

Gdańsk 27.12.2023

Prof. dr hab. med. Maria Mazurkiewicz-Bełdzińska  
Klinika Neurologii Rozwojowej  
Katedra Neurologii  
Gdański Uniwersytet Medyczny

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Michała Zalasa „Ocena fenotypowa myszy niosących mutację punktową genu alfa-II spektryny jako modelu zwierzęcego dla zespołu ataktycznych spektrynopatii neuronalnych”**

Spektryny są białkami cytoszkieletu, które ulegają ekspresji w układzie nerwowym ssaków. Patogenne warianty SPTAN1, SPTBN1, SPTBN2 i SPTBN4, czterech z sześciu genów kodujących spektryny neuronalne, powodują zaburzenia neurologiczne. Pomimo ich podobieństwa strukturalnego i wspólnej roli jako organizatorów molekularnych w błonie komórkowej, spektryny różnią się ekspresją, lokalizacją i specjalizacją w neuronach, a ta zmienność częściowo leży u podstaw nienakładających się na siebie objawów chorobowych w spektrynopatiach.

Spektryny biorą udział w takich procesach jak: rozwój układu nerwowego mielinizacja, kształtowanie aksonów i dendrytów, przekazywanie sygnałów przez zewnętrzną błonę komórkową, wewnątrzkomórkowy transport białek i pęcherzyków, fagocytoza, kształtowanie odpowiedzi immunologicznej, regulacja cyklu komórkowego, angiogeneza. Z punktu widzenia neurologa dziecięcego istotna wydaje się mutacja w genie  $\alpha$ II-spektryny, SPTAN1 (OMIM 182810), który koduje białko cytoszkieletu, które odgrywa ważną rolę w utrzymaniu integralności mielinizowanych aksonów, rozwoju aksonów i synaptogenezie. Heterozygotyczne

warianty patogenetyczne SPTAN1 były opisywane jako związane z występowaniem encefalopatii padaczkowych (DEE- *developmental epileptic encephalopathy*) i opóźnienie rozwoju (DD – *developmental delay*), rzadziej z dziedziczną neuropatią ruchową i autosomalną recesywną dziedziczną paraplegią spastyczną (HSP – *hereditary spastic paraplegia*).

Celem recenzowanej pracy doktorskiej był opis fenotypowy myszy Spna2R1098Q, posiadającej mutację punktową genu  $\alpha$ -II spektryny, jako modelu dla wielu spektrynozależnych ataksji mózdkowych, który mógłby posłużyć do badań nad mechanizmami odpowiedzialnymi za spektrynozależne neuropatie przez cały okres życia osobniczego i dodatkowo pozwoliłyby testować nowe terapie tych schorzeń. Co ciekawe myszy Spna2R1098Q są jedynym modelem zwierzęcym, który przejawia fenotyp napadów zgięciowych oraz zaburzeń ruchowych i poznawczych, należących do spektrum objawów klinicznych pacjentów cierpiących na neuropatie spektrynozależne.

Ocena pracy doktorskiej obejmowała część merytoryczną i metodologiczną pracy oraz wyniki, dyskusję i wnioski końcowe. Praca, którą przedstawiono mi do recenzji ma typowy, poprawny układ rozprawy doktorskiej. Przygotowana została na 149 stronach maszynopisu, zawiera 34 ryciny, 14 tabel oraz 119 pozycji piśmiennictwa głównie zagranicznego przedstawionego w kolejności alfabetycznej. Wstęp stanowi szczegółowe i rzetelne omówienie poruszanych zagadnień, w oparciu o szeroką i aktualną literaturę i pozwala czytelnikowi na zapoznanie się z problemami, na których doktorant skupia się w swojej pracy badawczej. Przedstawiona wnikliwa analiza aktualnej literatury nie pozostawia wątpliwości, że decyzja doktoranta o kierunku prowadzonych badań jest w pełni uzasadniona zakresem obecnej wiedzy, zarówno z naukowego, jak i klinicznego punktu widzenia. We wstępie autor szczegółowo przedstawia charakterystykę i rolę spektryn ich budowę, wybrane funkcje kończąc wstęp przeglądem ludzkich spektrynopatii. Ta część wstępu jest szczególnie wartościowa pod względem edukacyjnym. Spośród uwag do tej części pracy, które nie wpływają na wartość merytoryczną wymienię używanie przez autora pojęć spazmów dziecięcych w odniesieniu do napadów zgięciowych, zamieniania pojęć padaczka ogniskowa czołowo lub miokloniczna (str 48) padaczka ogniskowa oczywiście może być pochodzenia czołowego ale padaczka miokloniczna to już raczej napady uogólnione a rzadziej ogniskowe. Sugerowałabym

uproszczenie stwierdzenia i podanie, że mogą występować zarówno napady zgięciowe, ogniskowe i uogólnione. Nieuzasadnione jest też używanie nieaktualnej już klasyfikacji napadów padaczkowych jako ogniskowe dyskognitywne. Dodatkowo na stronie 49 autor opisując spektrum fenotypowe u pacjentów ze zdiagnozowaną mutacją w genie SPTAN1 opisuje, że w większości przypadków obserwuje się „ciężkie głębokie lub poważne zaburzenia rozwojowe (niejasny jest dla mnie ten podział) zwłaszcza, w kolejnych wersjach autor stwierdza że u chorych może występować głębokie upośledzenie umysłowe, głębokie zaburzenia intelektualne lub ciężki niedorozwój umysłowy oraz brak postępów w rozwoju a wręcz stagnację rozwoju psychoruchowego. Część z tych stwierdzeń to synonimy i warto byłoby też uprościć to stwierdzenie. Nie używa się też raczej stwierdzenia normalny rozwój tylko prawidłowy rozwój – również w odniesieniu do wyników badania np. prawidłowy zapis EEG, prawidłowy wynik badania MRI itd. Tak jak wspominałam wcześniej niespójna jest nomenklatura dot rodzajów napadów padaczkowych (pkt 3 str 49) i ten punkt wymagałby uporządkowania zgodnie z obowiązującą klasyfikacją napadów. Zaznaczam również, że opistotonus to nie jest rodzaj napadu padaczkowego.

W punkcie 6 str 51 wystarczyłoby opisać objawy zgodnie z obowiązującą nomenklaturą a nie używać pojęć niemedycznych takich jak paraliż lub stwierdzeń, że hipotonia czyli brak odpowiedniego napięcia mięśniowego związana jest z występowaniem szybkich lub głębokich odruchów ścięgnistych jest nieprawdziwe. Punkt 6 wymagałby przeredagowania jest tam kilka ww merytorycznych nieścisłości, rozumiem jednak, że autor nie jest lekarzem-neurologiem i takie skomplikowane fenotypy neurologiczne mogą być dla Niego trudne do opisanie.

Autor w dalszej części słusznie rozważa kryteria, które powinny być spełnione przed opracowaniem modelu zwierzęcego napadów zgięciowych. Niestety przez całą czas używa pojęcie „spazmy i napady” tak jakby spazmy nie były napadami.

W dalszej części wstępu bardzo wnikliwie opisane są dostępne modele mysie i szczurze dot napadów zgięciowych i encefalopatii padaczkowych.

W rozdziałach dotyczących materiałów i metod bardzo dokładnie z ogromną znajomością warsztatu badawczego dokonano opisu stosowanych materiałów i metod. Badania uzyskały zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu według zezwoleń o numerze 78/2018 i 70/2021.

Wyniki zawierają część dotyczącą sposobu dziedziczenia, opisu fenotypowego myszy R1098Q, opis stosowanych testów motorycznych i poznawczych, wyniki badań laboratoryjnych oraz ocena częstotliwości i czasu trwania napadów padaczkowych. Kolejnym rozdziałem jest dyskusja obszernie opisująca stosowany model i porównująca go z badaniami dostępnymi w literaturze. Doktorant umiejętnie wykazuje na bazie piśmiennictwa trudności w prowadzeniu tego typu badań. Krytycznie odnosi się do ograniczeń modelu. Badania przeprowadzone w ramach projektu doktorskiego pozwoliły na scharakteryzowanie modelu myszy i wykazanie występowania deficytów ruchowych i poznawczych. Potwierdzono, iż zaburzenia w  $\alpha$ -II spektrynie prowadzą do wtórnej utraty  $\beta$ -III spektryny. Stwierdzono także negatywny wpływ mutacji Spna2R1098Q  $\alpha$ -II spektryny na cechy morfometryczne, w tym na wielkość śledzion. Nie zaobserwowano różnic w funkcji układu oporności wrodzonej i nabytej myszy Spna2R1098Q pomimo odnotowanego spadku liczby leukocytów i limfocytów we krwi obwodowej. Autor sformułował trzy wnioski, których mi jasno sformułowanych celów pracy – te najlepiej sprecyzowane są w streszczeniu pracy

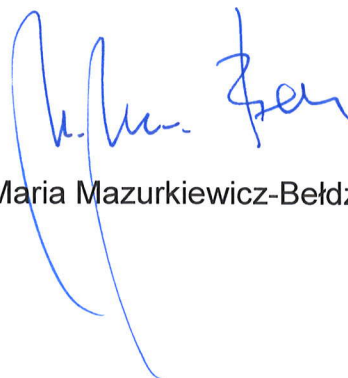
Dodatkowo na podkreślenie zasługuje fakt, że dane uzyskane w toku realizacji pracy doktorskiej zostały opublikowane w dwóch publikacjach z dużym współczynnikiem oddziaływania, z drugiego i trzeciego kwartyla.

Mimo kilku uwag, rozprawę doktorską mgr Michała Zalasa oceniam bardzo wysoko, analiza zagadnień objętych tematem pracy doktorskiej została przeprowadzona poprawnie z dużym nakładem pracy.

### **Wniosek końcowy**

W opiniowanej rozprawie doktorskiej mgr Michał Zalas wykazał się szeroką wiedzą i znajomością zagadnień dotyczących modeli zwierzęcych spektrynopatii, w prezentowanej pracy wiedzę tę w sposób twórczy rozwinął, uzyskując wyniki ważne zarówno z naukowego jak i praktycznego punktu widzenia. Wykazał się również umiejętnością organizowania i samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Poziom naukowy przedstawionej pracy jest bardzo wysoki.. Uważam że praca mgr Michała Zalasa stanowi duży wkład w zrozumienie roli spektryn w patogenezie chorób neurologicznych. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust.1-4 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2018 poz.1668 z późn. zm. dlatego stawiam wniosek o dopuszczenie pracy mgr Michała Zalasa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Mazurkiewicz-Beldzińska', written in a cursive style.

Maria Mazurkiewicz-Beldzińska