

Prof. dr hab. Dorota Tomaszewska-Zaremba
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt
im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk
05-110 Jabłonna

Jabłonna 18.10.2024

OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr Wiesławy Florek

pt. „Maternal immune activation and its consequences on offspring behavior in an ovine model of prenatal infection” (Aktywacja układu immunologicznego matki i jej wpływ na zachowanie potomstwa w owczym modelu infekcji prenatalnej)

Przedstawiona do oceny praca podejmuje ważne zagadnienie jakim jest wpływ aktywacji układu immunologicznego matki w okresie prenatalnym, wywołany takimi czynnikami jak infekcje, na wystąpienie zaburzeń neurorozwojowych u potomstwa. Recenzowana rozprawa skupia się na badaniu wpływu aktywacji układu immunologicznego matki poprzez podanie endotoksyny bakteryjnej na zachowanie potomstwa wykorzystując niekonwencjonalny model zwierzęcy jakim jest owca (*Ovis aries*). Wykorzystanie modelu owcy do badań nad zaburzeniami neurorozwojowymi wzbudza dużo mniej wątpliwości na tle etycznym i jest mniej wymagające finansowo niż badania z wykorzystaniem ssaków z rzędu naczelnych. Z kolei badania na gryzoniach, które były do tej pory najczęściej stosowanym modelem zwierzęcym w tego typu badaniach mają wiele ograniczeń zmniejszających ich wartość translacyjną w zakresie przyszłych zastosowań klinicznych ze względu na różnice gatunkowe.

Autorka przedstawionej do recenzji pracy podjęła się zadania mającego na celu zweryfikowanie hipotezy badawczej zakładającej, że iniekcja endotoksyny bakteryjnej – lipopolisacharydu (LPS) podawana ciężarnym owcom prowadzi do występowania u potomstwa zaburzeń behawioralnych charakterystycznych dla zaburzeń ze spektrum autyzmu takich jak deficyty społeczne, zachowania perseweracyjne i zaburzenia komunikacji.

Praca stanowi opracowanie w języku angielskim liczące 130 stron, zawierające 5 tabel i 40 rysunków oraz 339 pozycji piśmiennictwa. Rozprawa napisana została zgodnie z ogólnie obowiązującym schematem opracowania rozpraw naukowych i zawiera następujące rozdziały: wstęp (18 stron), hipotezy (1 strona), cel pracy (1 strona), materiał i metody (22 strony), wyniki (31 stron), dyskusja (14 stron), wnioski (1 strona), piśmiennictwo obejmujące 339 pozycji (30 stron). Praca zawiera także objaśnienia skrótów, spisy treści oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

We wstępie Autorka zapoznała nas z dotychczasowym stanem wiedzy na temat wpływu problemów zdrowotnych matki w okresie prenatalnym na wystąpienie zaburzeń neurorozwojowych u potomstwa ze szczególnym uwzględnieniem zaburzeń ze spektrum autyzmu. W rozdziale tym omówiono różne zaburzenia neurorozwojowe i ich występowanie na świecie jak również w Polsce. Szczegółowo zostały omówione wybrane problemy związane ze spektrum autyzmu. Szeroko omówione zostały również zwierzęce modele stosowane w badaniach zaburzeń neurorozwojowych wraz z podaniem charakterystyki tych zaburzeń. Osobny podrozdział został poświęcony interakcji pomiędzy układem immunologicznym a zaburzeniami w Centralnym Układzie Nerwowym (CUM). W kolejnych podrozdziałach Wstępu został poruszony problem aktywacji układu immunologicznego matki i jego wpływu na zdrowie psychiczne potomstwa, jak również opisano modele zwierzęce stosowane w tego typu badaniach. Ostatni podrozdział Wstępu dotyczy alternatywnych modeli zwierzęcych do obecnie stosowanych jakimi są badania na gryzoniach i naczelnych. W ostatnich latach coraz częściej podkreśla się potrzebę prowadzenia badań na innych niż gryzoni modelach badawczych. I tak np. owce reprezentują powszechnie uznany model zwierzęcy, odpowiedni do badania regulacji procesów neuroendokrynych. Tego typu badania, wykorzystujące model owiec, prowadzone są w takich instytucjach naukowych jak Unite Mixte de Recherché – Physiologie de la Reproduction ET des Comportements w Tours-Nouzilly, University of Cambridge, University of Auckland. Również zgodnie z zaleceniem Agencji ds. Żywności i Leków Departamentu Zdrowia i Opieki Społecznej Stanów Zjednoczonych wszystkie nowe leki, które mają zostać zastosowane w medycynie, przed

rozpoczęciem badań klinicznych muszą zostać przetestowane na alternatywnym modelu badawczym innym niż gryzonie, szczególnie jeśli dotyczy to badań nad układem immunologicznym. Podsumowując badania na modelu owcy nad wpływem aktywacji układu immunologicznego matki na zachowania potomstwa mogą wykazywać wyższą wartość translacyjną niż badania na gryzoniach a ponadto wzbudzać mniejsze wątpliwości natury etycznej w porównaniu do badań na ssakach z rzędu naczelnych.

W przedstawionej do recenzji rozprawie autorka postawiła sobie następujące hipotezy badawcze do zweryfikowania:

Główna hipoteza badawcza: endotoksyna bakteryjna (lipopolisacharyd - LPS) podawana ciężarnym owcom prowadzi do występowania u potomstwa zaburzeń behawioralnych charakterystycznych dla zaburzeń ze spektrum autyzmu (deficyty społeczne, zachowania perseweracyjne i zaburzenia komunikacji).

Przedstawiona praca zakłada dwie szczegółowe hipotezy badawcze:

1. Aktywacja układu immunologicznego matki w różnych okresach życia prenatalnego może mieć różny wpływ na późniejszy rozwój fenotypu behawioralnego u potomstwa;
2. Intensywność odpowiedzi immunologicznej matki na iniekcję LPS może być powiązana z nasileniem zaburzeń zachowania u potomstwa.

W rozdziale „Cel Pracy” Autorka przedstawiła cel podjętych badań i wyszczególniła w 3 punktach zakres pracy:

1. zbadanie wpływu aktywacji układu immunologicznego ciężarnej owcy na zachowanie jagniąt;
2. zbadanie odpowiedzi układu immunologicznego owiec na podanie endotoksyny bakteryjnej - LPS;
3. analiza związku pomiędzy natężeniem reakcji układu immunologicznego matki a poziomem zmian behawioralnych u jagniąt.

Rozdział „Materiał i Metody” został opisany bardzo dokładnie, wyczerpująco i klarownie, w sposób zgodny z przyjętymi dla prac naukowych zasadami. W rozdziale tym podano podstawowe informacje o zwierzętach doświadczalnych, układzie doświadczeń i opisano stosowne metody badawcze. Do realizacji założonych badań doktorantka użyła przede wszystkim metod opartych na testach behawioralnych mających na celu ocenę zaburzeń w zachowaniach typowych dla pacjentów z zaburzeniami neurorozwojowymi: deficyty społeczne, zaburzenia uczenia się, pamięci i elastyczności poznawczej, a także występowanie zachowań powtarzalnych. W tym celu zastosowano test izolacji od matki, test

ominięcia przeszkody (V-detour test) oraz test labiryntu w kształcie litery T (T-maze test). Uzyskane materiały wideo analizowano programem Noldus EthoVision XT 11.5, które umożliwił rejestrację i analizę behawioru zwierząt. Poziom cytokin IL-6 i TNF- α oraz poziom kortyzolu w osoczu oznaczano metodą immunoenzymatyczną (ELISA). Otrzymane wyniki zostały poddane odpowiednim testom statystycznym.

W pracy uzyskano wiele oryginalnych i wartościowych wyników, które zostały przedstawione i opisane wyczerpująco w sposób jasny i precyzyjny. Na uwagę zasługuje niezwykle staranne przygotowanie wykresów przedstawiających wyniki poszczególnych doświadczeń. Stanowią one niezwykle bogaty materiał źródłowy, o niewątpliwie nowatorskim charakterze. Spośród uzyskanych wyników na szczególne podkreślenie zasługują:

1. Podanie LPS indukuje aktywację układu immunologicznego u ciężarnych owiec, prowadząc do wzrostu ekspresji cytokin zapalnych, szczególnie IL-6 i reakcji fizjologicznych charakterystycznych dla stanu chorobowego;
2. Jagnięta poddane aktywacji układu immunologicznego matki w okresie prenatalnym wykazywały zmiany w zachowaniu, wskazujące na zaburzenia procesu uczenia się, zapamiętywania oraz elastyczności poznawczej.
3. Wykazano korelację odpowiedzi układu immunologicznego matki na LPS, szczególnie w odniesieniu do poziomu IL-6 z nasileniem zaburzeń behawioralnych u potomstwa, obejmujących zaburzenia kontroli hamowania oraz występowanie zachowań perseweracyjnych.

Wyniki pracy Doktorantka omówiła na tle dotychczasowych danych w światowym piśmiennictwie. Dyskusja jest przeprowadzona w sposób dowodzący znajomości literatury, Autorka licznie cytuje najnowsze piśmiennictwo. Trzeba przyznać, że liczba cytowanych prac jest imponująca (339 pozycji) i dowodzi szerokiej wiedzy Autorki jak i syntetycznego myślenia. Mimo dużej liczby danych, pochodzących z własnych badań, dyskusja jest uporządkowana, dzięki podzieleniu jej na części poświęcone najważniejszym problemom związanym z tematem pracy. Autorka dyskutuje w niej:

1. Fizjologiczną i immunologiczną odpowiedź owiec na podanie LPS w czasie ciąży
2. Wpływ podania endotoksyny bakteryjnej owcom w czasie ciąży na zdrowie oraz masę ciała potomstwa
3. Wpływ immunologicznej aktywacji matki w czasie ciąży na zachowanie jagniąt
4. Związek pomiędzy odpowiedzią immunologiczną matki na podanie LPS a odpowiedzią behawioralną jagniąt badaną przy pomocy V-detour testu

5. Odpowiedź jagniąt na aktywację układu immunologicznego matki w czasie ciąży na stres izolacji
6. Omówienie analizy video przeprowadzonych testów

Pracę kończą Podsumowanie i poprawnie sformułowane Wnioski, które syntetycznie podsumowują uzyskane przez Doktorantkę wyniki. Uzyskane wyniki pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Testy behawioralne opracowane w ramach tej pracy skutecznie uwidaczniały subtelne zmiany zachowania jagniąt wywołane niskimi dawkami LPS podawanymi ciężarnym owcom. Uzyskane wyniki pozwalają zatem stwierdzić, że badanie to przyczyniło się do opracowania modelu behawioralnego zaburzeń u owiec, które można wykorzystać do modelowania objawów u ludzi.
2. MIA (Maternal Immune Activation) u ciężarnych owiec wywołuje jedynie subtelny wpływ na zachowanie potomstwa. Niemniej jednak włączenie większej liczby badanych zwierząt mogłoby prowadzić do uzyskania bardziej istotnego statystycznie wyniku.
3. Podawanie LPS ciężarnym owcom prowadzi do wystąpienia objawów chorobowych niezależnie od okresu ciąży. Iniekcja LPS prowadzi do zwiększonej ekspresji cytokin prozapalnych w osoczu u ciężarnych owiec.
4. Aktywacja układu immunologicznego ciężarnych owiec wpływała na określone zmiany w zachowaniu jagniąt wskazujące na zaburzenia procesu uczenia się, zapamiętywania oraz elastyczności poznawczej na które często cierpią osoby z zaburzeniami neurorozwojowymi.
5. Test omięcia przeszkody (V-detour test) jest dobrym narzędziem do badania zmian behawioralnych w zaburzeniach neurorozwojowych u jagniąt i może być przydatny do modelowania innych zaburzeń psychiczno-neurologicznych u owiec.
6. Oprogramowanie do automatycznego śledzenia wideo EthoVision® XT może zostać wdrożone do badania zachowań owiec, a także innych modeli zwierzęcych w celu skrócenia czasu analizy i poprawy odtwarzalności uzyskanych danych.
7. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na stworzenie podstaw nowego zwierzęcego modelu zaburzeń neurorozwojowych wykazującego potencjalnie wyższą wartość translacyjną niż gryzonie.

PYTANIA I UWAGI

Z obowiązku recenzenta, mimo iż generalnie pracę oceniam wysoko, muszę także wskazać na pewne uchybienia:

1. Moje uwagi dotyczą głównie opisu wyników, a właściwie rysunków. Doktorantka używa określenia „lamb” zarówno w stosunku do matek jak i jagniąt. Jest to bardzo mylące bo np. na Rys.16 w opisie możemy przeczytać, że jest to przedstawienie różnic temperatury w różnych punktach czasowych u „MIA lambs”. I to już zmusza czytelnika do zastanowienia się czy chodzi o owcę matkę czy potomstwo. Proponowałabym ograniczyć użycie pojęcia „lamb” tylko do jagniąt.
2. W niektórych opisach rysunków znalazłam błędy, np. w Rys. 16 zamiast T1 jest T2.a w opisie wyników do Rys.28 w ostatniej linijce zamiast ‘.... of the Isolation Test **with** having visual contact..... jest „..... **without**”.
3. Oznaczenia istotności literami jest czytelne dopiero po przeczytaniu opisu rysunku, a jednak wg wszelkich zasad statystyki już samo spojrzenie na rysunek powinno umożliwić stwierdzenia, które wyniki są istotne statystycznie.
4. Dlaczego wybrano do oznaczenia tylko Il-6 i TNF- α a nie oznaczano IL-1. Czy testy ELISA do oznaczania cytokin były przeznaczone dla owiec, czy były to testy bydłące.
5. Co kierowało Doktorantką przy wyborze tych konkretnych dni ciąży do przeprowadzenia aktywacji immunologicznej oraz konkretnych dni do przeprowadzenia testów behawioralnych.
6. Dlaczego kortyzol oznaczany był tylko w trzecim doświadczeniu.
7. Na jakiej podstawie zostały dobrane dawki LPS.
8. Dyskusja wydaje mi się nieco zbyt krótka w stosunku do bardzo obszernego wstępu. Uważam, że ze względu na powiązanie przeprowadzonych badań z zaburzeniami neurorozwojowymi więcej miejsca powinno być poświęcone opisowi interakcji pomiędzy CUN a układem immunologicznym. Również dodałabym akapit o różnicach w odpowiedzi układu immunologicznego ludzi i gryzoni co wyjaśniałoby m in. dlaczego model owcy mógłby być lepszy niż model szczura czy myszy do tego typu badań.
9. Doktorantka na podstawie uzyskanych wyników sformułowała poprawne wnioski. Uważam jednak, że praca powinna kończyć się jednym lub dwoma

wnioskami bardzo ogólnymi będącymi odpowiedzią na postawione hipotezy badawcze.

Podsumowując, stwierdzam z całym przekonaniem, że rozprawa doktorska mgr Wiesławy Florek jest pracą zawierającą liczne i ważne elementy nowatorskie, wnikliwie badane i dyskutowane. Autorka rozprawy wykonała w pełni postawione cele badawcze stosując właściwe metody. Z pewnością uzyskane wyniki mogą być opublikowane w czasopiśmie o dobrej renomie naukowej. W ocenianej pracy Doktorantka wykazała się dobrym opanowaniem warsztatu badawczego, pełnym zrozumieniem rozpatrywanego problemu i dobrą znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań.

WNIOSEK KOŃCOWY

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Wiesławy Florek pt. „Maternal immune activation and its consequences on offspring behavior in an ovine model of prenatal infection” (Aktywacja układu immunologicznego matki i jej wpływ na zachowanie potomstwa w owczym modelu infekcji prenatalnej) spełnia wszystkie wymagania stawiane przez ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z uwzględnieniem wprowadzonych zmian Dz. U. z 2022 r poz. 574 w zakresie nadawania stopni naukowych i mieści się w zakresie dziedziny nauk rolniczych, dyscyplinie zootechnika i rybactwo i na tej podstawie wnoszę do Wysokiej Rady Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie pani mgr Wiesławy Florek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Dorota Tomaszewska-Zaremba