



Gdańsk, 12 czerwca 2023 r.

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Łukaszuk  
Kierownik Zakładu Pielęgniarstwa Położniczo-Ginekologicznego  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

#### Recenzja

**rozprawy mgr Patrycja Juchniewicz**

**Inaktywacja chromosomu X w zaburzeniach metabolizmu i u osób zdrowych**  
**X-chromosome inactivation in metabolic disorders and in healthy individuals**

Praca Pani mgr Patrycji Juchniewicz na stopień doktora w dziedzinie nauk biologicznych została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Jakóbkiewicz-Baneckiej z Katedry Biologii i Genetyki Medycznej oraz dr Ewy Piotrowskiej z Katedry Biologii Molekularnej. Rozprawę przygotowano zgodnie z wymogami ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, jak również rozporządzenia Ministra Nauki Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została przygotowana w oparciu o cykl trzech artykułów naukowych o sumarycznym współczynniku wpływu IF – 13,466 oraz 310 pkt MEiN – dwóch pracach oryginalnych oraz pracy przeglądowej. Prace zostały opublikowane w latach 2018-2023 w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports. W przedstawionych publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. We wszystkich pracach recenzowanego cyklu mgr Patrycja Juchniewicz

uczestniczyła na każdym etapie ich przygotowania. Świadczy to o dużej samodzielności i zaangażowaniu Doktorantki w temat jej badań.

Przedstawiona do oceny praca doktorska zawiera następujące treści – streszczenie, abstract, wprowadzenie, rozprawa doktorska oraz oświadczenia współautorów. Prezentacja omawianych treści liczy 12 stron. Do pracy dołączono również wydruk wszystkich artykułów naukowych będących podstawą rozprawy doktorskiej. Układ przedłożonej rozprawy doktorskiej jest poprawny i przejrzysty.

#### Wartość naukowa i merytoryczna pracy.

Inaktywacja chromosomu X (XCI, ang. X-chromosome inactivation) jest procesem epigenetycznym polegającym na transkrypcyjnym wyciszeniu jednego z dwóch chromosomów X u kobiet podczas wczesnej embriogenezy. Umożliwia to zrównoważoną ekspresję genów na chromosomach X u obu płci. Raz wyciszony, nieaktywny chromosom X jest stabilnie dziedziczony poprzez kolejne podziały komórek somatycznych. Inaktywacja chromosomu X zwykle jest zjawiskiem losowym jednak może występować również nielosowo. Ze skrajnie nielosową inaktywacją chromosomu X mamy do czynienia wówczas, gdy komórki z nieaktywnym chromosomem X pochodzącym wyłącznie od jednego z rodziców stanowią ponad 90%. Zjawisko to prawdopodobnie nasila się wraz z wiekiem. Prawdopodobnie nie ma to znaczenia u osób zdrowych jednak mogłoby mieć wpływ na nosicieli mutacji w genach na chromosomie X.

Problem badawczy podjęty przez Doktorantkę skupia się wokół analiza zjawiska inaktywacji chromosomu X u osób zdrowych oraz nosicielek mutacji w genach obecnych na chromosomie X, osób młodych i starszych oraz poczętych naturalnie lub z pomocą zapłodnienia pozaustrojowego. Doktorantka postawiła sobie liczne cele: Przeprowadzenie oceny różnic we wzorach inaktywacji chromosomu X u zdrowych kobiet w trzech różnych tkankach z dwóch różnych listków zarodkowych, zbadanie i porównanie wzoru inaktywacji chromosomu X u zdrowych kobiet w trzech grupach wiekowych oraz u dziewczynek poczętych in vitro i naturalnie. Skorzystała również z tak specyficznego materiału jak krew pępowinowa oraz tkanki łożyska. Do badań nad wpływem inaktywacji u nosicieli mutacji wybrała natomiast grupę matek chłopców z chorobą Fabry'ego.

Uzyskane wyniki potwierdziły nielosową inaktywację chromosomu X jako zjawisko powszechne i nasilające się wraz z wiekiem (choć dotyczyło to wyłącznie komórek uzyskanych ze śliny badanych kobiet). Nie wykazano istotnych różnic we wzorze inaktywacji chromosomu X w tkankach dziewczynek

poczętych pozaustrojowo i naturalnie, co wskazuje, że jest mało prawdopodobne, aby techniki wspomaganego rozrodu zakłócały proces inaktywacji chromosomu X. Natomiast wśród nosicielek choroby Fabry'ego wykazała, że nielosowa inaktywacja chromosomu X nie jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za manifestację choroby u heterozygotycznych kobiet. Zaobserwowano, że kobiety nosicielki choroby Fabry'ego prezentowały zróżnicowaną intensywność ciężkości własnych objawów – od łagodnej do ciężkiej postaci choroby, natomiast ich kliniczna manifestacja nie korelowała z profilem inaktywacji chromosomu X.

Autorka szczegółowo przeanalizowała uzyskane wyniki wskazując na potencjalne przyczyny uzyskanych wyników. Jest to szczególnie ważne ze względu na pojawiające się w literaturze doniesienia, że dzieci poczęte in vitro mają większe ryzyko małych i większych defektów okołourodzeniowych, niskiej masy urodzeniowej i rzadkich chorób związanych z rodzicielskim piętnowaniem genomu. Mogłoby to sugerować, że techniki wspomaganego rozrodu mogą nieść ryzyko zmian epigenetycznych. Jednak wyniki badań Doktorantki nie potwierdzają takiej tezy co może uspokajać zarówno rodziców dzieci jak i zespoły medyczne leczące pary z zaburzeniami płodności.

Również w pracy, w której Doktorantka przyjrzała się nosicielkom mutacji w genie GLA (Xq22.1) wykazała, że kliniczna manifestacja choroby Fabry'ego nie korelowała z profilem inaktywacji chromosomu X. Dlatego to nie w nielosowej inaktywacji chromosomu X należy poszukiwać przyczyny tak heterogennej manifestacji klinicznej choroby.

Praca przeglądowa uzupełniająca oceniany dorobek Doktorantki to swoiste kompendium najnowszej wiedzy na temat wybranych chorób sprzężonych z chromosomem X oraz wpływu zjawiska inaktywacji chromosomu X na pojawienie się objawów choroby u kobiet nosicielek chorobotwórczej mutacji. Doktorantka wybrała 10 genów zlokalizowanych na chromosomie X, których patogenne mutacje powodują 11 najczęściej pojawiających się zaburzeń metabolicznych sprzężonych z chromosomem X, zarówno u mężczyzn jak i u kobiet - choroba spichrzeniowa glikogenu typ IXa, niedobór dehydrogenazy pirogronianu, niedobór transkarbamylazy ornityny, niedokrwistość syderoblastyczna sprzężona z chromosomem X, protoporfiria, Zespół Menkesa, choroba Fabry'ego, choroba Danona, mukopolisacharydoza typu II (choroba Huntera), adrenoleukodystrofia oraz niedobór dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. Jest to pierwsza tak obszerna praca przedstawiająca wpływ zjawiska inaktywacji chromosomu X na pojawienie się objawów choroby u kobiet nosicielek chorobotwórczej mutacji.

### Uwagi krytyczne.

Mimo wielu wymienionych zalet pracy, recenzentowi udało się znaleźć nieznaczące błędy i niedociągnięcia.

Tytuł pracy nie do końca odpowiada prezentowanym pracom – bo czy można osoby z zaburzeniami płodności zaliczyć do osób z zaburzeniami metabolizmu lub do osób zdrowych?

Cele pracy zostały przedstawione szeroko i odważnie. Czy jednak pojęcie – dziewczynki poczęte in vitro nie jest zbyt szerokim uogólnieniem? Czy były to dzieci poczęte poprzez klasyczne zapłodnienie pozaustrojowe czy też w sposób zdecydowanie bardziej inwazyjny? Jak dokonano doboru plemników do zapłodnienia pozaustrojowego i czy na pewno homogenicznie w całej badanej grupie?

W Metodocy badań warto wspomnieć, że z badanej grupy 227 naturalnie poczętych kobiet jedynie w 124 przypadkach posiadano pełen zestaw materiału do porównań, a w grupie dzieci uzyskanych z pomocą zapłodnienia pozaustrojowego oraz grupy kontrolnej naturalnie poczętych, pełną analizę można było przeprowadzić nie na 75 badanych a jedynie na 26 zestawach.

Wnioski, choć poprawne, wydają się być sformułowane dość lakonicznie i nie oddają w pełni osiągnięć prezentowanych badań. Wniosek pierwszy jest raczej potwierdzeniem danych literaturowych. Drugi wniosek wydaje się być zbyt odważny. Żeby móc potwierdzić zmiany wzoru inaktywacji chromosomu X wraz z wiekiem należałoby skorzystać również z materiału od ludzi starych lub wydzielić taką grupę wśród badanych. Tymczasem najstarsza grupa badana (72 pacjentki) była w wieku 36-84 lata (średnia niecałe 48 lat). Za granicę starości uznaje się obecnie 65 rok życia, więc prawdopodobnie badano jedynie kilka – kilkanaście kobiet w tej ważnej do wysnucia takiego wniosku grupie wiekowej. Wniosek 3 jest wynikiem badania i bardzo chciałbym wiedzieć jakie wnioski można z tego wyniku wyciągnąć. Dlaczego akurat komórki ze śliny podlegają wzrostowi nielosowości inaktywacji chromosomu X wraz z wiekiem? Wniosek 4 nie spełnia reguł przyczynowo skutkowych. To że w obu grupach (badanej i kontrolnej) było mniej niż 3% skrajnie nielosowych XCI ( $\geq 90:10$ ) w żaden sposób nie wyjaśnia małego prawdopodobieństwa wpływu technik zapłodnienia pozaustrojowego na proces inaktywacji chromosomu X. A te 3% pewnie nazwałbym pojedynczym przypadkiem. Wniosek 5 podjęto na podstawie badań bardzo wyjątkowego materiału jakim jest łożysko a uogólniono na wszystkie tkanki pozazarodkowe. Łožysko jest akurat bardzo specyficzną strukturą, w której nawet aneuploidie występują dość powszechnie i chaotycznie. Również bardzo interesowałby mnie wniosek z wyników

umieszczonych we wniosku 6 – dlaczego akurat te cztery geny (CD44, KDM6A, PHLDA2 i ZRSR2) wykazują w łożysku z nielosową XCI (>80:20) znacznie podwyższony poziom ekspresji?

Ocena końcowa.

Zaprezentowany w pracy doktorskiej cykl artykułów naukowych jest oryginalny, kompleksowy i spójny tematycznie. Doktorantka prawidłowo zaplanowała cykl badawczy oraz skutecznie zweryfikowała postawioną hipotezę badawczą.

Podsumowując opinię stwierdzam, że Doktorantka doskonale wywiązała się ze wszystkich tak licznie postawionych sobie w celach zadań. Uzyskała wartościowe i nowatorskie wyniki, które wnoszą istotny wkład w wyjaśnienie nielosowej inaktywacji chromosomu X. Prace te już znalazły uznanie w międzynarodowym środowisku naukowym – wg Google Scholar praca z 2018 roku była cytowana 47 razy, a praca z 2021 roku 6.

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszelkie wymagania określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 roku, poz.1789) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 roku, poz. 1669). W związku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie mgr Patrycji Juchniewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Punkt oddzielny.

Wnioskuje jednocześnie o wyróżnienie pracy w uznaniu wiedzy i ogromnego wysiłku Doktorantki, jej wkładu w rozwój badań nad nielosową inaktywacją chromosomu X, który już został zauważony przez międzynarodowe środowisko naukowe i doceniony wielokrotnymi cytowaniami Jej publikacji.

Z poważaniem,



Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Łukaszuk