brain-derived neurotrophic factor: the functional capacity factor. *Vasc Med*. 2015;20(6):518–526. doi:10.1177/1358863X15598390
25. Wang T, Maltez MT, Lee HW, Ahmad M, Wang H, Leenen FHH. Effect of exercise training on the FNDC5/BDNF pathway in spontaneously hypertensive rats. *Physiol Rep*. 2019;7(24). doi:10.14814/phy2.14323
26. Maroofi A, Bagheri Rouch A, Naderi N, Damirchi A. Effects of two different exercise paradigms on cardiac function, BDNF-TrkB expression, and myocardial protection in the presence and absence of Western diet. *IJC Heart Vasculture*. 2022;40:101022. doi:10.1016/j.ijcha.2022.101022
27. Nakano I, Kinugawa S, Hori H, et al. Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels Are Associated with Skeletal Muscle Function but Not with Muscle Mass in Patients with Heart Failure. *Int Heart J*. 2020;61(1):96–102. doi:10.1536/ihj.19-400
28. Lee HW, Ahmad M, Wang H, Leenen FHH. Effects of exercise training on brain-derived neurotrophic factor in skeletal muscle and heart of rats post myocardial infarction. *Exp Physiol*. 2017;102(3):314–328. doi:10.1113/EP086049
29. Belviranlı M, Okudan N. Exercise training increases cardiac, hepatic and circulating levels of brain-derived neurotrophic factor and irisin in young and aged rats. *Horm Mol Biol Clin Invest*. 2018;36(3). doi:10.1515/hmbci-2018-0053
30. Jabalameli HR, Zahednasab H, Karimi-Moghaddam A, Jabalameli MR. Zinc finger nuclease technology: advances and obstacles in modelling and treating genetic disorders. *Gene*. 2015;558(1):1–5. doi:10.1016/j.gene.2014.12.044
31. Grzelak N, Krutki P, Bączek M, Kaczmarek D, Mrówczyński W. Influence of altered serum and muscle concentrations of BDNF on electrophysiological properties of spinal motoneurons in wild-type and BDNF-knockout rats. *Sci Rep*. 2023;13(1):4571. doi:10.1038/s41598-023-31703-8
32. Nascimben L, Ingwall JS, Pauletto P, et al. Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation*. 1996;94(8):1894–1901. doi:10.1161/01.cir.94.8.1894
33. Lygate CA, Fischer A, Sebag-Montefiore L, Wallis J, Ten Hove M, Neubauer S. The creatine kinase energy transport system in the failing mouse heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(6):1129–1136. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.03.899
34. Patel V, Upaganlawar A, Zalawadia R, Balaraman R. Cardioprotective effect of melatonin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats: a biochemical, electrocardiographic and histoarchitectural evaluation. *Eur J Pharmacol*. 2010;644(1–3):160–168. doi:10.1016/j.ejphar.2010.06.065
35. Sammeturi M, Shaik AH, Bongu SBR, Cheemanapalli S, Mohammad A, Kodihela LD. Protective effects of syringic acid, resveratrol and their combination against isoprenaline administered cardiotoxicity in Wistar rats. *Saudi J Biol Sci*. 2019;26(7):1429–1435. doi:10.1016/j.sjbs.2019.09.027
36. Shen Z, Geng Q, Huang H, et al. Antioxidative and Cardioprotective Effects of Schisandra chinensis Bee Pollen Extract on Isoprenaline-Induced Myocardial Infarction in Rats. *Molecules*. 2019;24(6):1090. doi:10.3390/molecules24061090
37. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(10):803–815. doi:10.1038/nri2171
38. Choy JC, Granville DJ, Hunt DWC, McManus BM. Endothelial Cell Apoptosis: biochemical Characteristics and Potential Implications for Atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33(9):1673–1690. doi:10.1006/jmcc.2001.1419
39. Abe H, Semba H, Takeda N. The Roles of Hypoxia Signaling in the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. *J Atheroscler Thromb*. 2017;24(9):884–894. doi:10.5551/jat.RV17009
40. Hou P, Fang J, Liu Z, et al. Macrophage polarization and metabolism in atherosclerosis. *Cell Death Dis*. 2023;14(10):691. doi:10.1038/s41419-023-06206-z
41. Abdulkareem AO, Olafimihan TF, Busari SA, Garuba A, Oladipo SO. Cardioresenal Effects of Pharmaceutical Plant Effluent in Mice (Mus musculus). *Niger J Physiol Sci*. 2019;34(2):215–221.
42. Washington IM, Van Hoosier G. Clinical Biochemistry and Hematology. In: *The Laboratory Rabbit Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. Elsevier; 2012:57–116. doi:10.1016/B978-0-12-380920-9.00003-1
43. Raval N, Kalyane D, Maheshwari R, Tekade RK. Surface Modifications of Biomaterials and Their Implication on Biocompatibility. In: *Biomaterials and Bionanotechnology*. Elsevier; 2019:639–674. doi:10.1016/B978-0-12-814427-5.00017-2
44. Jiang S, Jiang D, Tao Y. Role of gamma-glutamyltransferase in cardiovascular diseases. *Exp Clin Cardiol*. 2013;18(1):53–56.
45. Ndrepepa G, Kastrati A. Gamma-glutamyl transferase and cardiovascular disease. *Ann Transl Med*. 2016;4(24):481. doi:10.21037/atm.2016.12.27
46. Ndrepepa G. Aspartate aminotransferase and cardiovascular disease—a narrative review. *J Lab Precis Med*. 2021;6:6. doi:10.21037/jlpm-20-93
47. Grzelak N, Kaczmarek D, Mrówczyński W. Comparison of the effects of BDNF/TRKB signalling on metabolic biomarkers in the liver of sedentary and trained rats with normal and knockout BDNF genotypes. *Front Physiol*. 2023;14:1268648. doi:10.3389/fphys.2023.1268648
48. Möller S, Bernardi M. Interactions of the heart and the liver. *Eur Heart J*. 2013;34(36):2804–2811. doi:10.1093/eurheartj/ehd246
49. Gong J, Zhou F, Xin W, Xu J, Xiao F. Caveolin-3 protects diabetic hearts from acute myocardial infarction/reperfusion injury through  $\beta 2AR$ , cAMP/PKA, and BDNF/TrkB signaling pathways. *Aging*. 2020;12(14):14300–14313. doi:10.18632/aging.103469
50. Casarotto PC, Giryeh M, Fred SM, et al. Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors. *Cell*. 2021;184(5):1299–1313.e19. doi:10.1016/j.cell.2021.01.034
51. Harris AP, Lennen RJ, Brydges NM, et al. The role of brain-derived neurotrophic factor in learned fear processing: an awake rat fMRI study. *Genes Brain Behav*. 2016;15(2):221–230. doi:10.1111/gbb.12277



52. Garner JM, Chambers J, Barnes AK, Datta S. Changes in Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression Influence Sleep-Wake Activity and Homeostatic Regulation of Rapid Eye Movement Sleep. *Sleep*. 2018;41(2):zxx194. doi:10.1093/sleep/zxx194
53. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011;117(14):3720–3732. doi:10.1182/blood-2010-07-273417
54. Dinarello CA, van der Meer JWM. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin Immunopathol*. 2013;25(6):469–484. doi:10.1016/j.smim.2013.10.008
55. Javan H, Li L, Schaaf CL, et al. Interleukin-1 Receptor Antagonism Abrogates Acute Pressure Overload-Induced Murine Heart Failure. *Ann Thorac Surg*. 2022;114(1):98–107. doi:10.1016/j.athoracsur.2021.07.044
56. Hang P, Zhao J, Cai B, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates TRPC3/6 channels and protects against myocardial infarction in rodents. *Int J Biol Sci*. 2015;11(5):536–545. doi:10.7150/ijbs.10754
57. Moreira JBN, Wohlwend M, Wisloff U. Exercise and cardiac health: physiological and molecular insights. *Nat Metab*. 2020;2(9):829–839. doi:10.1038/s42255-020-0262-1
58. Verboven M, Van Ryckeghem L, Belkhouribchia J, et al. Effect of Exercise Intervention on Cardiac Function in Type 2 Diabetes Mellitus: a Systematic Review. *Sports Med*. 2019;49(2):255–268. doi:10.1007/s40279-018-1003-4
59. Mrówczyński W. Health Benefits of Endurance Training: implications of the Brain-Derived Neurotrophic Factor-A Systematic Review. *Neural Plast*. 2019;2019:5413067. doi:10.1155/2019/5413067
60. Wang B, Jin H, Han X, Xia Y, Liu N. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in exercise-induced cardioprotection of post-myocardial infarction rats. *Int J Mol Med*. 2018. doi:10.3892/ijmm.2018.3841
61. Zervou SJ, Whittington HJ, Russell AA, Lygate C. Augmentation of Creatine in the Heart. *MRCM*. 2015;16(1):19–28. doi:10.2174/1389557515666150722102151
62. Kitzenberg D, Colgan SP, Glover LE. Creatine kinase in ischemic and inflammatory disorders. *Clin Transl Med*. 2016;5(1):e31. doi:10.1186/s40169-016-0114-5
63. Todosenko N, Yurova K, Khaziakhmatova O, et al. (Epi)genetic Aspects of Metabolic Syndrome Pathogenesis in Relation to Brain-derived Neurotrophic Factor Expression: a Review. *Gene Expr*. 2024;23(2):127–138. doi:10.14218/GE.2023.00202
64. Kermie SG, Liebl DJ, Parada LF. BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J*. 2000;19(6):1290–1300. doi:10.1093/emboj/19.6.1290

## Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity

Dovepress

### Publish your work in this journal

Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity is an international, peer-reviewed open-access journal committed to the rapid publication of the latest laboratory and clinical findings in the fields of diabetes, metabolic syndrome and obesity research. Original research, review, case reports, hypothesis formation, expert opinion and commentaries are all considered for publication. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/diabetes-metabolic-syndrome-and-obesity-journal>