



**WYDZIAŁ BIOLOGII  
i OCHRONY  
ŚRODOWISKA**  
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 2022 – 09 – 09

**Dr hab. Marek Wieczorek, prof. UŁ**  
**Katedra Neurobiologii**  
**Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska**  
**Uniwersytetu Łódzkiego**

Ocena Rozprawy Doktorskiej  
**MGR MARTY MARLENY ZIĘTEK**

pod tytułem

***Wpływ interakcji czynników matczynych i genetycznych na rozwój i zachowania potomstwa  
w mysich modelach autyzmu***

***Influence of interaction of maternal and genetic factors on offspring development and behaviour  
in mouse models of autism***

wykonanej pod kierunkiem prof. dr. hab. inż. Artura H. Świergiela z Katedry Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego oraz promotora pomocniczego dr. Silvestre Sampino z Zakładu Embriologii Doświadczalnej, Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu

Podstawa oceny:

Pismo Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego z dnia 12 lipca 2022 roku.

Przedstawiona do oceny dysertacja doktorska jest obszernym, typowym manuskryptem naukowej pracy eksperymentalnej, przygotowanym w języku angielskim, zawierającym się na 91 stronach maszynopisu. Rozprawa doktorska, napisana w układzie klasycznym dla tego typu prac, przy zachowaniu właściwych między nimi proporcji, składa się z następujących części:

- streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykazu używanych skrótów, łącznie trzy strony,
- wstępu i celu pracy, które zajmują osiemnaście stron,
- opis zastosowanych metod badawczych, Autorka umieściła na siedemnastu stronach,
- rozdział, w którym Pani mgr Ziętek omawia wyniki jest najbardziej obszerny i przedstawiony został na dwudziestu czterech stronach,
- dyskusja, wraz z wnioskami, mieści się na jedenastu stronach,
- imponująca, zawierająca 197 pozycji, bibliografia zajmuje szesnaście stron. W tym miejscu chcę podkreślić, że Doktorantka powołuje się na najnowszą literaturę naukową, ale nie zapomniała również o klasycznej publikacji Kanner z 1943 roku,
- suplement, w którym Pani mgr Ziętek umieściła jedną rycinę oraz wyniki analizy wariancji obejmuje dwie strony manuskryptu.

Rozprawę podzielono na rozdziały główne, w których Pani mgr Marta Ziętek wyróżnia szereg podrozdziałów, w których szczegółowo omówiła zagadnienia związane z głównym problemem prowadzonych badań. Całość ocenianej pracy Autorka ilustruje 30 rycinami i 5 tabelami, włączając dane przedstawione w suplemencie. W mojej ocenie, przyjęta przez Doktorantkę forma oraz styl manuskryptu stanowi logiczny ciąg myślowy. Pani mgr Ziętek, w sposób przemyślany wprowadza czytelnika w problematykę zaburzeń ze spektrum autyzmu (ASD), wyjaśnia naturę tego typu zaburzeń, podaje ich symptomy oraz zwraca uwagę czytelnika na częstość występowania tych zaburzeń.

Ciekawym i wartym polecenia rozwiązaniem jest włączenie do poszczególnych części manuskryptu dobrze dobranych rycin i schematów. Pozwalają one czytelnikowi na bieżąco analizować informacje, które Autorka przedstawia w kolejnych rozdziałach i podrozdziałach przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej. Wysoko oceniam, znajdujące się na początku dysertacji streszczenie, w którym Autorka zapoznaje czytelnika z problemem badawczym, celem pracy, uzyskanymi wynikami oraz ich podsumowaniem. Zabrakło natomiast informacji o źródłach finansowania doświadczeń, których wyniki złożyły się na przedstawioną pracę doktorską.

### **Ocena szczegółowa rozprawy doktorskiej**

#### **Temat i cel pracy doktorskiej**

Autorka, w podjętych badaniach, postanowiła sprawdzić czy istnieje związek, a jeśli tak to jakie jest jego podłoże, pomiędzy czynnikami genetycznymi i środowiskowymi, które mogą prowadzić do wystąpienia zaburzeń ze spektrum autyzmu. Wybór problematyki badawczej oceniam bardzo wysoko i jestem pełen szacunku dla decyzji Pani mgr Ziętek, która postanowiła zmierzyć się z tak niezwykle trudnym zadaniem naukowym. Z drugiej strony, biorąc pod uwagę laboratorium oraz osobę Nauczyciela, Pana Profesora Artura H. Świergiela, jak również osobę promotora pomocniczego, Pana Doktora Silvestre Sampino, taka decyzja nie dziwi. Etiologia zaburzeń ze spektrum autyzmu, mimo dziesięcioleci intensywnych badań, prowadzonych w tysiącach ośrodków na świecie, wciąż pozostaje nie wyjaśniona, co często skutkuje formułowaniem nieuprawnionych naukowo wniosków i prób wyjaśnienia ich źródła. Na tym tle, zarówno hipoteza ogólna jak również szczegółowe cele badawcze, które realizowała Doktorantka, moim zdaniem zostały wybrane i zaprezentowane prawidłowo. Tytuł pracy doktorskiej, jest poprawny i odpowiada treściom, które się w niej znajdują.

#### **Część teoretyczna pracy, *Wstęp***

Ta część pracy doktorskiej mgr Marty Ziętek, stanowi merytoryczne i wyczerpujące opracowanie naukowe problematyki zaburzeń ze spektrum autyzmu. Autorka, na podstawie danych z piśmiennictwa podaje, że ASD występuje u 1 na 100 dzieci w populacji światowej, oraz odpowiednio u 1 na 54 dzieci w USA, 1 na 66 dzieci w Europie. Niestety, jak napisała Doktorantka nie ma rzetelnych danych dotyczących tych zaburzeń u dzieci polskich, choć dysponujemy danymi fragmentarycznymi dotyczącymi Pomorza, gdzie rejestruje się 1 przypadek ASD na 285 dzieci. Pani mgr Ziętek zwróciła również uwagę, że zaburzenia ze spektrum autyzmu częściej występują

u chłopców, 1 na 42, niż u dziewcząt, 1 na 189. Pragnę w tym miejscu podkreślić, że Autorka w sposób ciekawy dla odbiorcy przedstawiła charakterystykę ASD. Z każdą, przeczytaną stroną wstępu, czytelnik zyskuje kolejne, ważne informacje, które dotyczą zarówno zaburzeń neurorozwojowych, obserwowanych w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) osób dotkniętych ASD, ale również zmian w ich zachowaniu socjalnym i komunikacyjnym. Pani mgr Ziętek, na podstawie danych z piśmiennictwa, dokonała próby zlokalizowania anatomicznego podłoża wspomnianych zmian i przypisania ich do poszczególnych, wymienianych w literaturze przedmiotu, obszarów OUN. Wartość tych informacji podnosi zamieszczony przez Autorkę odpowiedni schemat, który pozwala czytelnikowi na bieżącą analizę informacji opisanych w tej części manuskryptu. W tym miejscu muszę jednak zwrócić Autorce uwagę, że schemat przedstawiony na ryc. 1.1 jest słabej jakości. Być może wynika to z kopiowania lub wydruku pracy.

Kolejny podrozdział wstępu dotyczy odpowiednio diagnozowania, rozpoznawania i prób leczenia ASD. Już w tym miejscu ocenianego manuskryptu, Autorka postarała się wprowadzić czytelnika w główną problematykę realizowanych przez Nią badań, zwracając uwagę choćby na próby terapii tych zaburzeń poprzez oddziaływania na poziomie DNA. Do tej części wstępu nie mam zastrzeżeń.

Fascynującym jest podrozdział 1.2, zatytułowany *Autism Spectrum Disorders – etiology and risk factors*. Pani mgr Marta Ziętek dokonała w nim przeglądu piśmiennictwa dotyczącego możliwych wpływów genetycznych, środowiskowych oraz powiązań, które mogą między nimi wpływać na ryzyko wystąpienia ASD u potomstwa. Autorka zwraca w nim uwagę czytelnika, że szereg czynników, które mogą doprowadzić do ujawnienia się ASD, oddziałuje na rozwijający się płód już na etapie ciąży, co wskazuje na prenatalne pochodzenie ASD. Zaznacza, że szereg badań, które są prowadzone w laboratoriach światowych, odnosi się do próby zrozumienia gdzie i kiedy następuje ekspresja genów, których mutacje związane są z autyzmem ma miejsce już w mózgu płodowym, co determinuje jego późniejszy rozwój. Doktorantka w sposób przemyślany i krytyczny przedstawia dane z piśmiennictwa, które dotyczą potencjalnego genetycznego podłoża ASD i odnosi je następnie do czynników środowiskowych, wpływających na występowanie zaburzeń ze spektrum autyzmu.

Kolejne podrozdziały wstępu to przegląd danych uzyskanych w laboratoriach światowych, które są już bezpośrednio związane z wyborem problemu badawczego. Mam na myśli choćby wpływ wieku oraz tryb życia matki na zdrowie potomstwa. Zwraca tutaj uwagę odniesienie się Autorki do oddziaływania czynników stresogennych, różnego pochodzenia, na matkę i ich możliwy wpływ na rozwijający się płód.

W moim przekonaniu ta część ocenianej pracy jest czytelna i logiczna. Pani mgr Ziętek szczegółowo analizuje modele zwierzęce, które są współcześnie wykorzystywane w badaniach dotyczących zaburzeń ze spektrum autyzmu. W dalszej kolejności odnosi się do możliwych interakcji pomiędzy czynnikami genetycznymi i środowiskowymi w etiologii zaburzeń neurorozwojowych, w szczególności o charakterze ASD. W przekonujący sposób, naświetla czytelnikowi idee, które Nią kierowały przy wyborze problemu badawczego.

Mimo braku zastrzeżeń do strony merytorycznej tej części pracy, chciałbym zadać Doktorantce kilka pytań, które pojawiają się podczas lektury wstępu:

- czy znane są uwarunkowania środowiskowe, które mogą oddziaływać na rozwój mózgowia w okresie życia płodowego, prowadząc do późniejszego ujawnienia się ASD?,
- jakie grupy leków, które matka przyjmuje w okresie ciąży sprzyjają rozwojowi zaburzeń

ze spektrum autyzmu?,

- proszę również o rozwinięcie problemu potencjalnego wpływu chorób o podłożu infekcyjnym, występujących u matki w okresie ciąży, na możliwość wystąpienia ASD u potomstwa. Proszę jednocześnie, aby Doktorantka nawiązała w tym miejscu do roli bariery łożyskowej oraz rozwijających się barier mózgowych płodu.

### **Ocena zastosowanych procedur doświadczalnych – *Material i metody***

Dobór metod eksperymentalnych i analitycznych, które zastosowała Pani mgr Marta Ziętek do realizacji zadań badawczych nie budzi moich zastrzeżeń. Ponadto, dokładna analiza, zastosowanych w pracy nowoczesnych procedur i technik molekularnych, genetycznych jak też tych, stosowanych w badaniach behawioralnych, upoważnia mnie do stwierdzenia, że rezultaty uzyskane przez Autorkę są uprawnione i wiarygodne. Pragnę w tym miejscu pogratulować Pani mgr Ziętek, opracowania i wykorzystania, moim zdaniem, wyjątkowo pomysłowego modelu, polegającego na przenoszeniu rozwijających się zarodków między matkami, należącymi do poszczególnych grup badawczych. Ta część pracy jest również ilustrowana dobrze merytorycznie przygotowanymi schematami poszczególnych eksperymentów. Ułatwia to czytelnikowi analizę podejścia metodycznego, które Doktorantka zastosowała w swoich doświadczeniach.

Chciałbym w tym miejscu przedstawić Doktorantce uwagę i zadać pytania, związane z tą częścią pracy:

- czy istnieje, a jeśli tak to jakie niebezpieczeństwo, że sama procedura przenoszenia zarodków pomiędzy matkami mogła wpływać na jakość i przeżywalność płodów?,
- w pełni szanuję prawo Doktorantki do wyboru metod doświadczalnych, które są prawidłowe, jednakże chciałbym zapytać jakie były przesłanki zastosowania progesteronu do synchronizacji cyklu menstruacyjnego, a nie na przykład umieszczenie klatki z samcem w pomieszczeniu samic?,
- zwracam również uwagę, że nie umieszczono informacji o wersji i producencie programu Statistica.

### **Ocena uzyskanych wyników**

Ta część ocenianej pracy została przedstawiona w sposób czytelny i przystępny. Autorka bogato ją ilustruje odpowiednimi wykresami oraz tabelami przedstawiającymi uzyskane dane doświadczalne. W pierwszej kolejności Pani mgr Ziętek, charakteryzuje i przedstawia czytelnikowi wpływ wieku matek na reprodukcję w określonym czasie po kopulacji. Szczegółowo odnosi się do zależności pomiędzy różnymi wskaźnikami rozwojowymi, związanymi z ciążą oraz wiekiem matek i uzyskanym potomstwem, w tym jego jakością. Następnie Autorka przedstawia różne parametry behawioralne, zarejestrowane zarówno od potomstwa urodzonego przez matki „młode” jak i „stare” oraz ze szczepu C57BL6 i „autystycznego” BTBR. Wyniki, które uzyskała Autorka oraz logiczny ciąg ich prezentacji nie budzą moich zastrzeżeń. Pani mgr Ziętek stwierdziła, że:

- wiek matek wpływa na ich reprodukcyjność, zarówno w przypadku szczepu C57BL6 i „autystycznego” BTBR,
- wpływ zaawansowanego wieku matki na zachowanie autystyczne potomstwa był zależny od linii hodowlanej oraz zależał od płci potomstwa,

- przeniesienie zarodków uzyskanych od starych matek do młodych sprzyjało ich przeżywaniu, czego nie zaobserwowano przy odwrotnym transferze zarodków,
- potomstwo poczęte przez starsze biologicznie matki wykazywało wyższe wskaźniki wokalizacji ultradźwiękowej i lepsze umiejętności uczenia się, mimo że w okresie prenatalnym i postnatalnym podlegało opiece młodych samic,
- rozwój zarodków BTBR u biorców C57BL6 i odwrotnie nie zmienił typowego fenotypu behawioralnego charakterystycznego dla każdego szczepu.

Podsumowując tę część pracy doktorskiej, chciałbym zasugerować Autorce nieco inny sposób przedstawienia uzyskanych danych. Myślę, że dla czytelnika więcej informacji wniosłoby zastosowanie mediany, kwartyli i rozstępu niż wartości średniej oraz SEM. Przy okazji informacja ostatnia znajduje się w odpowiednich tabelach z wynikami, ale nie znalazłem jej w opisie poszczególnych rycin. Zwracam również uwagę Autorce na jakość rycin, w tym wielkość czcionek.

### **Ocena Dyskusji oraz Wniosków końcowych**

Kończąc niniejszą recenzją pragnę podkreślić rangę i znaczenie rozdziału *Dyskusja*, który zdaniem recenzenta, został opracowany w sposób profesjonalny. Jego treść, podobnie do treści *Wstępu*, przedstawiono w oparciu o bardzo bogatą, najnowszą oraz adekwatną do badanego problemu literaturę światową. Pragnę zwrócić uwagę, że Pani mgr Ziętek w sposób dojrzały i odpowiedzialny konfrontuje uzyskane dane eksperymentalne ze wspomnianym piśmiennictwem. Więcej, co czasami się niestety zdarza w tego typu opracowaniach, treści zawarte w tej części pracy nie stanowią informacji i danych, na które Autorka powoływała się we *Wstępie*.

Moją uwagę zwracają szczególnie odpowiedzialne rozważania Doktorantki, które znalazłem w końcowej części tego rozdziału. Dotyczą one prób wyjaśnienia własnych danych eksperymentalnych, w świetle celu pracy oraz założonej hipotezy badawczej. Uważam, że Pani mgr Ziętek rozwiązała ten problem wyjątkowo dobrze, co świadczy o jej odpowiedzialnym podejściu do interpretacji wyników pracy badawczej. Nie zawsze uzyskujemy rezultaty, które pasują do „zakładanego obrazka”. Wielką sztuką w takiej sytuacji jest umiejętność ich interpretacji i wskazanie przyszłych kierunków badań, które pozwolą na wyjaśnienie „rodzących się” na podstawie uzyskanych wyników kolejnych pytań. W opinii recenzenta, Autorka ocenianej pracy poradziła sobie z tym problemem bardzo dobrze. Wnioski końcowe, które Autorka sformułowała w sposób niezwykle wyważony, odpowiadają celom pracy i uzyskanym danym eksperymentalnym.

### **Podsumowanie i wniosek końcowy**

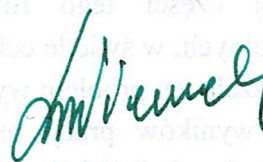
Przedłożona mi do oceny praca doktorska Pani mgr Marty Ziętek została napisana zwięzłym, zrozumiałym i poprawnym stylistycznie językiem angielskim. Drobne potknięcia edycyjne, które w żadnym razie nie umniejszają wartości całego manuskryptu, zaznaczyłem w egzemplarzu, który otrzymałem do recenzji. Mam nadzieję, że moje uwagi i sugestie, które przedstawiłem w recenzji, posłużą Doktorantce w jej przyszłej pracy oraz będą pomocne w przygotowaniu wartościowych publikacji Jej autorstwa. Chcę w tym miejscu raz jeszcze podkreślić złożoność problemu badawczego oraz ogromny nakład pracy podjęty przy próbie jego rozwiązania. Przedstawione i dyskutowane w pracy wyniki uznaję za wartościowe oraz inspirujące do prowadzenia dalszych badań, które

w przyszłości, mam nadzieję, zbliżą nas do zrozumienia natury zaburzeń ze spektrum autyzmu.

**Uważam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne, Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Marty Marleny Ziętek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

#### **Wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej**

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Marty Ziętek, w moim przekonaniu stanowi ważny wkład do badań nad mechanizmami zaburzeń ze spektrum autyzmu. Doktorantka realizując swoje badania zastosowała poprawne oraz wyjątkowo przemyślane podejście metodyczne dlatego uważam, że uzyskane przez Nią wyniki mogą mieć znaczenie aplikacyjne. Badania zrealizowane przez Panią mgr Martę Ziętek mają charakter innowacyjny i zapewne zostaną opublikowane w wiodących czasopismach naukowych. Pragnę również podkreślić, że Doktorantka posiada już publikacje w czasopismach z listy JCR, które są związane z przedmiotem Jej Badań. **Zwracam uwagę na ogromny nakład pracy, jaki wykonała Pani mgr Ziętek, zarówno w czasie prowadzenia badań jak też przygotowania manuskryptu pracy doktorskiej, dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o stosowne wyróżnienie ocenianej rozprawy.**



Dr hab. Marek Wiczorek, prof. UŁ