

POLSKA AKADEMIA NAUK

prof. dr hab. med. Andrzej Kocharński  
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk  
ul. A. Pawińskiego 5  
02-106 Warszawa  
e-mail: [akocharnski@imdik.pan.pl](mailto:akocharnski@imdik.pan.pl)  
tel. (22) 608 65 26

Warszawa, dnia 7 września 2022 r.

***Recenzja Rozprawy doktorskiej mgr Marty Marleny Ziętek pt. " Wpływ interakcji czynników matczynych i genetycznych na rozwój i zachowania potomstwa w mysich modelach autyzmu"***  
wykonanej na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Inż. Artura H. Świergiela i dr Silvestre Sampino

Podstawę formalno-prawną opracowania recenzji rozprawy doktorskiej stanowi pismo Zastępcy Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego Pani dr hab. Joanny N. Izdebskiej, prof. UG z dnia 12 lipca 2022 r.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr Marty Marleny Ziętek dotyczy niezwykle istotnego we współczesnej medycynie i biologii pytania o udział czynników środowiskowych (głównie matczynych) i genetycznych w etiopatogenezie autyzmu. Autyzm jest schorzeniem coraz wcześniej rozpoznawanym u dzieci, stwarzającym szereg bardzo trudnych problemów natury diagnostycznej o trudnościach terapeutycznych nie wspominając. Ograniczając się wyłącznie do diagnostyki molekularnej zaburzeń autystycznych zaledwie w znikomym odsetku możliwe jest ustalenie przyczyny choroby pomimo wdrożenia do diagnostyki badań typu sekwencjonowania nowej generacji (NGS - ang. next generation sequencing). Trudno odpowiedzieć dziś na pytanie, czy niewielka wykrywalność mutacji sprawczych (patogennych) w zaburzeniach autystycznych wynika z nieznamości genów biorących udział w patogenezie autyzmu, czy też z obecności innych przyczyn zaburzeń autystycznych takich jak zaburzenia strukturalne w obrębie genomu, zaburzenia epigenetyczne czy też negatywny wpływ środowiska (np. czynniki toksyczne). Trudno również dziś odpowiedzieć na pytanie o możliwość znaczenia poligenowego sposobu dziedziczenia zaburzeń ze spektrum autyzmu. Nie można bowiem wykluczyć, że na końcowy efekt kliniczny składa się suma oddziaływań genetycznych pojedynczych polimorfizmów genetycznych. Zgodnie z tą koncepcją osiągnięcie przez system biologiczny pewnego

pragu mutacji o słabym działaniu prowadzi do destabilizacji systemu, który traci możliwość „buforowania” negatywnych oddziaływań środowiska oraz innych genów.

O ile badanie podłoża genetycznego wielu chorób genetycznie uwarunkowanych jest obecnie w pewnym stopniu możliwe dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod wielkoskalowej oceny genomu, analiza wpływu środowiska należy już do zadań ekstremalnie trudnych. Ogromnym wyzwaniem badawczym jest biologiczne modelowanie zaburzeń autystycznych. Nawet w przypadku modelowania chorób neurodegeneracyjnych ze specyficzną charakterystyką morfologiczną (choroba Alzheimera, leukodystrofie) uzyskanie adekwatnego modelu choroby jest trudne. W sytuacji „przejścia” od zaburzeń organicznych do zaburzeń psychiatrycznych modelowanie choroby jest jeszcze trudniejsze niż w przypadku chorób neurodegeneracyjnych ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego.

W tym miejscu należy już pogratulować Autorce podjęcia się aż tak trudnego zadania badawczego. Jednocześnie trzeba jeszcze raz zaznaczyć, że podjęty przez Autorkę problem badawczy znajduje bardzo konkretne przełożenie na praktykę kliniczną (systematycznie rosnąca liczba dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu oraz zwiększający się wiek kobiet podejmujących decyzje prokreacyjne). Nie bez znaczenia jest również podjęcie tego problemu w kontekście narastającego na świecie zjawiska surogacji (oddziaływania środowisko- matczyne z genomem i epigenomem płodu).

Autorka w pracy (str. 20) przedstawia ciekawy i bardzo czytelny schemat obrazujący interakcję czynników środowiskowych i genetycznych w etiologii autyzmu. Wydaje się jednak, że zamiast zaprezentowanej interakcji „gen- środowisko” Autorka powinna odnieść się raczej do interakcji „genom- środowisko”, zważywszy, że geny stanowią zaledwie bardzo niewielką część genomu. W tym miejscu pragnę zauważyć, że Autorka zbyt swobodnie i czasami nieprecyzyjnie posługuje się terminologią genetyczną. W pracy można znaleźć dość niejednoznaczne stwierdzenia. Pewnym problemem utrudniającym lekturę pracy jest jednoczesne użycie różnej pisowni angielskich wyrazów (*analysed* i *analyzed*).

Dla przykładu na str. 17-tej Autorka o mysich homologach ludzkiego genu *SHANK3*, po czym odnosi się do delecji w pojedynczym mysim homology *Shank3*. Czy chodziło zatem o różne mutacje tego samego genu czy o różne geny homologiczne? W pracy Autorka czasami operuje nieprecyzyjną terminologią genetyczną. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że takie pojęcia genetyczne jak *linkage* (sprzężenie genetyczne) czy asocjacja są bardzo dobrze zdefiniowane i nie należy stosować ich zamiennie.

Niewątpliwie walorem pracy jest znakomita koncepcja eksperymentów, która pozwala na odpowiedź na pytanie o udział czynnika genetycznego i środowiskowego w etiologii autyzmu. Autorka przedstawia zalety modelu zwierzęcego zaburzeń autystycznych, jednakże w pracy zabrakło omówienia trudności związanych z próbą modelowania zaburzeń ze spektrum autyzmu. Autorka w jednym z rozdziałów omawia różne modele mysie zaburzeń ze spektrum autyzmu, ale czytelnik pracy nie do końca rozumie czym podyktowany był wybór myszy BTBR. Obecnie w modelowaniu chorób neurodegeneracyjnych wiodącą rolę odgrywają zwierzęta transgeniczne, u których precyzyjnie określono deficyt genetyczny. Pojawia się zatem pytanie o kryterium wyboru modelu zwierzęcego autyzmu o nieznannej etiologii.

Szkoda, że Autorka dość oszczędnie potraktowała kwestię kryteriów doboru takich a nie innych testów behawioralnych, co jest istotne dla całości koncepcji pracy. W przedstawionej do oceny pracy Autorka również nie odniosła się do kolejności (sekwencji) zastosowanych testów behawioralnych. Wiadomo, że każdy z eksperymentów behawioralnych pozostawia pewien „ślad” w pamięci zwierzęcia. Dochodzi do zjawiska adaptacji, stąd każdy kolejny test wiąże się już z pewnym „zamazaniem” obrazu

Należy docenić trudny i wymagający „warsztat badawczy” pracy. Doświadczenia przeprowadzone przez Autorkę wymagają dużej biegłości i precyzji manualnej i należą do jednych z najtrudniejszych w biomedycynie. Część doświadczalna jest zatem niewątpliwym atutem pracy. Należy jednak zaznaczyć, że w opisie testów behawioralnych zabrakło precyzji (np. warunki, w których wykonywano doświadczenia takie jak wilgotność powietrza, oświetlenie, czystość powietrza, pora wykonania testów, czystość wody, etc.)

Dyskusja została przeprowadzona bardzo sprawnie, choć momentami sprawia wrażenie zbyt lakonicznej, co nie zmienia faktu, że zwięzłość tej pracy jest jej wielkim atutem.

Konstrukcja pracy jest bardzo przejrzysta. Zwraca uwagę przyporządkowanie bardzo dobrze zaplanowanych eksperymentów celom pracy. Eksperymenty zostały świetnie zaplanowane – posiadają znakomitą koncepcję. Dla genetyka szczególnie interesujące są wyniki trzeciego eksperymentu. Okazuje się, że czynnik genetyczny (embrionalny) ma jednak wiodące znaczenie w porównaniu z czynnikiem środowiskowym (czynnik matczyny). Jest to bardzo ważny i oryginalny wynik, który wskazuje na znaczenie czynnika genetycznego w etiopatogenezie zaburzeń autystycznych. Niezależnie od środowiska matczynego (myszy BTBR oraz myszy C57BL6) myszy z genotypem BTBR zawsze rozwijają zaburzenia autystyczne. Autorka wprawdzie przedstawia dość szczegółową charakterystykę myszy BTBR tak na poziomie behawioralnym jak i morfologicznym, jednak niezwykle interesujące jest tło genetyczne tych zaburzeń. Czy w literaturze fachowej można znaleźć dane dotyczące podłoża genetycznego zaburzeń ze spektrum autyzmu u myszy BTBR?

Ciekawą obserwacją są również wyniki dotyczące wpływu wieku matki na przebieg ciąży i rozwój potomstwa. To bardzo ważne, że dokonywano oceny takich parametrów jak ocena łożyska (dość często zaniedbywana) czy masa urodzeniowa, które należą do kluczowych biomarkerów rozwoju płodu i noworodka. Jest to bardzo istotne z uwagi na potencjał translacyjny tej pracy. W eksperymentach przeprowadzonych na modelu zwierzęcym zastosowano parametry powszechnie stosowane w neonatologii.

Największą siłą pracy jest niewątpliwie właściwy dobór eksperymentów, który pozwolił udzielić jednoznacznych odpowiedzi na bardzo istotne pytanie dotyczące udziału czynników środowiskowych i genetycznych w rozwoju zaburzeń autystycznych. Wprawdzie naturalnym ograniczeniem pracy jest zawężenie środowiska do czynnika matczynego (choć jest to najistotniejszy element środowiska) na tym etapie rozwoju; brak znajomości pełnego tła genetycznego (homogenność genetyczna myszy BTBR?) czy zawężenie szerokiego spektrum zaburzeń autystycznych do trzech parametrów obserwowanych w testach behawioralnych, to jednak w sytuacji koniecznej dla przeprowadzenia eksperymentu- redukcji liczby analizowanych parametrów wybór badanych cech jest w pełni uzasadniony.

W ostatnim wniosku dotyczącym fenotypu behawioralnego myszy BTBR Autorka zaznacza wiodący udział czynników embrionalnych prawdopodobnie genetycznych. Nie można jednak wykluczyć udziału czynnika epigenetycznego związanego na przykład z manipulacjami zarodkami w czasie eksperymentów. Choć nie było to przedmiotem przedstawionej do oceny pracy w literaturze fachowej istnieje wiele dowodów na udział czynnika epigenetycznego w zaburzeniach rozwoju zarodka i łożyska.

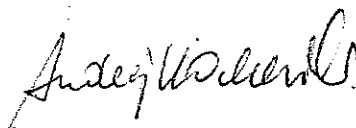
#### **Ocena końcowa**

Praca jest przykładem jednak nieczęsto spotykanych rozpraw z zakresu biologii charakteryzujących się przejrzystą konstrukcją, świetną koncepcją przeprowadzonych eksperymentów i dobrym „warsztatem eksperymentalnym”. W mojej ocenie słabszą stroną pracy jest warstwa językowa, a szczególnie dość swobodnie potraktowana nomenklatura genetyczna.

Nie są to jednak mankamenty, które mogłyby znacząco istotnie obniżyć wartość tej pracy - znakomitej w warstwie koncepcyjnej i doświadczalnej (postawienie problemu, zaplanowanie i przeprowadzenie trudnych technicznie eksperymentów).

Stwierdzam, że praca spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późn. zm.), w zw. z art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.).

Składam zatem wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Marty Marleny Ziętek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. med. Andrzej Kochański