

## OCENA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Kingi Gawlińskiej pt. "Influence of modified maternal diet on the phenotype of offspring: behavioral and molecular correlations" wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Edmunda Przegalińskiego oraz promotora pomocniczego dr hab. Michała Korostyńskiego w Zakładzie Farmakologii Uzależnień Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

Badania populacyjne wskazują w coraz większym stopniu na związek pomiędzy nadwagą lub otyłością matek i predyspozycją dzieci do rozwoju niekorzystnych skutków zdrowotnych, takich jak cukrzyca, otyłość i choroba wieńcowa. W ostatnich latach pojawiły się również doniesienia o wpływie „środowiska” matki na prawidłowy rozwój mózgu potomstwa. Dowody wskazują, że otyłość matek i związane z nią zaburzenia metaboliczne, zwiększa ryzyko zaburzeń neurorozwojowych u potomstwa, w tym zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi, zaburzeń ze spektrum autyzmu, lęku, depresji, schizofrenii lub też zaburzeń odżywiania. Problem wpływu nieprawidłowej diety i nadwagi/otyłości ciężarnych staje się coraz bardziej istotny ze względu na stale wzrastającą częstość występowania otyłości wśród kobiet w wieku rozrodczym. Powyższe obserwacje mają głównie charakter asocjacyjny. Ze względu na powolne pojawianie się zaburzeń neurorozwojowych u potomstwa oraz ograniczony dostęp do ludzkiego materiału tkankowego, określenie mechanizmów warunkujących kliniczną manifestację wpływu otyłości/nieprawidłowego stanu metabolicznego na występowanie zaburzeń neurorozwojowych jest w znacznym stopniu utrudnione. Stąd też w pełni uzasadnione jest podjęcie badań eksperymentalnych określających zmiany behawioralne i molekularne indukowane nieprawidłową dietą (w społeczeństwach krajów wysokorozwiniętych często będącą dietą wysokotłuszczową, w której 30-40% kalorii pochodzi z tłuszczów). Ustalenie molekularnego podłoża zaburzeń neurorozwojowych w warunkach eksperymentalnych oprócz aspektów poznawczych może zdefiniować również potencjalne cele interwencji terapeutycznej.

W oparciu o powyższe przesłanki Doktorantka sformułowała cele pracy doktorskiej, które obejmowały: 1. Szczegółową charakterystykę wpływu zmodyfikowanych rodzajów diety matki w okresie ciąży i laktacji na fenotyp młodego i dorosłego potomstwa obu płci ocenianego na poziomie behawioralnym, w kontekście zachowań podobnych do depresji, lękowych, pamięci oraz zaburzeń zachowania charakterystycznych dla ASD (zaburzeń interakcji społecznych i zachowań repetytywnych); 2. Poznanie roli zmodyfikowanej diety matki w okresie ciąży i laktacji w prawidłowym rozwoju mózgu potomstwa obu płci – analizowanej na



poziomie genomicznym i proteomicznym w wybranych strukturach mózgu ważnych w patogenezie depresji i ASD; 3. Określenie wpływu ekspozycji na wysokotłuszczowy pokarm matki w okresie ciąży i laktacji na funkcjonowanie mechanizmów epigenetycznych w mózgu młodego i dorosłego potomstwa obu płci – rola metylacji DNA oraz miRNA w zmianach molekularnych obserwowanych w mózgach potomstwa. O aktualności podjętej tematyki badawczej świadczy również fakt przyznania funduszy zewnętrznych na realizację niektórych zadań badawczych przez Narodowe Centrum Nauki (granty PRELUDIUM 2018/29/N/NZ7/02703 oraz OPUS (2016/21/B/NZ4/00203) oraz Fundację NUTRICIA (RG-1/2018). Realizacja powyższych zadań badawczych umożliwiła nie tylko publikację wyników w renomowanych czasopismach, ale również została doceniona przez kapituły przyznające nagrody: Stypendium Ministra Edukacji i Nauki dla wybitnych młodych naukowców, Stypendium Prezesa Polskiej Akademii Nauk, Stypendium doktoranckiego ETIUDA 8 Narodowego Centrum Nauki oraz Stypendium wyjazdowego na półroczny staż w ramach programu im. Iwanowskiej Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (European Molecular Biology Laboratory – EMBL, Rzym).

Praca jest napisana w sposób przejrzysty. Jej podstawę stanowi sześć artykułów opublikowanych w renomowanych czasopismach: 1. Maternal high-fat diet during pregnancy and lactation provokes depressive-like behavior and influences the irisin/brain-derived neurotrophic factor axis and inflammatory factors in male and female offspring in rats (K. Gawlińska, D. Gawliński, E. Przegaliński, M. Filip) *J Physiol Pharmacol* 2019;70: 407-417 (IF=3,011); 2. Maternal dietary patterns are associated with susceptibility to a depressive-like phenotype in rat offspring (K. Gawlińska, D. Gawliński, M. Korostyński, M. Borczyk, M. Frankowska, M. Piechota, M. Filip, E. Przegaliński) *Dev Cogn Neurosci* 2021; 47: 100879 (IF=6,464); 3. Maternal feeding patterns affect the offspring's brain: focus on serotonin 5-HT<sub>2C</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors (K. Gawlińska, D. Gawliński, M. Filip, E. Przegaliński) *Pharmacol Rep* 2021; 73: 1170–1178 (IF=3,024); 4. Alteration of the early development environment by maternal diet and the occurrence of autistic-like phenotypes in rat offspring (K. Gawlińska, D. Gawliński, E. Kowal-Wiśniewska, M. Jarmuż-Szymczak, M. Filip) *Int J Mol Sci* 2021; 22: 9662 (IF=5,923); 5. A maternal high-fat diet during early development provokes molecular changes related to autism spectrum disorder in the rat offspring brain (K. Gawlińska, D. Gawliński, M. Borczyk, M. Korostyński, E. Przegaliński, M. Filip) *Nutrients* 2021; 13: 3212 (IF=6,349); 6. Relationship of maternal high-fat diet during pregnancy and lactation to offspring health (K. Gawlińska, D. Gawliński, M. Filip, E. Przegaliński) *Nutr Rev* 2021; 79:709-725 (IF=7,110). Sumaryczny współczynnik oddziaływania powyższych publikacji wynosi 31,249 i znacznie przekracza wymagania stawiane w postępowaniu o nadania stopnia doktora. Poza cyklem publikacji przedstawiona do oceny rozprawa składa się z omówienia powyższych publikacji obejmującego następujące podrozdziały: wstęp, cele pracy,



dyskusja, wnioski jak również piśmiennictwo, oświadczenia współautorów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów. Na uwagę zasługuje fakt, że we wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, co wskazuje na jej wiodącą rolę w ich powstaniu i jednocześnie znajduje odzwierciedlenie w oświadczeniach pozostałych współautorów publikacji.

We wstępie, stanowiącym doskonałe wprowadzenie do omówienia cyklu publikacji, Doktorantka prezentuje aktualny stan wiedzy dotyczący rozwojowej koncepcji zdrowia i choroby z uwzględnieniem klinicznych i eksperymentalnych obserwacji wpływu diety matki na rozwój ośrodkowego układu nerwowego i zaburzeń behawioralnych i molekularnych potomstwa. Informacje zawarte w powyższym podrozdziale omówienia są podsumowaniem i rozwinięciem odpowiednich podrozdziałów ww. wymienionych opublikowanych artykułów oryginalnych i poglądowych.

Dla zrealizowania postawionych celów Autorka przeprowadziła szereg wzajemnie uzupełniających się badań behawioralnych oraz molekularnych umożliwiających zdefiniowanie wpływu zmodyfikowanych rodzajów diety matki w okresie ciąży i laktacji na fenotyp młodego i dorosłego potomstwa obu płci. Zakres przeprowadzonych testów behawioralnych obejmował: pomiar aktywności lokomotorycznej, test wymuszonego pływania, test preferencji sacharozy, test podniesionego labiryntu zerowego, test rozpoznawania nowego obiektu, test otwartego pola, test zakopywania kulek, ocena samopielęgnacji sierści oraz test interakcji socjalnych. Do ocenianych cech molekularnych w korze czołowej, hipokampie oraz korze przedczołowej należały: ocena ilościowa mRNA metodą sekwencjonowania nowej generacji, pomiar wybranych białek metodą immunofluorescencyjną oraz metodą immunoenzymatyczną, ocena stopnia globalnej metylacji DNA oraz metylacji DNA wybranych genów metodą pirosekwencjonowania oraz pomiar ekspresji miRNA metodą reakcji odwrotnej transkrypcji w czasie rzeczywistym. Należy stwierdzić, że badania zaplanowano adekwatnie do sformułowanych celów pracy. W czasie realizacji badań Doktorantka opanowała umiejętność przeprowadzania wielu testów behawioralnych i molekularnych, wzajemnie komplementarnych, umożliwiających szczegółową charakterystykę wpływu zmodyfikowanych rodzajów diety matki w okresie ciąży i laktacji na fenotyp młodego i dorosłego potomstwa obu płci. Umiejętność przeprowadzenia ww. badań oraz interpretacji uzyskanych wyników świadczą o bardzo dobrym merytorycznym przygotowaniu Doktorantki. W podsumowaniu tej części recenzji należy stwierdzić, że metodyka badania jest bardzo nowoczesna, plan badań dobrze skonstruowany, metody statystyczne prawidłowo dobrane.

Doktorantka wykazała m. in. 1. że potomstwo matek narażonych na dietę HFD charakteryzuje się wydłużonym czasem bezruchu w teście wymuszonego pływania w obu etapach życia a w badaniach



molekularnych obniżenie stężenia w surowicy i ilości białka iryzyny w hipokampie młodych samic w 28 dniu po urodzeniu oraz obniżeniem poziomu interleukiny-1 $\alpha$  w hipokampie w 28 i 63 dniu po urodzeniu; 2. HFD u ciężarnych wiąże się z zachowaniami podobnymi do depresji z towarzyszącymi im zmianami transkryptomicznymi; 3. zmodyfikowana dieta matki wywołuje zmiany adaptacyjne zależne od wieku i płci, głównie w receptorach 5-HT<sub>2C</sub>; 4. matczyna dieta wysokotłuszczowa wpływa na ekspresję genów związanych z ASD (*Cacna1d*, *Nlgn3*, *Shank1*) oraz białek (SHANK1 i TAOK2) w korze przedczołowej potomstwa płci męskiej w okresie dojrzewania oraz indukuje zmiany epigenetyczne: zwiększenie globalnej metylacji DNA w korze mózgowej i ekspresję miR-423 i miR-494 wraz ze zmianami behawioralnymi reprezentowanymi przez swoiste dla samców zaburzenia interakcji społecznych i wzrost powtarzalnych zachowań w okresie dojrzewania (które w większości nie były obserwowane w starszym wieku); 5. HFD u matek znacząco zmienia ekspresję 48 genów związanych z ASD w korze czołowej potomstwa płci męskiej oraz prowadzi do zależnych od płci i wieku zmian ilościowych białek ANKRD11, EIF4E, NF1, SETD1B, SHANK1 i TAOK2, a także różnic w poziomach metylacji DNA w korze czołowej i hipokampie u potomstwa. Uzyskane wyniki w kompleksowy sposób uzupełniają dotychczasową wiedzę dotyczącą wpływu zmodyfikowanych rodzajów diety matki w okresie ciąży i laktacji na fenotyp młodego i dorosłego potomstwa obu płci i mają znaczenie nie tylko poznawcze ale i potencjalnie aplikacyjne.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka przedstawiła sześć wniosków: 1. Ekspozycja w okresie rozwoju wewnątrzmacicznego i w okresie laktacji na zmodyfikowaną dietę matki (szczególnie bogatą w tłuszcze) prowadzi do wystąpienia u potomstwa zaburzeń behawioralnych, takich jak rozwój zachowań podobnych do depresji (wydłużenie czasu bezruchu w FST i obniżenie preferencji sacharozy) oraz zachowań charakterystycznych dla ASD (zmniejszenie interakcji socjalnych, wzrost zachowań repetytywnych i agresywnych (Tabela 1); 2. HFD spożywana przez matkę w czasie ciąży i laktacji prowadzi do istotnych zmian molekularnych w mózgu u młodego i dorosłego potomstwa (zmiany na poziomie ekspresji genów i kodowanych przez nie białek), które łączone są z patogenezą depresji (geny kodujące elementy synaps dopaminergicznych i glutaminianergicznych, sygnalizacji szlaku Wnt i aksogenezy oraz korowych markerów neuronów pobudzających i hamujących) i ASD (geny związane z prawidłowym funkcjonowaniem synaps, remodelingiem chromatyny i regulacją transkrypcji); 3. W przeciwieństwie do istotnych zmian na poziomie regulacji ekspresji genów, modyfikacje w zakresie receptorów 5-HT<sub>2A</sub> i 5-HT<sub>2C</sub>, cytokin prozapalnych, BDNF i iryzyny wydają się nie odgrywać istotnej roli w rozwoju zachowań podobnych do depresji u potomstwa powiązanych z matczyną HDF; 4. Zmiany molekularne (Tabela 2) obserwowane w mózgach potomstwa matek-karmionych w czasie ciąży i laktacji dietą o wysokiej zawartości tłuszczu i charakteryzującego się fenotypem podobnym do ASD, mogą być wynikiem zaburzonej maszynarii epigenetycznej związanej z metylacją DNA i aktywnością niekodujących RNA (miRNA); 5. Zaburzenia prawidłowego rozwoju mózgu oraz



wystąpienie zmian w zachowaniu po ekspozycji na zmodyfikowany pokarm matki na wczesnych etapach ontogenezy są zależne od płci potomstwa. Młode i dorosłe samce – w przeciwieństwie do samic – cechują się wystąpieniem liczniejszych zmian molekularnych i behawioralnych charakterystycznych dla fenotypu podobnego do ASD; 6. Zmiany molekularne i behawioralne obserwowane u młodego potomstwa matek karmionych zmodyfikowaną dietą w czasie ciąży i laktacji mogą częściowo zanikać u dorosłych zwierząt po wprowadzeniu w pełni zbilansowanej diety po odłączeniu od matki. Sugeruje to, że interwencja dietetyczna u dorastającego potomstwa może odwracać niektóre skutki narażenia na niekorzystne środowisko wczesnego rozwoju. Sformułowane przez Doktorantkę wnioski dobrze oddają uzyskane wyniki, wynikają bezpośrednio z analizy wyników uzyskanych w czasie realizacji badań. Niektóre spośród nich są jednakże raczej przytoczeniem wyników i powinny mieć bardziej uogólniony charakter.

Dyskusja przeprowadzona przez Autorkę, zamieszczona w poszczególnych pracach oraz w odpowiednim podrozdziale omówienia cyklu prac, jest prowadzona bardzo dojrzałe. Doktorantka umiejętnie odniosła własne wyniki do dostępnych danych literaturowych. Jej ukoronowaniem jest praca poglądowa opublikowana w renomowanym czasopiśmie *Nutrition Reviews* (IF=7,110). W dyskusji Doktorantka wskazuje na modulację szlaku MAPK w patogenezie i zaburzeń depresyjnych. Powyższe obserwacje w połączeniu z danymi uzyskanymi bezpośrednio przez Doktorantkę mogą sugerować potencjalne zastosowanie metforminy (modulatora aktywności MAPK, przenika przez łożysko) w ograniczaniu/zapobieganiu występowania zmian neurorozwojowych, której skuteczność w kontrolowaniu zaburzeń metabolicznych u ciężarnych oraz płodu i noworodków została potwierdzona nie tylko w badaniach eksperymentalnych ale i klinicznych. Nie określono jednakże jej wpływu na zaburzenia neurorozwojowe. Wobec rosnącej liczby publikacji wskazującej na bezpieczeństwo stosowania metforminy w czasie ciąży podjęcie badań nad jej wpływem na zaburzenia neurorozwojowe mogłoby (po uprzednim potwierdzeniu hipotezy w badaniach eksperymentalnych) prowadzić do praktycznego zastosowania badań prowadzonych przez Doktorantkę.

Reasumując należy stwierdzić, że cel pracy został w pełni zrealizowany, a uzyskane wyniki są oryginalnym osiągnięciem Autorki, która dobrze opanowała niełatwy warsztat badawczy i wykazała bardzo dobre merytoryczne przygotowanie. Uważam, że praca stanowi znaczący dorobek z elementami nowości naukowych i w pełni odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim. Fakt opublikowania wszystkich prac w renomowanych czasopismach świadczy o aktualności podjętej tematyki badawczej i nowoczesnej metodyce badań, jak również o umiejętności Doktorantki (będącej pierwszym autorem wszystkich publikacji) merytorycznej dyskusji z recenzentami w podczas ostatecznej redakcji artykułów. Dlatego też zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN o dopuszczenie

mgr inż. Kingi Gawlińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na dużą wartość poznawczą wyników oraz opublikowanie ich w renomowanych czasopismach: *Journal of Physiology and Pharmacology* (IF=3,011), *Developmental Cognitive Neuroscience* (IF=6,464), *Pharmacological Reports* (IF=3,024), *International Journal of Molecular Sciences* (IF=5,923), *Nutrients* (IF=5,717) oraz *Nutrition Reviews* (IF=7,110) (Doktorantka we wszystkich jest pierwszym autorem) wnioskuję o wyróżnienie pracy „*Summa cum laude*”.



Prof. dr hab. n. med. Marek Drożdżik