

Dr Małgorzata Waszak

Zakład Anatomii

Akademia Wychowania Fizycznego

Poznań

Załącznik nr 2

Autoreferat

2017

Spis treści:

1.	Dane osobowe	str. 3
2.	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej.....	str. 3
3.	Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	str. 3
4.	Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)	
4.1	Tytuł osiągnięcia naukowego	str. 4
4.2	Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa..	str. 4
4.3	Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	str. 4
4.4	Spis piśmiennictwa zastosowanego w opisie osiągnięć naukowych.....	str. 27
5.	Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych	
5.1	Działalność naukowo – badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora	str. 32
5.2	Działalność naukowo – badawcza po uzyskaniu stopnia doktora.....	str. 33

1. Imię i nazwisko: Małgorzata Waszak

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Stopnie naukowe i tytuły zawodowe:

- 1986 Tytuł zawodowy: magister biologii, specjalizacja z antropologii, dyplom z wyróżnieniem, Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu.
Praca magisterska pt.: „Stan rozwoju biologicznego dzieci polskich od 1 do 3 roku życia” obroniona w Zakładzie Antropologii UAM na ocenę bardzo dobrą.
– Promotor: Prof. dr hab. M.D. Kaliszewskiej-Drozdowskiej
- 1995 Stopień naukowy: doktor nauk biologicznych nadany decyzją Rady Wydziału Biologii UAM w Poznaniu.
Rozprawa doktorska pt.: „Dymorfizm płciowy cech somatycznych i ciężaru narządów wewnętrznych w okresie płodowym człowieka”
– Promotor: Prof. dr hab. Bogusław Marecki
– Recenzenci: Prof. dr hab. Maria Danuta Kaliszewska-Drozdowska,
Prof. dr hab. Andrzej Malinowski.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

- 1986-1988 Asystent naukowo-dydaktyczny w Zakładzie Anatomii Funkcjonalnej Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.
- 1988-1995 Starszy asystent w Zakładzie Anatomii Funkcjonalnej Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.
- 1995-2009 Adiunkt w Katedrze Anatomii Funkcjonalnej Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.
- 2009-2016 Starszy wykładowca w Katedrze Anatomii Funkcjonalnej Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.
- Od 2016 Starszy wykładowca w Zakładzie Anatomii Katedry Nauk Biologicznych Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Monografia: „Wykorzystanie metody bliźniąt do określenia udziału czynników genetycznych i środowiskowych w zmienności cech ilościowych w okresie okołourodzeniowym”

4.2. Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

Autor: Małgorzata Waszak

Rok wydania: 2013

Nazwa wydawnictwa: Wydawnictwo Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu

Poznań: AWF, 2013

Seria: Monografie, 422, s. 194

ISBN: 978-83-61414-66-7

4.3. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wyniki moich badań, wynikających z długoletnich zainteresowań problematyką rozwoju i zmienności organizmu człowieka okresu pre i perinatalnego postanowiłam przedstawić w formie obszernej monografii. Wybór monografii jako sposobu przedstawienia uzyskanych wyników badań naukowych nie jest przypadkowy. W tradycji dyscyplin stanowiących nauki podstawowe, monografia była i jest częstą formą przedstawiania szerokiego opracowania uzyskanych wyników i problemów badawczych. W sytuacji, kiedy zaplanowane są badania longitudinalne obejmujące bogaty ilościowo materiał badawczy oraz szeroki zakres poruszanych zagadnień, taki sposób prezentacji umożliwia wszechstronny opis oraz szczegółową analizę z zastosowaniem wielowymiarowych metod statystycznych i kompleksowe opracowanie wyników. W dobie internetu i dynamicznego rozwoju nauki, kiedy liczy się szybki przepływ informacji, praktyczniejszą formą przedstawiania wyników wydaje się być publikacja w postaci oryginalnego artykułu naukowego. Rzeczywiście jest to znacznie wygodniejszy kanał upowszechniania wiedzy, ale narzuca duże uproszczenia. W monografii można zawrzeć zdecydowanie więcej informacji, szczegółowo je opisać, gruntownie przeanalizować i dokładniej omówić. Taki rodzaj publikacji moich badań umożliwia również

wnikliwy i wszechstronny przegląd teoretycznych przesłanek podjętych badań, rzetelny, a nie skrótowy opis metod badawczych, stanowi cenne źródło dostępu do danych, które z pewnością mogą być wykorzystane przez praktyków w antropologii, medycynie prenatalnej i perinatalnej.

Mimo, iż współczesne koncepcje, omawiające rozwój biologiczny, zakładają, że rozwój poszczególnych osobników danej populacji jest wypadkową dwóch determinant: wyposażenia genetycznego i warunków środowiskowych, wciąż daleko nam do pełnego zrozumienia złożonej współzależności między oddziaływaniem genów, a wpływem środowiska i ciągle wolimy opowiadać się za jedną albo drugą opcją zamiast przyjąć obydwie. Dyskusja nad tym „czy cecha jest nabyta, czy wrodzona?” zawsze naładowana jest emocjami.

Niektórzy badacze podkreślają, że organizm w znacznym stopniu odzwierciedla oddziaływanie czynników biologicznych. Geny ulegają aktywacji na określonych etapach rozwoju, tworząc matrycę do syntezy białek. Wśród białek znajduje się bardzo wiele molekuł, w tym hormony i enzymy, które pełnią w organizmie funkcję cząsteczek sygnałowych i budulcowych, ukierunkowując jego rozwój. Z kolei inni zwracają uwagę, w jak znacznym stopniu cechy organizmu odzwierciedlają oddziaływanie czynników środowiskowych. W rzeczywistości, wzajemne oddziaływania pomiędzy genami i środowiskiem, wydają się być w największym stopniu odpowiedzialne za rozwój osobniczy. Nawet w łonie matki, sygnał do rozpoczęcia kolejnej fazy rozwojowej jest wynikiem interakcji pomiędzy genami a obecnymi w środowisku macicy hormonami. Jednak środowisko hormonalne nie oddziałuje w sposób niezależny od czynników genetycznych i nie jest w stanie korygować letalnych błędów w genomie płodu. Prawidłowy rozwój wymaga zsynchronizowanego oddziaływania genów i środowiska. Nawet jeśli dany osobnik odziedziczył geny warunkujące ponadprzeciętny wzrost, niekoniecznie go osiągnie, jeśli nie będzie się właściwie odżywił. Również w tym przypadku zacierają się oddziaływania pomiędzy genami i środowiskiem. Uważa się, że kluczem do zrozumienia złożoności cech ludzkich są badania genów, czynników środowiskowych oraz wzajemnych oddziaływań między nimi [Stiles 2011].

Właściwości budowy ciała człowieka w większości przypadków są zdeterminowane wieloma genami. W zasadzie tym mniejsze jest jednostkowe działanie każdego z genów biorących udział w kontroli rozwoju danej cechy, im więcej tych genów wchodzi w skład danego zespołu. Cechy dziedziczone wielogenowo znajdują się pod silnym wpływem czynników środowiskowych. Nie można jednak ustalić rzeczywistej proporcji między rolą tych dwóch grup czynników w sensie ogólnym. W zasadzie stały jest bowiem udział czynnika

genetycznego (aczkolwiek zmienna może być ekspresja genów) podczas, gdy rodzaj i siła działających czynników środowiskowych zmieniają się nieustannie. Stąd co najwyżej można oszacować udział czynników genetycznych i środowiskowych w zmienności cech somatycznych.

Celem badań zaprezentowanych w postaci dzieła opublikowanego w całości - monografii stanowiącej osiągnięcie habilitacyjne, było oszacowanie relacji genetycznych do środowiskowych oddziaływań na zmienność cech fenotypowych w okresie perinatalnym. Takie oszacowanie wiąże się z koniecznością prowadzenia badań nad ciążą mnogą. Wnioskowanie w nich oparte jest na metodzie bliźniąt, która zakłada, że bliźnięta monozygotyczne są genetycznie identyczne, zaś bliźnięta dwuzygotyczne są spokrewnione w takim samym stopniu jak zwykle rodzeństwo. Zatem badając bliźnięta w okresie prenatalnym można uchwycić efekty działania genów i środowiska. Warunkiem prawidłowego stosowania metody bliźniąt jest znajomość typu zygotywności bliźniąt, a także typu ich błon płodowych, która daje możliwość poznania wpływu czynników środowiskowych na funkcjonowanie genów. Mimo, iż najnowsze koncepcje podważają identyczność genetyczną bliźniąt MZ [Baudisch et al.2013; Ehli et al. 2012; Gordon et al. 2011; Silva et al.2011; Haque et al. 2009], to różnice te są jednak na tyle małe, że badania na bliźniętach służące do tropienia wpływu środowiska, nie tracą sensu [Bruder i wsp. 2008].

Rozwój prenatalny jest jedynym etapem ontogenezy, w którym jasno i jednoznacznie określone jest wspólne środowisko rozwoju. Fakt, że zarodek i płód rozwija się w obrębie organizmu matki, stwarza specyficzny układ stosunków organizmu dziecka ze środowiskiem zewnętrznym. Środowiskiem tym jest bowiem organizm matki i wszystko to, co ten organizm przekazuje za pośrednictwem łożyska, a także pośrednio jest nim środowisko istniejące na zewnątrz organizmu matki. Równocześnie etap rozwoju płodowego jest okresem szczególnej wrażliwości ze względu na niezwykle tempo rozwoju. Wiadomo bowiem, że im szybszy jest rozwój tym większa jest skuteczność działania wpływających na niego czynników. Dynamika rozwoju wewnątrzmacicznego jest tak wielka, jakiej nie spotyka się nigdy później. Wobec powyższego należy podkreślić, że płód z olbrzymią wrażliwością reaguje na stymulację środowiska wewnątrzmacicznego, na które składają się silnie i wielokierunkowo powiązane ze sobą czynniki matczyne, płodowe, łożyskowe i maciczne.

Warunkiem realizacji postawionego celu było wykonanie następujących zadań badawczych:

- ❖ określenie stanu rozwoju noworodków pochodzących z ciąży bliźniaczej;
- ❖ określenie typu zygotywności i typu błon płodowych badanych bliźniąt - ważne jest, aby porównywane bliźnięta rozwijały się w jednakowych warunkach środowiska wewnątrzmacicznego;
- ❖ ustalenie różnic wewnątrzparowych u bliźniąt monozygotycznych i dwuzygotycznych oraz określenie stopnia ich istotności;
- ❖ analiza zmienności fenotypowej prowadzona w zależności od tygodnia ciąży, płci i matczynek czynników ryzyka oznaczonych dla każdego z bliźniąt;
- ❖ określenie zakresów i kierunków stopnia odziedziczalności cech, jej stałości i zmienności w czasie.

Rozdział pierwszy stanowią teoretyczne przesłanki podjętych badań. Wykorzystując najnowsze doniesienia z literatury przedmiotu, poglądy i hipotezy badacze, wyniki badań eksperymentalnych i klinicznych, jak również własne przemyślenia do wnikliwego opisanie zagadnień związanych z wpływem różnorodnych czynników na kształtowanie się rozwoju somatycznego płodów i noworodków stworzyłam szerokie tło dla podejmowanych w pracy rozważań.

Tę część monografii rozpocząłam od przedstawienia specyfiki okresu wewnątrzmacicznego w badaniach ontogenetycznych podkreślając, że ten wyjątkowy etap rozwoju jest etapem najtrudniejszym do zbadania. Nie tylko ze względu na trudne, techniczne możliwości prowadzenia badań morfologicznych, specyfikę materiału złożonego najczęściej z martwych płodów (zwłaszcza we wczesnych okresach rozwoju), ale również ze względu na brak możliwości dokonywania porównań.

Prowadzone przeze mnie badania nad środowiskowym uwarunkowaniem rozwoju płodowego, skłoniły mnie do wnikliwego prześledzenia relacji genotyp-środowisko w tym okresie rozwoju. Szczegółowe omówienie interakcji genotyp-środowisko uważam za niezwykle ważne.

Badania nad genomem ludzkim powoli pozwalają odkryć obszary podporządkowane poszczególnym genom, ale nawet sporządzenie kompletnej mapy genów i rozpoznanie ich zadań nie wyjaśnia, do jakiego stopnia to one decydują o naszym życiu. Kluczem do zrozumienia kontroli rozwoju jest poznanie sposobu ekspresji genów. W ostatnich latach

wykryto, że RNA są nie tylko przekaźnikami „poleceń” DNA, lecz modyfikują zarówno swoje funkcje, jak i wpływają na działanie DNA. Stąd można przypuszczać, że odgrywają rolę w ekspresji genów. Naukowcy z Uniwersytetu w Texasie opracowali nowatorską technikę używania cząsteczki RNAi (interferującego RNA) jako "narzędzia molekularnego", które zarówno może znieść funkcję danego genu w ludzkim genomie jak i leczyć choroby. Wyciszenie ekspresji w danej tkance może dać informacje o funkcjach danego genu w tej konkretnej tkance bez blokowania innych funkcji genu w innych tkankach [Fire i wsp. 1998]. Mediatorami w mechanizmie kontroli przepływu informacji genetycznej są tzw. mikro-RNA (miRNA), które to właśnie zaangażowane są w negatywną regulację ekspresji genów podczas rozwoju [Kruczek 2010]. Rosnąca liczba doniesień wskazuje na ich istotne znaczenie dla procesów regulacji rozwoju i różnicowania, kontroli podziałów komórkowych oraz apoptozy [Williams 2008; Ubich i wsp. 2008], a także w patologii wielu schorzeń [Erson i Petty 2008]. Przypuszcza się, iż miRNA hamują ekspresję genów, które powinny być wyciszone w danym typie tkanki i w ten sposób przyczyniają się do zapewnienia komórkowo i tkankowo specyficznego wzoru ekspresji genów [Williams 2008].

Chcąc zrozumieć, co powoduje różnice pomiędzy ludźmi musimy szukać przyczyn pomiędzy genami, w obrębie struktur DNA, które nie kodują żadnych białek. Właśnie te niekodujące sekwencje DNA, zwane enhancerami współtworzą „genetyczne przełączniki”, które włączają i wyłączają geny we właściwym czasie i miejscu w organizmie [Fletcher i wsp. 2008]. Każdy enhancer reguluje ekspresję genu niezależnie, w różnych częściach ciała i na różnych etapach rozwoju. Całkowita aktywność genu jest łącznym efektem działania rozlicznych, niezależnie sterowanych miejsc jego ekspresji.

Badania prowadzone przez zespół dr Barbary B. Knowles z The Jackson Laboratory w Bar Harbor, opublikowane w czasopiśmie "Developmental Cell", wykazały, że fragmenty "śmieciowego" DNA regulują aktywność wielu genów odpowiedzialnych za zmiany zachodzące w czasie przekształcania się zapłodnionego jaja w zarodek [Evsikov i wsp. 2006; Peaston i wsp. 2007]. Te fragmenty "śmieciowego" DNA nazywane są retrotranspozonami, stanowiąc ponad jedną trzecią genomu człowieka mogą się tam samodzielnie powielać i rozprzestrzeniać. Naukowcy uważają, że retrotranspozony dostały się do genomów z zewnątrz dzięki wbudowaniu się materiału genetycznego tzw. retrowirusów. Dalsze badania pozwoliły zaobserwować, że retrotranspozony na różne sposoby regulują aktywność genów i biorą udział w powstawaniu różnych wariantów danego białka w komórce jajowej i wczesnym zarodku, co

sprzyja biologicznej różnorodności. Jak konkludują autorzy pracy, ich wyniki wskazują, że retrotranspozony bezpośrednio wpływają na procesy rozwoju zarodka [Peaston i wsp. 2004; Hoskins i wsp. 2007]. Istnieje domniemanie, że transpozony przekazane wraz z gametami rodziców we wczesnej fazie formowania się zarodka (a może już na etapie jaja płodowego) mogą przedostawać się do genów drugiego z rodziców zwiększając podobieństwo do jednego z nich [Fletcher i wsp. 2008]. Dokładne poznanie powyższych mechanizmów jest jeszcze nikłe, ale wydaje mi się, że tego typu współdziałania mogą istotnie modyfikować penetrację i ekspresję wielu genów.

Jak potężny wpływ na funkcjonowanie genów może mieć środowisko, pokazały przeprowadzone w 2003 roku doświadczenia Thomasa Insela z Uniwersytetu w Atlancie [Francis i wsp. 2003]. Uczony przeniósł mysie embriony z macicy jednej matki do drugiej. Po urodzenia okazało się, że zwierzaki mają taki sam temperament i typ zachowań jak ich nowa, „niegenetyczna” matka. Ostatnie badania wykazują, iż siła genów zależy od wpływu środowiska. A widać to już w pierwszych chwilach życia zarodka. Dowiedziono, że znajdujące się w cytoplazmie komórki jajowej związki chemiczne (nieznane jeszcze do końca naukowcom) zaczynają uruchamiać bądź wyciszać 39 powiązanych ze sobą genów HOX. Dzięki temu już po kilkunastu podziałach można dostrzec różnicę między poszczególnymi komórkami ludzkiego zarodka (tworzącymi się zawiązkami wszystkich organów i części ciała) [Awgulewitscha 2003, Bielańska - Osuchowska 2004, Pruett i wsp. 2008, Filip 2010]. Najnowsze badania wykazały, że geny HOX mają wpływ także na niektóre cechy wyglądu zewnętrznego człowieka np. rozwój tkanki tłuszczowej. Mają wpływ, ale nie decydują o naszej tuszy. Niektóre bowiem geny HOX mogliśmy otrzymać zablokowane, a zaktywizowaliśmy je trybem życia, i odwrotnie - aktywne geny dzięki odpowiedniemu trybowi życia i diecie można wyciszyć. Przy współgraniu około 21 500 genów w ludzkim genomie, roli wyciszania i wzmacniania nie można przecenić. Podczas dorastania komórek, ich przeznaczeniem rządzi wybiórcze wyciszanie lub wzmacnianie genów. Proces ten jest polem dla działania czynników epigenetycznych, które opisałam w teoretycznej części monografii. Mechanizmy epigenetyczne tłumaczą wiele kwestii, dotąd pozostających zagadką, np. dlaczego u bliźniąt jednojajowych, mających dokładnie taki sam zestaw genów, tylko jedno z rodzeństwa może chorować na astmę. Chociaż oba bliźnięta dzielą te same geny, najnowsze badanie wskazują, że niektóre geny mogą być aktywne tylko u jednego z bliźniaków. Mogą oni być identyczni genetycznie, ale nie epigenetycznie. Ostatnie badania [Fraga i wsp. 2005] prowadzone na 80

parach bliźniąt jednojajowych ujawniły, że grupy metylowe, znaczą ich DNA w inny sposób, stąd różnice epigenetyczne, za którymi podążanie może wyznaczać nowe drogi dla badań nad chorobami.

W kolejnym rozdziale teoretycznym monografii opisałam środowisko wewnątrzmaciczne bliźniąt podkreślając, że dotychczasowe badania dają małą podstawę do opisu warunków środowiskowych bliźniąt w okresie prenatalnym. Jestem przekonana, że przeprowadzone przeze mnie badania zweryfikowały dotychczasowe poglądy dotyczące warunków rozwoju wewnątrzmacicznego bliźniąt i mogą stać się podstawą do analiz różnic wewnątrzparowych bliźniąt.

Część teoretyczna monografii ukazuje również mechanizmy i przyczyny powstawania ciąży bliźniaczej. Powstające, coraz nowsze metody sztucznej prokreacji, a zarazem i możliwości badań genetycznych prawdopodobnie będą wpływać na zmianę naszych poglądów dotyczących procesu powstawania bliźniąt. Stworzy to konieczność wprowadzania nowych określeń dla urodzonych z nich noworodków.

Pierwszy znany przypadek, zmuszający do rewizji poglądów na temat klasyfikacji i mechanizmów powstawania bliźniąt miał miejsce w 2007 roku, kiedy to przyszły na świat niezwykle bliźnięta - ani jedno -, ani dwujajowe - jak zidentyfikowali amerykańscy naukowcy [Souter i wsp. 2007]. Jednym z bliźniąt była dziewczynka posiadająca anormalne narządy płciowe, drugim z pozoru zupełnie normalny chłopiec. Ponieważ noworodki były różnej płci, lekarzom nie przyszło nawet do głowy, że mogłyby być bliźniętami jednozygotycznymi. W efekcie genetycznych badań molekularnych obu bliźniąt okazało się, że choć bliźnięta mają tylko jedną matkę i jednego ojca, to powstały na pewno nie z dwóch, lecz z trzech wyjściowych komórek rozrodczych - jajeczka i dwóch plemników. Taki typ bliźniąt określono jako - bliźnięta „w połowie identyczne”. Badana przez naukowców zagadkowa para bliźniąt jest bowiem identyczna, jeśli chodzi o geny matki, ale tylko połowę genów po ojcu ma wspólną. Jest to nieznanym wcześniej mechanizm powstania ciąży bliźniaczej. Takie bliźnięta są jednocześnie chimerami - to znaczy ich komórki nie są genetycznie jednorodne.

Najczęściej występującą formą chimeryzmu jest mikrochimeryzm płodowo-matczyny. Zjawisko przenikania komórek matki do płodu, mimo że znane już od około 50 lat, jest obecnie przedmiotem intensywnych badań medycznych, ponieważ z najnowszych prac wynika, że mikrochimeryzm może wpływać na stan zdrowia i przebieg chorób. W niektórych przypadkach może on wywoływać atak immunologiczny, a w innych pomagać w leczeniu. Naukowców

fascynuje, czy nowoodkryte zjawisko da się wykorzystać w terapii chorób autoimmunologicznych lub regeneracji uszkodzonych tkanek [Adams i Nelson 2004; Śliwa 2009]. Z uwagi na znaczenie tego zjawiska zawarłam jego opis w części teoretycznej monografii, którą kończę szczegółową charakterystyką metod określania zygotywności bliźniąt.

Metodyka i organizacja badań oraz kryteria doboru próby zostały bardzo szczegółowo opisane w rozdziale drugim. Podstawowym warunkiem realizacji celu tej monografii było uzyskanie danych określających stan rozwoju noworodków pochodzących z ciąży bliźniaczej. Materiał, który w głównej mierze posłużył jako podstawa moich badań gromadzony był w Klinice Perinatologii i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w latach 2002 - 2012. Opracowany materiał złożony z noworodków żywo urodzonych z ciąży bliźniaczej liczył 2526 osobników obu płci (1282 płci męskiej i 1244 płci żeńskiej), w różnych etapach życia płodowego, tj. od 22 do 41 tygodnia ciąży. Na podstawie rozpoznania klinicznego wyłączyłam z opracowania osobników z wrodzonymi anomaliami lub uszkodzeniami mechanicznymi ciała. W ten sposób duży procent osobników obciążonych wadami genetycznymi i wrodzonymi został wyeliminowany z materiału badawczego. Odrzuciłam również noworodki, u których podejrzewałam małą wiarygodność danych.

W niniejszej pracy wiek kalendarzowy noworodków określiłam, bazując na informacji matki o pierwszym dniu ostatniej menstruacji. Za jednostkę podziału badanego materiału na kategorie wiekowe przyjąłm tydzień płodowy, mając na uwadze fakt, że od drugiego miesiąca życia płód rośnie przeciętnie 2mm na dzień [Arey 1965]. Określony w ten sposób materiał podzieliłam więc na grupy tygodniowe od 22 do 41 tygodnia życia płodowego, oddzielnie dla każdej płci.

Oceny stanu ogólnego noworodka zaraz po urodzeniu dokonałam za pomocą skali Apgar uwzględniającej w sposób syntetyczny czynność układu oddechowego, krążenia i ośrodkowego układu nerwowego. Zastosowałam ogólnie przyjęte kryterium: 10-8 pkt - stan dobry, 7.5-6 pkt - stan średni, 5.5-4 pkt - zamartwica lekka, 3.5-0 pkt - zamartwica ciężka. W przypadkach, gdy w kolejnych minutach życia wartości skali Apgar zmieniały się, posłużyłam się ich wartością w pierwszej i w piątej minucie.

Opracowany materiał scharakteryzowałam pod względem rozwoju morfologicznego poprzez zespół następujących 6 cech somatycznych: 1. masa ciała, 2. długość całkowita ciała, 3. długość ciemieniowo-siedzeniowa ciała (si), 4. szerokość barków, 5. obwód głowy i 6.

obwód klatki piersiowej. Definicje cech i sposób ich mierzenia zgodny był z tradycyjną techniką pomiarową wg Martina [1988].

Ocena histopatologiczna materiału badawczego została wykonana w Pracowni Patomorfologii Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu i dotyczyła płodów pochodzących od 445 par bliźniąt. W wyniku badania określono masę i wymiary łożyska, długość i stan pępowiny, kosmówkowość oraz zmiany ogniskowe i histologiczne nieprawidłowości łożyska. Zmiany patomorfologiczne dotyczyły długości i różnorodnych przyczepów sznura pępowinowego do łożyska natomiast czynnościowe- ograniczonej matczyno-płodowej wymiany krwi, zaburzeń krążenia w łożysku, zmian zapalnych w obrębie płodu i przedwcześnie oddzielonego łożyska.

Charakterystyki środowiskowej noworodków dokonałam na podstawie danych ankietowych pochodzących z wywiadu prowadzonego z rodzącymi matkami. Opierając się na klinicznej klasyfikacji matczynek czynników ryzyka, badane bliźnięta podzieliłam na grupę zagrożoną i niezagrożoną w rozwoju. Środowisko matczyne uznałam za zagrażające rozwojowi płodu, gdy spełniony został jeden z następujących warunków: matki posiadały przewlekłe schorzenia, stale przyjmowały leki, w czasie ciąży paliły papierosy, nadużywały alkoholu czy zażywały narkotyki, posiadały złe warunki materialne, przekroczyły 35 rok życia, obecna ciąża była już czwartą lub dalszą, miały wcześniejsze poronienia lub były pierworódkami mającymi mniej niż 20 lat.

Ocena zygotyeczności 821 par bliźniąt jedнопłciowych została wykonana w Laboratorium Genetyki Molekularnej w Poznaniu, kierowanym przez prof. dr hab. R. Słomskiego. Jest to krajowe laboratorium zrzeszone w międzynarodowej organizacji Genetic Fingerprinting i podlega okresowej kontroli jakości wyników.

Materiał biologiczny stanowił jeden ml krwi pępowinowej pobrany na EDTA (10ml 10% EDTA na 1ml krwi) zaraz po porodzie od bliźniąt urodzonych w Klinice Perinatologii i Ginekologii UM w Poznaniu. Materiał badawczy był pozyskany od noworodków bez konieczności narażania ich na dodatkowe zabiegi. Jest to szczególnie ważne w przypadku ciąż mnogich, gdzie poród jest często skomplikowany, a bliźnięta mogą urodzić się z niedoborem masy ciała i w gorszej kondycji fizycznej niż noworodki z pojedynczych ciąż. Szczególną uwagę zwracano na czynność pobrania materiału, prawidłowego oznaczenia próbki, transportu, przechowywania i izolacji DNA przy pomocy technik gwarantujących wysoką wydajność izolacji i wysoki stopień czystości DNA, gdyż poprawność ich wykonania była gwarancją

jakości pobranego materiału, co w efekcie przekładało się na jakość wyniku badania. DNA każdorazowo wyizolowywano z lizatów limfocytów krwi pępowinowej i oczyszczano od białek poprzez wysalanie. Po wyizolowaniu DNA z białych krwinek wykonywano dla wszystkich bliźniąt analizy polimorfizmu DNA poprzez hybrydyzację z sondą molekularną. Oczywiście analizie poddawano tylko DNA niewykazujące degradacji biologicznej. Dalsze badanie DNA polegało na zastosowaniu analizy restrykcyjnej. DNA hydrolizowano enzymem restrykcyjnym *Hinfl*, rozdzielano w 0.9% żelu agarozowym, po elektroforezie wykonywano alkaliczną denaturację i neutralizację DNA, następnie przenoszono DNA na filtr nitrocelulozowy i hybrydyzowano z radioaktywną sondą molekularną (z izotopem ^{32}P lub ligandem, który może być rozpoznany swoistym przeciwciałem i reakcją kolorymetryczną). W miejscach, w których następowała hybrydyzacja sondy molekularnej z DNA uwidoczniały się charakterystyczne prążki.

W badaniach prowadzonych w Laboratorium Genetyki Molekularnej, standardowa analiza obejmuje wykonanie zarówno analizy multi locus, jak i pojedynczego locus [Słomski 2004; Wielgus i wsp. 2004]. W badaniach multi locus najczęściej stosowane są enzymy *Hinfl* lub *HaeIII* i sonda (GTG) $_5$, natomiast w badaniach pojedynczego locus wykonywane są analizy hybrydyzacyjne dla sond molekularnych MS31 i MS43A oraz badania metodą PCR dla D1S80, HUMVWF(AGAT) $_n$, HUMPLA2A1(AAT) $_n$, HUMTHO1(AATG) $_n$, HUMCYARO4(AAAT) $_n$.

Badania z zastosowaniem PCR w przypadku osób blisko spokrewnionych (np. bliźniąt) często okazują się nieinformatywne. Wobec powyższego, analizy polimorfizmu DNA w celu określenia zygotywności badanych bliźniąt dokonano za pomocą badań hybrydyzacyjnych. Badania hybrydyzacyjne obejmowały jednoczesną analizę wielu loci przy użyciu sondy (CAC) $_5$ oraz analizę pojedynczego locus: D7S21 (7p22) i D12S11 (12q24.3).

Wnioski określające zygotywność bliźniąt formułowane są na podstawie porównania wielkości fragmentów DNA występujących u badanych osób. Dla jednoznacznego wnioskowania w oparciu o analizę jednopunktową konieczne jest wykonanie badań dla 3 – 4 niezależnych loci. Analiza wielopunktowa wykazuje ogromną dokładność i wysoką informatywność poprzez jednoczesne wykrywanie wielu fragmentów DNA. Przy użyciu jednej sondy MLS prawdopodobieństwo zgodności dla niespokrewnionych osób wynosi $<3 \times 10^{-11}$. Jest tak niskie, że jedynymi osobami posiadającymi identyczny odcisk genetyczny są bliźnięta

jednozygotyczne. Jedynym istotnym ograniczeniem jest konieczność stosowania wysokocząsteczkowego DNA [Słomski i wsp. 2004; Tamaki i Jeffreys 2005].

Wyniki wcześniejszych badań dowiodły, że analiza odcisku genetycznego jest metodą bezsporną i rozstrzygającą w ocenie zygotywności bliźniąt [Pena i wsp. 1992; Wielgus i wsp. 2008]. Wg Wielgus i współautorów [2008] u 30 par bliźniąt, u których stwierdzono metodą MLS identyczne zestawy alleli, żadna z dodatkowych analiz (SLS, PCR) nie podważyła uzyskanych wyników. Można zatem stwierdzić, że do określenia zygotywności bliźniąt jest to metoda wystarczająca.

Moje badania, których celem było oszacowanie proporcji wariacji fenotypowej oparłam na „metodzie bliźniąt”, albowiem za pomocą tej metody można próbować odpowiedzieć na pytanie: w jakim stopniu zmienność obserwowana u różnych osobników (tj. populacji) jest spowodowana różnicami genetycznymi, a w jakim stopniu wpływami środowiska. Metoda ta pozwala na określenie względnego udziału zmienności genetycznej w zmienności fenotypowej cechy somatycznej przy pomocy różnego rodzaju współczynników odziedziczalności.

W badaniach na bliźniątach ma zastosowanie pojęcie odziedziczalności szeroko rozumianej. Badania te pozwalają oszacować tylko i to łącznie, bez możliwości dalszego rozdzielania, ogólną wariację genetyczną V_G w odniesieniu do wariacji fenotypowej [Plomin, DeFries i McClearn 2001].

Aby prawidłowo opisać plastyczność środowiskową cech (ekosensytywność) i stopień ich zróżnicowania genetycznego wzięłam pod uwagę poza zmiennością, ogólną wielkość cechy. Dopiero odniesienie zmienności cechy do jej wielkości mówi czy zmiany jakim ona podlega są duże, czy nie i pozwala porównywać ze sobą zmienność rozmaitych cech.

Normalizując zmienność cechy na jej wielkość posłużyłam się współczynnikiem polimorfizmu genetycznego P_g i współczynnikiem ekosensytywności D_e , wprowadzonymi przez Henneberga i Lewickiego [Henneberg i Lewicki 1978]:

$$P_g = \sqrt{\frac{V_{DZ} - V_{MZ}}{X_{WSP}^2}} \quad D_e = \sqrt{\frac{V_{MZ}}{X_{MZ}^2}}$$

Wartości współczynników polimorfizmu genetycznego i ekosensytywności interpretowałam się jako informację o tym na ile zróżnicowanie genotypów decydowało o różnicach fenotypowych, oraz w jakiej mierze działające w danej populacji warunki środowiska wpływały na zmiany wielkości cech.

Zebrane dane (dotyczące noworodków, ich płodów, środowiska wewnątrzmacicznego, czynników matczynych) sukcesywnie włączałam do bazy danych utworzonej w programie Excel 97-2003, a obliczenia wykonałam w pakiecie programów statystycznych Statistica 8.0 (StatSoft.Inc. 2008 Statistica for Windows).

W opracowaniu wykorzystałam następujące metody statystyki matematycznej:

- ❖ test t-Studenta dla określenia istotności różnic między dwoma zmiennymi;
- ❖ test F-Fishera dla sprawdzenia jednorodności wariancji;
- ❖ test F w celu ujawnienia zróżnicowania wartości zmiennych zależnych pomiędzy wyróżnionymi kategoriami bliźniąt;
- ❖ test post-hoc w celu określenia pomiędzy, którymi kategoriami bliźniąt różnice dla danych zmiennych były istotne statystycznie;
- ❖ testy nieparametryczne chi- kwadrat Pearsona i test chi-kwadrat NW (największych wiarygodności) oraz korelację rang Spearmana dla oceny zależności pomiędzy pojedynczymi zmiennymi.

Dokonałam także graficznej interpretacji otrzymanych wyników w postaci różnego typu wykresów.

Wyniki przeprowadzonych badań zaprezentowałam w czterech podrozdziałach, dotyczących kolejno: pierwszy - oceny stanu rozwoju noworodków pochodzących z ciąży bliźniaczej; drugi - analizy zmienności fenotypowej cech somatycznych; trzeci - próby określenia siły relacji genotyp - środowisko i w ostatnim przedstawiłam nietypowe przypadki zróżnicowania bliźniąt monozygotycznych. Podstawowym warunkiem realizacji celu badań było dokonanie urodzeniowej charakterystyki noworodków z ciąży bliźniaczej z uwzględnieniem wieku płodowego, płci i zygotywności oraz stanu ogólnego (określonego skalą Apgar) a także przedstawienie biometrycznych parametrów badanych noworodków w zależności od patologii łożyska, matczynych czynników ryzyka i warunków środowiska wewnątrzmacicznego.

W celu oszacowania udziału czynników genetycznych i środowiskowych i ich oddziaływań na zmienność cech fenotypowych w okresie perinatalnym niezwykle pomocne okazało się ustalenie wielkości różnic wewnątrzparowych u bliźniąt monozygotycznych i dwuzygotycznych oraz określenie stopnia ich istotności.

Wielkość różnic wewnątrzparowych dla badanych cech somatycznych bliźniąt nie zależy od wieku płodowego, od płci ani od tzw. matczynych czynników zagrożenia. Wyniki analizy zróżnicowania wewnątrzparowego za pomocą testu t-Studenta u bliźniąt monozygotycznych i dwuzygotycznych (bez uwzględniania kosmówkowości) wskazują, że różnice wewnątrzparowe w wartościach badanych cech somatycznych z wyjątkiem masy ciała występują w całym badanym okresie prenatalnym na korzyść bliźniąt DZ, ale istotne statystycznie są tylko pod koniec rozwoju płodowego tzn. w 9 i 10 miesiącu księżycowym. Natomiast różnice wewnątrzparowe masy ciała zaznaczają się w 7 i 8 miesiącu na korzyść bliźniąt MZ, a w 9 i 10 miesiącu na korzyść bliźniąt DZ, ale są nieistotne statystycznie w całym badanym odcinku ontogenezy płodowej.

W literaturze brakuje wyczerpujących danych na temat kształtowania się zróżnicowania wewnątrzparowego wśród bliźniąt MZ i DZ w zależności od typów błon płodowych. Właściwie takich porównań dotychczas nie było, przynajmniej na odpowiednim, wyselekcjonowanym pod względem klinicznym, materiale bliźniąt. Jedynie postulowano, aby badania porównawcze dotyczyły tylko bliźniąt DZ i MZ z ciąży dwukosmówkowej i dwuowodniowej, bo obie grupy bliźniąt przebywają w oddzielnych kosmówkach i owodniach i wtedy mają porównywalne warunki rozwoju [Bergman i Sawicki 1988; Vlietinck et al. 1989; Van Baal i Boomsma 1998; Loos i wsp. 2005; Gielen et al. 2008; Touwslager et al. 2011].

Metoda bliźniąt jest metodą statystyczną, stąd też rzetelność i precyzja wyników bardzo istotnie zależy od liczebności i reprezentatywności materiału. Czynnikiem limitującym ilość materiału jest częstość urodzeń noworodków pochodzących z ciąży bliźniaczej. W Polsce ciąża bliźniacza występuje raz na 80 porodów. Bliźnięta MZ stanowią 30% wszystkich porodów bliźniaczych, a tylko 30 % bliźniąt MZ posiada oddzielne kosmówki i owodnie. Trudności z pozyskaniem odpowiednio licznego materiału są przyczyną braku tego typu porównań.

Aby zweryfikować wyniki dotychczasowych badań biologicznych dotyczące błon płodowych, które sugerują, że o podobnych warunkach środowiska wewnątrzmacicznego można mówić tylko w przypadku ciąży dwukosmówkowej, porównałam wielkość różnic wewnątrzparowych dla standaryzowanych cech somatycznych 4 grup bliźniąt:

- 1 - MZ1kzp - bliźnięta monozygotyczne pochodzące z ciąży jednokosmówkowej z zespołem „przetoczenia krwi między płodami” (TTTS),
- 2 - MZ1k (bez zp) - bliźnięta monozygotyczne z ciąży jednokosmówkowej bez zespołu TTTS,
- 3 - MZ2k - bliźnięta monozygotyczne z ciąży dwukosmówkowej,
- 4 - DZ - bliźnięta dwuzygotyczne.

Prześledziłam wielkość różnic wewnątrzparowych omawianych cech somatycznych w poszczególnych miesiącach księżycowych w zależności od warunków środowiska wewnątrzmacicznego i przedstawiłam je w postaci graficznej. Dokonanie analizy wielkości różnic wewnątrzparowych w miesiącach księżycowych (mimo zgromadzenia materiału badawczego w tygodniach płodowych) spowodowane było małą liczebnością par bliźniąt w niektórych tygodniach płodowych. Bliźnięta MZ z ciąży 1-kosmówkowej z zespołem „przetoczenia krwi między płodami” charakteryzowały się największymi różnicami wewnątrzparowymi dla wszystkich badanych cech, zwłaszcza dla masy ciała i obwodu klatki piersiowej. Różnice te spowodowane są rozbieżnym wzrostem płodów w efekcie jednokierunkowego transferu krwi od jednego z płodów do drugiego poprzez anastomozy tętniczo-żylnie występujące w przewlekłej postaci zespołu „przetoczenia krwi między płodami” - zespołu TTTS [Brennan et al. 1982; Blickstein 1990; Foley et al. 2000; Fick et al. 2006; Dias et al. 2010; Rossi and Prefumo 2013]. Według Malinowskiego i Ropackiej [2003] duża różnica mas ciała i obwodów klatki piersiowej oraz brzucha płodów jest jedną z charakterystycznych cech tego zespołu. Pod tym względem bliźnięta MZ z ciąży 1-kosmówkowej z zespołem TTTS istotnie statystycznie różnią się od pozostałych grup bliźniąt i to prawie w całym badanym odcinku ontogenezy płodowej. W kolejności wielkości różnic wewnątrzparowych drugą pozycję zajmują bliźnięta dwuzygotyczne, które to istotnie dystansują bliźnięta monozygotyczne z ciąży 1 i 2-kosmówkowej we wszystkich cechach pod koniec ciąży tzn. w 9 i 10 miesiącu płodowym. Tylko bliźnięta monozygotyczne z ciąży jednokosmówkowej bez zespołu „przetoczenia krwi między płodami” i bliźnięta monozygotyczne z ciąży dwukosmówkowej nie różniły się istotnie wielkością różnic w-parowych badanych cech, osiągając najmniejsze ich wartości w całym okresie płodowym. Świadczy to właśnie o tym, że różnicujący wpływ środowiska wewnątrzmacicznego nie jest związany z liczbą kosmówek, lecz z wystąpieniem zespołu „przetoczenia krwi między płodami”.

Z kolei bliźnięta DZ i MZ z ciąży 2-kosmówkowej i 2-owodniowej, pod względem warunków środowiska w-macicznego różnią się jedynie liczbą łożysk tzn. rozwijają się w ciąży z dwoma oddzielnymi łożyskami lub w ciąży z jednym złączonym łożyskiem. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wykazały brak wpływu liczby łożysk w ciąży bliźniaczej 2-kosmówkowej na wielkość różnic w-parowych cech somatycznych.

Do określenia wielkości i kierunku zmian różnic wewnątrzparowych u bliźniąt zastosowałam trzy warianty metod statystycznych: metody oparte na różnicach liniowych, metody oparte na kwadratach różnic i metody oparte na iloczynach różnic.

Zarówno względne różnice wewnątrzparowe jak i wariancje wewnątrzparowe badanych cech są zdecydowanie większe w grupie bliźniąt dwuzygotycznych, co oczywiście wskazuje na większą zmienność wewnątrzparową tych bliźniąt. Różnice występujące między wariancjami cech bliźniąt MZ i DZ są statystycznie istotne. Taka sytuacja występuje w okresie od 8 do 10 miesiąca życia płodowego zarówno u płci męskiej jak i żeńskiej. Świadczy to o zdecydowanej przewadze komponentu genetycznego nad komponentem środowiskowym w zmienności badanych cech. Zwiększanie się wraz z wiekiem płodowym wariancji w parach bliźniąt MZ, które można zinterpretować jako narastanie efektów powodowanych przez czynniki środowiskowe występuje tylko dla masy ciała i szerokości barków bliźniąt płci żeńskiej. Jednak wyłącznie dla masy ciała wariancje między 7 i 8, 8 i 9 oraz 9 i 10 miesiącem zwiększają się w sposób istotny statystycznie.

Wariancja genetyczna $V_{(DZ)} - V_{(MZ)}$, która jest miarą polimorfizmu genetycznego rozumianego jako różnorodność fenotypowa zależna od czynników genetycznych, jest dla wszystkich badanych cech (z wyjątkiem długości ciemieniowo-siedzeniowej) większa u bliźniąt płci męskiej niż bliźniąt płci żeńskiej. W grupie ogółu bliźniąt wariancje genetyczne zwiększają się wraz z wiekiem płodowym dla masy ciała i szerokości barków. Zaobserwowana zwiększająca się między 7 a 10 miesiącem księżycowym różnorodność fenotypowa tych cech, jest wynikiem prawdopodobnie większego udziału wkładu genetycznego poligenów w wartość fenotypową. Polimorfizm pozostałych cech w rozwoju płodowym jest bardziej stabilny.

Kolejną zastosowaną przeze mnie metodą do oszacowania różnic wewnątrzparowych był współczynnik korelacji wewnątrzparowej. Współczynniki korelacji wewnątrzparowej dla wszystkich badanych cech u bliźniąt MZ są istotnie większe niż u bliźniąt DZ. Wartości ich są niezwykle wysokie, bo wahają się w przedziale 0,85-0,94. Świadczy to o tym, że udział komponentu genetycznego w kształtowaniu się zmienności poszczególnych cech w omawianej

fazie rozwoju jest bardzo duży, a ich wrażliwość na oddziaływania czynników środowiskowych specyficznych jest relatywnie mała. W grupie bliźniąt DZ niższe wartości współczynników korelacji wewnątrzparowej, mieszczące się w przedziale 0,71 - 0,81 świadczą o większym udziale czynników modyfikujących cechy somatyczne.

W trakcie badanej ontogenezy płodowej między 7 a 10 miesiącem wartości współczynników korelacji wewnątrzparowej w grupie bliźniąt MZ zmieniają się nieznacznie, zwiększając się lub zmniejszając. Na podstawie otrzymanych wyników trudno jest jednoznacznie wnioskować na temat modyfikującej roli środowiska na bliźnięta MZ. Można chyba jednak uznać, że wewnątrzparowe zróżnicowanie środowisk u bliźniąt MZ jest w badanym czasie względnie stałe. Niewielkie zróżnicowanie między cechowe współczynników r_{MZ} oznacza, że na takie same czynniki środowiskowe różne cechy reagują z niejednakową wrażliwością (niejednakowe progi ekosensytywności poszczególnych cech).

Natomiast u bliźniąt DZ wartości współczynników korelacji wewnątrzparowej wykazują wraz z wiekiem płodowym tendencję spadkową (najmniejsze wartości w 10 miesiącu), zwłaszcza dla masy ciała, która należy do cech środowiskowo labilnych. W końcowym okresie rozwoju płodowego współczynniki r_{DZ} dla większości badanych cech oscylują wokół wartości 0,5 a nawet 0,4. Zakładając brak składnika dominacji determinacji poligenicznej w odniesieniu do omawianych cech antropometrycznych należy przyjąć, że obniżenie się współczynników r_{DZ} poniżej wartości 0,5 spowodowane jest zwiększoną w tym okresie interakcją lub korelacją genotyp-środowisko.

Udział komponentu genetycznego i środowiskowego w kształtowaniu wielkości cechy ilościowej oceniałam na podstawie wskaźników odziedziczalności. Analiza współczynników determinacji genetycznej h^2 (opartych na wariacjach wewnątrzparowych [Bergman 1987]) oraz współczynników H (opartych na korelacjach wewnątrzparowych [Bergman 1987]) pokazuje, że wszystkie omawiane w pracy cechy somatyczne charakteryzuje dość wysoki stopień odziedziczalności, czyli w zmienności fenotypowej tych cech przeważa udział składnika genetycznego nad udziałem składnika środowiskowego. Świadczą o tym wysokie wartości współczynników h^2 – tj. od 0,72 do 0,82 i współczynników H – tj. od 0,69 do 0,80. Spośród badanych cech największym stopniem odziedziczalności charakteryzują się masa ciała i szerokość barków.

Współczynniki H i h^2 nie wykazują, poza pewnymi wyjątkami wyraźniejszych zmian kierunkowych z wiekiem, a jedynie bezkierunkowe wahnięcia w niewielkim zakresie. W 7 i

częściowo w 8 miesiącu życia płodowego współczynniki h^2 badanych cech są większe od współczynników H , ale w dalszym rozwoju prenatalnym, w grupie bliźniąt żeńskich współczynniki te wartością zbliżają się do siebie, a w przypadku masy ciała i szerokości barków współczynnik H jest nawet większy niż h^2 . Zwiększanie się wartości współczynników H w trakcie ontogenezy płodowej spowodowany jest malejącymi w tym okresie wartościami współczynników korelacji wewnątrzparowej badanych cech u bliźniąt DZ. To zjawisko jest efektem zwiększającej się w tym okresie korelacji genotyp-środowisko.

Interpretując współczynniki odziedziczalności powinniśmy mieć świadomość, że niespełnienie założeń metody bliźniąt ma „deformujący” wpływ na ich wielkość. Wysokie wartości obliczonych przeze mnie współczynników odziedziczalności prawdopodobnie w pewnym stopniu wynikają z niespełnienia założeń metody bliźniąt.

Wyniki moich badań kwestionują założenie o addytywności wpływów genetycznych i środowiskowych traktując je jako zbyt duże uproszczenie. Nie można przecież analizując wariację fenotypową cechy, pominąć lub wręcz ignorować w jej składzie wariacji interakcji i kowariancji genotyp-środowisko. Bo to właśnie ich efekty zwiększają wariację genetyczną, a więc przyczyniają się do zwiększenia wartości współczynników odziedziczalności.

Populacja, z której pochodziły badane przeze mnie bliźnięta charakteryzuje się dość wysokim stopniem odziedziczalności cech somatycznych. Prawdopodobnie odejmując wariację V_{MZ} od wariacji V_{DZ} , uzyskałam zawyżoną wariację genetyczną, z której komponent środowiskowy niecałkowicie został wytracony. Podobnie obliczone współczynniki r_{DZ} w końcowym okresie ontogenezy płodowej są często niższe od wartości 0,5, która to stanowi wielkość teoretycznej korelacji genetycznej dla bliźniąt DZ. Właśnie w współczynnikach r_{DZ} , w pierwszym rzędzie odzwierciedlają się odchylenia od modelu addytywnego.

Na podstawie przeglądu literatury można stwierdzić, że współczynnik odziedziczalności masy ciała w momencie urodzenia jest stosunkowo niski i zwiększa się w trakcie rozwoju, przyjmując większe wartości w kolejnych jego etapach [Lunde i wsp.2007; Johnson i wsp. 2011; Mook-Kanamori i wsp. 2012; Dubois i wsp. 2012]. Badania Johnson i współautorów określiły odziedziczalność masy ciała w momencie urodzenia na 38% a po 3 miesiącach oszacowanie wzrosło i wynosiło 62%. Wyniki tego badania wskazują, że spowodowana wpływami środowiskowymi zmienność w zakresie urodzeniowej masy ciała jest przede wszystkim efektem oddziaływania czynników unikalnych dla każdego noworodka.

Unikalny wpływ czynników środowiskowych na urodzeniową masę ciała może być silniejszy z uwagi na fakt, iż parametry łożyskowe determinujące transfer składników odżywczych (w tym typ łożyska, zrośnięcie łożysk, oraz centralny lub obwodowy przyczep sznura pępowinowego) mogą odpowiadać za zróżnicowanie tego parametru wśród bliźniąt MZ - pomimo, iż posiadają one wspólny garnitur genetyczny i współdzielą łożysko [van Baal i wsp. 1998; Loos i wsp. 2005]. Uwzględnienie w analizie bliźniąt poprawki na indywidualną zmienność czynników łożyskowych zaowocowało zwiększeniem stopnia odziedziczalności urodzeniowej masy ciała [Gielen i wsp. 2008]. Dość wysoki stopień odziedziczalności masy ciała uzyskany w moich badaniach jest prawdopodobnie konsekwencją odpowiednio dobranego materiału badawczego. Badane bliźnięta monozygotyczne charakteryzowały się jednakowymi warunkami środowiska wewnątrzmacicznego. Ponadto wysoki poziom odziedziczalności może być spowodowany występowaniem interakcji i korelacji genotyp-środowisko, w efekcie których nastąpiło powiększenie szeroko pojętej wariancji genetycznej.

Chcąc uzyskać informację o tym na ile zróżnicowanie genotypów decyduje o różnicach fenotypowych oraz w jakiej mierze działające w populacji badanych bliźniąt warunki środowiska mogą wpływać na zmiany wielkości cech obliczyłam współczynniki polimorfizmu genetycznego i ekosensytywności.

Dla badanych cech z wyjątkiem masy ciała różnice międzypłciowe i międzycechowe w wartościach tych współczynników są niewielkie. Największe wartości zarówno współczynnika polimorfizmu genetycznego (P_g) jak i współczynnika ekosensytywności (D_e) przypadają dla masy ciała, a najmniejsze dla obwodu głowy.

Dokonując porównania międzycechowego można zauważyć, iż cechy bardziej „wieloskładnikowe” tzn. ujmujące w swej wielkości ukształtowanie większej liczby elementów organizmu, w szczególności rozmaitych elementów tkankowych charakteryzuje zarówno większa ekosensytywność jak i większy polimorfizm genetyczny. Dzieje się tak, dlatego, że przy większej liczbie różnorodnych składników ujawnia się większa liczba efektów genów oraz sumuje się więcej różnorodnych oddziaływań środowiska. Im „prostsza” cecha, tym na ogół mniejszy jej polimorfizm i ekosensytywność. Zdecydowanie największym polimorfizmem genetycznym charakteryzuje się masa ciała. Pomiar tej cechy informuje o łącznym efekcie wszystkich genów decydujących o masie wszelkich tkanek ciała. W przypadku większej liczby loci i alleli, z większym prawdopodobieństwem można oczekiwać, iż wystąpi większa liczba ich kombinacji. Kontynuując to rozumowanie, można również wytłumaczyć większą

ekosensytywność cech wieloskładnikowych. Jeżeli przyjmiemy, że efekt działania każdego z alleli determinujących daną cechę może zostać zmodyfikowany przez warunki środowiska w trakcie epigenetyki o taką samą frakcję swojej wielkości, to łatwo zrozumieć, że „złożenie” takich efektów dla większej liczby loci da w wyniku większą różnorodność wariantów niż wówczas, gdy ma się do czynienia z niedużą liczbą genów.

W badanym odcinku ontogenezy prenatalnej, generalnie wartości współczynników P_g dla wszystkich cech są większe niż wartości współczynników D_e , co świadczy o tym, że zmienność omawianych cech jest spowodowana czynnikami genetycznymi w większym stopniu niż środowiskowymi.

Analiza porównawcza wartości współczynników P_g i D_e w poszczególnych miesiącach badanej ontogenezy płodowej potwierdziła, że ekosensytywność i polimorfizm genetyczny cech somatycznych w tym okresie rozwoju są względnie stabilne. Można zauważyć, szczególnie w grupie bliźniąt płci żeńskiej nieznaczną tendencję zmniejszania się z wiekiem płodowym wartości współczynników P_g i zwiększania wartości współczynników D_e .

Na koniec, aby weryfikować poprawność zastosowanych metod porównałam współczynniki polimorfizmu genetycznego (P_g) i ekosensytywności (D_e) badanych cech ze średnimi odchyleniami względnymi $d\%$ MZ i $d\%$ DZ, które można również traktować jako miary ekosensytywności i zróżnicowania genetycznego cechy. Graficzne obrazy w postaci wykresów liniowych współczynników P_g i D_e i średnich odchyleń względnych $d\%$ MZ i $d\%$ DZ są do siebie podobne. Na wykresach porównano krzywe zmienności P_g i D_e oraz $d\%$ MZ i $d\%$ DZ w zależności od wieku płodowego. Widoczna była duża zgodność w przebiegu odpowiednich krzywych.

Porównanie to potwierdziło zgodność wyników tych dwóch metod szacowania komponentów genetycznego i środowiskowego zmienności fenotypowej cech somatycznych.

Paradygmat genetyki jako klucza do ludzkiego zdrowia, wyglądu czy zachowania, ogólnie mówiąc do sukcesu życiowego niewątpliwie dominuje obecnie w publicznej świadomości. Metafora „genu na” jakąś cechę (np. raka piersi, nadpobudliwość, talent muzyczny lub inteligencję) jest jednak obecnie bardzo nadużywana. Bardzo często zapominamy, że istnienie różnic między genotypami może (w sensie statystycznym), tłumaczyć tylko pewną frakcję zmienności w danej cesze.

Kiedy mówimy o genetycznym wpływie na fenotyp cechy, musimy pamiętać o tym, że jakkolwiek informacje zakodowane w strukturze DNA wywierają taki wpływ, to mamy jednak

do czynienia ze złożonym wpływem pośrednim. Każdy gen koduje specyficzną sekwencję aminokwasów, z których powstają białka wchodzące w interakcję z fizjologicznymi czynnikami pośredniczącymi, takimi jak hormony czy neuroprzekaźniki. Te procesy powodują ukształtowanie się cechy, ale ostateczny kierunek jej rozwoju będzie zależał od wielu złożonych czynników zarówno genetycznych, jak i środowiskowych, wpływających na siebie wielokierunkowo.

Elementy środowiska wpływają modyfikująco nawet na cechy o wysokim stopniu odziedziczalności. Czynniki środowiskowe mogą sprzyjać ujawnianiu się różnic genetycznych i wtedy odziedziczalność będzie względnie wysoka albo odwrotnie, jeśli środowisko nie sprzyja ekspresji genetycznej, odziedziczalność danej cechy będzie stosunkowo niska.

Wobec powyższego, nie ma wątpliwości, że pytanie o rolę genów i środowiska w kształtowaniu zmienności cech fenotypowych powinno brzmieć następująco: do jakiego stopnia różnice między ludźmi wynikają z różnic ich genotypów a do jakiego z różnic między środowiskami w jakich się urodzili i funkcjonowali. Ten różny udział genów i środowiska w kształtowaniu fenotypu jest osobniczo nieprzewidywalny, oznacza to, że ich wzajemny stosunek u każdego z nas jest inny i zmienny w czasie. Co ważne, wielkość interakcji w sensie statystycznym nie jest miarą mówiącą cokolwiek o fenotypie konkretnego osobnika, czyli o tym w jakim stopniu jego fenotyp zależy od genotypu, a w jakim zależy od warunków, które ten osobnik napotkał podczas swego rozwoju osobniczego. Efekty genotypowe i wpływów środowiskowych są w przypadku pojedynczej osoby splątane w sposób uniemożliwiający jakąkolwiek ich separację. Jest to niemożność immanentna, która wynika z natury procesów rozwojowych [Dawkins 1994], a nie z niedociągnięć metodologicznych lub słabości analiz statystycznych.

W oszacowaniu stopnia determinacji genetycznej danej cechy ilościowej metodą bliźniąt wariancja genetyczna tej cechy jest powiększona o wchodzącą w jej skład wariancję interakcji genotyp-środowisko (realizującą się przez związek ze środowiskiem). W tym kontekście trzeba mieć świadomość, że trudno będzie na pytanie o rolę genów i środowiska w kształtowaniu zmienności cech fenotypowych dać jednoznaczną odpowiedź, bo w różnicach genotypowych mamy zawarty przynajmniej częściowo udział środowiska wynikający z interakcji genotyp - środowisko.

Interakcja genotyp - środowisko jest nie tylko efektem statystycznym, ale ważnym zjawiskiem biologicznym, ponieważ ujawniają się w niej specyficzne przystosowania różnych

genotypów do różnych środowisk. Różnice (w wartości jakiejś cechy fenotypowej) między genotypami nie są stałe, lecz zależą od tego, w jakim środowisku te genotypy badamy - różnice mogą być znikome w jednym środowisku i bardzo wyraźne w innym środowisku. Sens interakcji polega na tym, że nie możemy jednoznacznie określić jaki genotyp jest “najlepszy”, ponieważ kolejność na “liście rankingowej” genotypów zależy od tego w jakim środowisku taki ranking przeprowadzamy.

Najnowsze badania nad bliźniętami pozwoliły naukowcom na wyciągnięcie radykalnych wniosków: geny i środowisko nie są jedynymi siłami oddziaływującymi na człowieka. Zgodnie z odkryciami epigenetyki - trzeba brać pod uwagę trzeci czynnik. W pewnych przypadkach spełnia on funkcję pomostu między środowiskiem i genami, a w innych samodzielnie oddziałuje na kształt cech.

Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły na sformułowanie ogólnych wniosków:

- ❖ **Prawidłowe oszacowanie wkładu czynników genetycznych i środowiskowych oddziaływań w zmienność cech fenotypowych w okresie perinatalnym, na podstawie badań rozwoju bliźniąt wymaga odpowiednio licznego, udokumentowanego klinicznie i specjalnie wyselekcjonowanego materiału badawczego o bezbłędnie oznaczonej zygotyczności i typie błon płodowych. Materiał bliźniąt DZ jednopłciowych w obrębie pary i bliźniąt MZ pochodzących z ciąży jedno lub dwukosmówkowej, ale bez zespołu TTTS z całą pewnością zapewnia porównywalność warunków środowiska wewnątrzmacicznego i warunkuje precyzyjne wyniki analiz różnic wewnątrzparowych bliźniąt.**
- ❖ **Współczynnik odziedziczalności nie informuje dosłownie o wpływie dziedziczności na kształtowanie się danej cechy, informuje on jedynie o względnym udziale zmienności genotypowej w zmienności fenotypowej cechy i wymaga właściwej interpretacji. W przypadku odchyień od modelu addytywnego i pozostałych założeń posługiwanie się nimi może być obarczone dużym błędem i traci sens.**
- ❖ **W zmienności fenotypowej cech somatycznych noworodków pochodzących z ciąży bliźniaczej przeważa udział składnika genetycznego nad udziałem składnika środowiskowego. Różnorodność fenotypowa zależna od czynników genetycznych jest większa u bliźniąt płci męskiej niż u bliźniąt płci żeńskiej.**

- ❖ W badanym odcinku ontogenezy prenatalnej polimorfizm genetyczny i ekosensytywność cech somatycznych są względnie stabilne. Jedynie dla masy ciała wraz z wiekiem płodowym nieznacznie zwiększa się udział wkładu genetycznego poligenów w wartość fenotypową oraz następuje niewielkie narastanie efektów powodowanych przez czynniki środowiskowe.
- ❖ Jednoznaczne określenie roli genów i środowiska w kształtowaniu zmienności cech fenotypowych jest bardzo trudne, ponieważ w różnicach genotypowych zawiera się udział środowiska wynikający z interakcji genotyp-środowisko. Te wzajemne złożone zależności występujące pomiędzy genotypem i środowiskiem wywierają wysoce istotny wpływ na kształtowanie się cech somatycznych człowieka.

Wartości poznawcze i aplikacyjne wyników moich badań stanowiących osiągnięcie naukowe:

Uzyskane przeze mnie wyniki analiz różnic wewnątrzparowych bliźniąt, sądzę, że wypełniają lukę istniejącą w zakresie wiedzy na temat zmienności cech ilościowych. Pokazują one, że czynnikiem wpływającym na zróżnicowanie wewnątrzparowe wśród bliźniąt MZ nie jest liczba kosmówek, lecz występowanie zespołu „przetoczenia krwi między płodami”. Analiza różnic wewnątrzparowych u bliźniąt jedno i dwuzygotycznych pozwoliła na określenie wzajemnych proporcji między zmiennością genetyczną i środowiskową. Analiza tej zmienności prowadzona w zależności od tygodnia ciąży, płci i matczynek czynników ryzyka (oznaczonych dla każdego z bliźniąt) umożliwiła określenie zakresów i kierunków stopnia odziedziczalności cech, jej stałości lub zmienności w czasie. Zmiany poziomu odziedziczalności wynikają ze złożonej zależności (korelacji i interakcji) pomiędzy genotypem a środowiskiem, wywierającej istotny wpływ na rozwój człowieka.

Podsumowując, wyniki prezentowane jako osiągnięcie habilitacyjne w znaczący sposób poszerzyły wiedzę dotyczącą determinacyjnego aspektu rozwoju ontogenetycznego wyrażającego się współdziałaniem czynników genetycznych i środowiskowych. Są punktem wyjścia do dalszych badań, w tym epigenetycznych, rzucających nowe światło na temat mechanizmów rozwojowych, co w efekcie pozwoli na pełne zrozumienie kontroli rozwoju.

Duże zainteresowanie antropologów i środowisk medycznych wynikami moich badań zawartymi w monografii i prezentowanymi na konferencjach, wiąże z faktem, że dotyczą one zagadnień istotnych w rozwoju człowieka, a rzadko podejmowanych ze względu na trudności

z uzyskaniem materiału badawczego (płody i noworodki ciąży mnogiej) oraz ze względu na konieczne, kosztowne badania genetyczne. Dokonanie oceny stanu biologicznego płodów i noworodków pochodzących z ciąży bliźniaczej na podstawie tak licznych danych antropometrycznych, patomorfologicznych dotyczących popłodu, serologicznych oraz ankietowych pochodzących z wywiadu prowadzonego z rodzającymi matkami, uznaję za walor poznawczy mojej monografii. W ten sposób opracowany, liczny materiał badawczy stanowi podstawę do weryfikacji aspektów auksologii człowieka. Uzyskane wyniki mają nie tylko znaczenie poznawcze, mogą również być wykorzystane przez praktyków w antropologii, medycynie prenatalnej i perinatalnej. Znaczenie aplikacyjne wyników moich badań upatruję w:

- ❖ przetestowaniu różnych metod analizy polimorfizmu DNA pod kątem oznaczania zygotywności bliźniąt i wyborze tej najbardziej wiarygodnej. Najlepsze wyniki dla określania zygotywności uzyskuje się po wykonaniu jednej analizy multi locus i dwóch analiz pojedynczego locus metodą hybrydyzacji. Diagnostyka bliźniąt w oparciu o badania DNA nie tylko daje jednoznaczną odpowiedź na temat zygotywności bliźniąt, ale również poszerza naszą wiedzę na temat mechanizmów powstawania ciąż bliźniaczych i może być wykorzystana się w transplantacji oraz daje możliwość wychwycenia różnic fenotypowych mimo jednozygotywności (badania CNV);
- ❖ monitorowaniu stanu płodów z ciąży 1-kosmówkowej jako niezwykle istotnego elementu intensywnej opieki w medycynie perinatalnej;
- ❖ ujawnieniu zjawiska mikrochimeryzmu dla kilku par bliźniąt – istotne w poszukiwaniu roli mikrochimeryzmu w badaniach klinicznych (w terapii chorób immunologicznych);
- ❖ wykorzystaniu badań bliźniąt monozygotywnych do poznania nieznanej jeszcze roli genomu mitochondrialnego w zróżnicowaniu międzyosobniczym (na to pozwala bezbłędne oznaczenie typu zygotywności i kosmówkowości);
- ❖ możliwości skorelowania wyników badań molekularnych z dalszym monitorowaniem bliźniąt co umożliwi wyciągnięcie wniosków pozwalających na wczesne wykrywanie zaburzeń rozwojowych w ciążach mnogich.

4.4. Spis piśmiennictwa zastosowanego w opisie osiągnięcia naukowego:

1. Adams K.A., Nelson J.L., 2004: Microchimerism: An investigative frontier in autoimmunity and transplantation. *JAMA*, 291: 1127-1131.
2. Arey L.B., 1965: Developmental anatomy. A textbook and laboratory manual of embryology. Philadelphia, London.
3. Awgulewitsch A., 2003: Hox in hair growth and development. *Naturwissenschaften*, 90(5): 193-211.
4. Baudisch F., Draaken M., Bartels E., Schmiedeke E., Bagci S., Bartmann P., Nöthen M.M., Ludwig M., Reutter H., 2013: CNV analysis in monozygotic twin pairs discordant for urorectal malformations. *Twin Res Hum Genet*, 16(4): 802-807.
5. Bergman P., 1987: Zagadnienie genetycznej determinacji rozwoju w okresie pokwitania. *MPA*, 108: 165-216.
6. Bergman P., Sawicki K., 1988: Zarys metody bliźniąt. [W:] P. Bergman (red.) *Bliźnięta wrocławskie T.1. Materiały i Prace Antropologiczne*, 108: 11-50.
7. Bielańska – Osuchowska Z., 2004: Zarys organogenezy. PWN, Warszawa.
8. Blickstein I., 1990: The twin-twin transfusion syndrome. *Obstetrics & Gynecology*, 76: 714-722.
9. Boomsma D.I., Martin N.G., 2002: Gene-environment interactions. [In:] H. D'Haenen, J.A. den Boer, P. Willner (red.), *Biological Psychiatry*, Wiley, London-New York: 181-187.
10. Brennan J.N., Diwan R.V., Rosen M.G., Bellon E.M., 1982: Feto-fetal transfusion syndrome: Prenatal ultrasonographic diagnosis. *Radiology*, 14: 535-536.
11. Bruder C.E.G., Piotrowski A., Gijsbers A.C.J., Andersson R., Erickson S., Diaz de Ståhl T., Menzel U., Sandgren J., von Tell D., Poplawski A., Crowley M., Crasto C., Partridge E.C., Tiwari H., Allison D.B., Komorowski J., van Ommen G.J.B., Boomsma D.I., Pedersen N.L., den Dunnen J.T., Wirdefeldt K. and Dumanski J.P., 2008: Phenotypically concordant and discordant monozygotic twins display different DNA copy-number-variation profiles. *Am. J. Hum. Genet.*, 82(3): 763-771.
12. Dawkins R., 1994: Ślepy zegarmistrz, czyli jak ewolucja dowodzi, że świat nie został zaplanowany. Państwowy Instytut Wydawniczy, Warszawa.

13. Dias T., Mahsud-Dornan S., Bhide A., Papageorghiou A.T., Thilaganathan B., 2010: Cord entanglement and perinatal outcome in monoamniotic twin pregnancies. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 35: 201-204.
14. Dubois L., Ohm Kyvik K., Girard M., Tatone-Tokuda F., Pérusse D., Hjelmberg J., Skytthe A., Rasmussen F., Wright M.J., Lichtenstein P., Martin N.G., 2012: Genetic and Environmental Contributions to Weight, Height, and BMI from Birth to 19 Years of Age: An International Study of Over 12,000 Twin Pairs. *PLoS One*, 7(2): e30153.
15. Ehli E.A., Abdellaoui A., Hu Y., Hottenga J.J., Kattenberg M., van Beijsterveldt T., Bartels M., Althoff R.R., Xiao X., Scheet P., de Geus E.J., Hudziak J.J., Boomsma D.I., Davies G.E., 2012: De novo and inherited CNVs in MZ twin pairs selected for discordance and concordance on Attention Problems. *Eur J Hum Genet*, 20(10): 1037-43.
16. Erson A.E., Petty E.M., 2008: MicroRNAs in development and disease. *Clin Genet* 2008, 74(4): 296-306.
17. Evsikov A.V., Graber J.H., Holbrook A.E., Hampl A., Oh B., Eppig J.J., Solter D., Knowles B.B., 2006: Cracking the egg: molecular dynamics and evolutionary aspects of the mouse oocyte-to-embryo transition. *Genes and Development*, 20: 2713-2727.
18. Fick A.L., Feldstein V.A., Norton M.E., Wassel Fyr C., Caughey A.B., Machin G.A., 2006: Unequal placental sharing and birth weight discordance in monochorionic diamniotic twins. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 195: 178-183.
19. Filip M., 2010: The role of homeotic genes selected and morphogens in the processes of neurogenesis and development of the cranial skeleton of vertebrates for example mouse. *Acta Mygenica*, 2: 28-37.
20. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C., 1998: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806-811.
21. Fletcher H. L., Hickey G.I., Winter P.C., 2008: *Genetyka*. PWN, Warszawa.
22. Foley D.L., Neale M.C., Kendler K.S., 2000: Does intra-uterine growth discordance predict differential risk for adult psychiatric disorder in a population-based sample of monozygotic twins? *Psychiatric Genetics*, 10: 1–8.
23. Fraga M.F., Ballestar E., Paz M.F., Ropero S., Setien F., Ballestar M.L., Heine-Suñer D., Cigudosa J.C., Urioste M., Benitez J., Boix-Chornet M., Sanchez-Aguilera A., Ling

- C., Carlsson E., Poulsen P., Vaag A., Stephan Z., Spector T.D., Wu Y.Z., Plass C., Esteller M., 2005: Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci, U S A*, 102(30): 10604-9.
24. Francis D.D., Szegda K., Campbell G., Martin W.D., Insel T.R., 2003: Epigenetic sources of behavioral differences in mice. *Nat Neurosci*, 6(5): 445-6.
25. Gielen M., Lindsey P.J., Derom C., Smeets H.J., Souren N.Y., Paulussen A., Derom R., Nijhuis J.G., 2008: Modeling genetic and environmental factors to increase heritability and ease the identification of candidate genes for birth weight: a twin study. *Behav Genet*, 38: 44–54.
26. Gordon L., Joo J.H., Andronikos R., Ollikainen M., Wallace E.M., Umstad M.P., Permezel M., Oshlack A., Morley R., Carlin JB, Saffery R, Smyth GK, Craig JM., 2011: Expression discordance of monozygotic twins at birth: effect of intrauterine environment and a possible mechanism for fetal programming. *Epigenetics*, 6(5): 579-92.
27. Haque F.N., Gottesman I.I., Wong A.H., 2009: Not really identical: epigenetic differences in monozygotic twins and implications for twin studies in psychiatry. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 151C(2): 136-41.
28. Henneberg M., Lewicki P.K.T., 1978: Ekosensytywność cech metrycznych-próba innego ujęcia metodycznego. *Przegląd Antropolog*, 44, 1: 87-102.
29. Hoskins H.A., Carlson J.W., Kennedy J.W., Acevedo D., Evans-Holm M., Frise E., Wan K.H., Park S., Mendez-Lago M., Rossi F., Villasante A., Dimitri P., Karpen G.H., Celniker S.E., 2007: Sequence finishing and mapping of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Science*, 316: 1625-1628.
30. Johnson L., Llewellyn C.H., van Jaarsveld C.H.M., Cole T.J., Wardle J., 2011: Genetic and Environmental Influences on Infant Growth: Prospective Analysis of the Gemini Twin Birth Cohort. *PLoS ONE*, 6(5): e19918.
31. Kruczek K., 2010: Mikro RNA-znaczenie w terapii genowej. *Acta Mygenica*, 2: 48-63.
32. Loos R.J., Derom C., Derom R., Vlietinck R., 2005: Determinants of birthweight and intrauterine growth in liveborn twins. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 19: 115–22.
33. Lunde A., Melve K.K., Gjessing H.K., Skjaerven R., Irgens L.M., 2007: Genetic and Environmental Influences on Birth Weight, Birth Length, Head Circumference, and Gestational Age by Use of Population-based Parent-Offspring Data. *American Journal of Epidemiology*, 165: 734–741.

34. Malinowski W., Ropacka M., 2003: Twin-to-twin transfusion syndrome. [W:] G. Bręborowicz, W. Malinowski, E. Ronin-Walknowska (red.), Ciąża wielopłodowa. OWN, Poznań: 195–222.
35. Martin, R., 1988. Anthropologie. Handbuch der Vergleichenden Biologie des Menschen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
36. Mook-Kanamori D.O., van Beijsterveldt C.E., Steegers E.A., Aulchenko Y.S, Raat H., Hofman, Eilers P.H., Boomsma D.I., Jaddoe V.W., 2012: Heritability estimates of body size in fetal life and early childhood. PLoS One, 7(7): e39901.
37. Peaston A.E., Evsikov A.V., Graber J., de Vries W.N., Solter D., Knowles B.B., 2004: Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. Developmental Cell, 7: 597-606.
38. Peaston A.E., Knowles B.B., Hutchison K., 2007: Genome constancy and plasticity during the oocyte to embryo transition. Human Fertility, 10: 55-69.
39. Pena S.D.J., Chacabarty R., Epplen J.T., 1992: DNA fingerprinting. Birkhauser Verlag, Basel.
40. Plomin R., DeFries J.C., McClearn G.E., McGuffin P., 2001: Genetyka zachowania. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
41. Pruett N.D., Visconti R.P., Jacobs D.F., Scholz D., McQuinn T., Sundberg J.P., Awgulewitsch A., 2008: Evidence for Hox-specified positional identities in adult vasculature. BMC Dev Biol, 8:93.
42. Rossi A.C., Prefumo F., 2013: Impact of cord entanglement on perinatal outcome of monoamniotic twins: a systematic review of the literature. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, 41: 131-135.
43. Silva S., Martins Y., Matias A., Blickstein I., 2011: Why are monozygotic twins different? J Perinat Med, 39(2): 195-202.
44. Słomski R., Kowalska K., Jura J., 2004: Analiza powtórzeń minisatelitarnych w DNA. [W:] R. Słomski (red.) Przykłady analiz DNA, AR, Poznań: 160-167.
45. Souter V.L., Parisi M.A., Nyholt D.R., Kapur R.P., Henders A.K., Opheim K.E., Gunther D.F., Mitchell M.E., Glass I.A., 2007: Montgomery GW. A case of true hermaphroditism reveals an unusual mechanism of twinning. Hum Genet, 121(2): 179-85.

46. Stiles J., 2011: Brain development and the nature versus nurture debate. *Progress in Brain Research*, 189: 3-22.
47. Śliwa L., 2009: Microchimerism a potential cause of autoimmune diseases. *Medycyna Rodzinna*, 2: 25-28.
48. Tamaki K., Jeffreys A.J., 2005: Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing. *Leg Med, Tokyo*, 7: 244-50.
49. Touwslager R.N.H., Gielen M., Derom C., Mulder A.L.M., Gerver W.J.M., Zimmermann L.J., Houben A.J., Stehouwer C.D., Vlietinck R., Loos R.J., Zeegers M.P., 2011: Determinants of infant growth in four age windows: a twin study. *Journal of Pediatrics*, 158: 566-572.
50. Ubich C., Kuehbacher A., Dimmeler S., 2008: Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovascular Research*, 79(4): 581-588.
51. Van Baal C.G., Boomsma D.I., 1998: Etiology of individual differences in birth weight of twins as a function of maternal smoking during pregnancy. *Twin Res*, 1: 123–130.
52. Vlietinck R., Derom R., Neale M.C., Maes H., van Loon H., Derom C., Thiery M., 1989: Genetic and environmental variation in the birth weight of twins. *Behavior Genetics*, 19: 151-161.
53. Wielgus K., Szalata M., Napierała D., Słomski R., 2004: Polimorfizm mitochondrialnego DNA człowieka. [W:] R. Słomski (red.), *Przykłady analiz DNA*, AR Poznań: 150-159.
54. Wielgus K., Waszak M., Cieślik K., Słomski R., Szalata M., Kempniak J., Bręborowicz G., 2008: Determining zygosity in studies of twins. *Pol J Environ Stud*, 17: 440-445.
55. Williams A.E., 2008: Functional aspects of animal microRNAs. *Cell Mol Life Sci*, 65: 545-562.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

5.1. Działalność naukowo – badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Na mój dorobek naukowy, poza monografią zaprezentowaną jako osiągnięcie naukowe wykazane w punkcie 4. Autoreferatu, składa się 59 oryginalnych prac naukowych, w tym 15 opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (Lista A MNiSW), 25 prac z listy B MNiSW, 4 publikacji anglojęzycznych w recenzowanym czasopiśmie spoza w/w baz, 4 artykułów opublikowanych jako rozdziały w monografiach anglojęzycznych i 10 w monografiach w języku polskim oraz 1 skryptu dydaktycznego.

Zdecydowanie podstawowy kierunek moich zainteresowań naukowych stanowią **badania dotyczące rozwoju i zmienności organizmu człowieka w okresie płodowym**. Jest to specyficzny okres w rozwoju człowieka, trudno dostępny do badań i z tego powodu wciąż jeszcze, pomimo ogromnego postępu, jest najmniej poznany etapem w jego rozwoju.

W 1990 roku, będąc pracownikiem Zakładu Anatomii, włączyłam się do badań prowadzonych przez dr hab. Krystynę Cieślik, również, tak jak i ja będącej antropologiem. W ramach działalności statutowej Zakładu kontynuowałyśmy tematykę: „**Badanie prawidłowości dotyczących rozwoju płodowego człowieka**”. Rozpoczęłam sukcesywnie gromadzić na terenie Kliniki Perinatologii i Ginekologii ówczesnej AM materiał badawczy martwo urodzonych płodów oraz noworodków żywo urodzonych, które jednak zmarły w ciągu 24 godzin. Było to możliwe dzięki podjęciu współpracy z tą jednostką naukową. Wstępna analiza zbieranych oddzielnie dla płodów płci męskiej i żeńskiej, danych dotyczących rozwoju somatycznego, sugerująca istnienie różnic płciowych, skłoniła mnie do szczegółowego przesiedzenia materiału badawczego pod tym właśnie kątem. Znajomość problemu kształtowania się dymorfizmu płciowego w trakcie rozwoju wewnątrzmacicznego człowieka była powierzchowna i stanowiła otwarty problem. Potwierdzały to nieliczne i sprzeczne doniesienia literaturowe w tym okresie. Wobec braku jednoznacznej i wiarygodnej oceny tego zjawiska, na podstawie materiału 4 tysięcy płodów obu płci w wieku od 20 do 42 tygodnia życia płodowego, podjęłam próbę wyjaśnienia procesu kształtowania się dymorfizmu płciowego w zakresie cech morfologicznych na tym etapie rozwoju. Wyniki tych badań prezentowałam na konferencjach Europejskiego Towarzystwa Antropologicznego (Kopenhaga 1994, Jena 1998), konferencjach Polskiego Towarzystwa Antropologicznego (Gdańsk 1993, Kraków 1994, Poznań 1995, Wrocław 1997) i konferencjach poświęconych zagadnieniom ontogenezy (Łódź 1993, Bydgoszcz 1994, Zielona Góra 2000) oraz opublikowałam w formie

artykułów w monografiach (II.B.45; II.B.46; II.B.48; II.B.49; II.B.52) i formie prac oryginalnych (II.B.23; II.B.25; II.B.26; II.B.27; II.B.28; II.B.29; II.B.32).

Podsumowanie tych badań stanowi moja praca doktorska pt.: „**Dymorfizm płciowy cech somatycznych i ciężaru narządów wewnętrznych w okresie płodowym człowieka**”, w której ustosunkowałam się do czterech zasadniczych problemów:

- ❖ **kształtowania się z wiekiem różnic dymorficznych cech morfologicznych;**
- ❖ **zróźnicowania międzypłciowego dynamiki rozwoju cech oraz ich stopnia zaawansowania rozwojowego;**
- ❖ **współzależności rozwojowej badanych cech w obu grupach płciowych płodów;**
- ❖ **różnic w reagowaniu obu płci na wpływy pozagenetycznych czynników zagrożenia.**

Na podstawie wyników badań, które zamieściłam w pracy doktorskiej można, moim zdaniem, złagodzić przeważające w piśmiennictwie stwierdzenie, iż w okresie płodowym raczej nie występuje wykształcony dymorfizm płciowy cech morfologicznych. Co więcej, należy je uzupełnić spostrzeżeniem, iż w tym czasie wyraźnie rozpoczyna się proces jego kształtowania. Od 24 tygodnia różnice płciowe stają się istotne statystycznie, choć wielkość różnic ma wprawdzie charakter zmienny, ale zawsze na korzyść płodów płci męskiej. Przejawy dymorfizmu płciowego w okresie prenatalnym nie ograniczają się tylko do bezwzględnych i względnych różnic w wartościach cech, ale uwidaczniają się w zróźnicowanej dynamice wzrastania cech somatycznych i masy narządów wewnętrznych oraz w stopniu ich zaawansowania rozwojowego. Moim zdaniem, uzyskane przeze mnie wyniki stanowią wystarczające uzasadnienie potrzeby dokonania podziału na płeć w badaniach prowadzonych na materiale płodowym.

5.2 Działalność naukowo – badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Równolegle od 1990 roku w ramach badań własnych zajmowałam się wraz z dr hab. Krystyną Cieślik problemem „**Pozagenetycznych uwarunkowań rozwoju płodowego człowieka**”. Celem tych badań było określenie biologicznych mechanizmów przyczyn wewnątrzmacicznego opóźnienia rozwoju oraz przedwczesnego zakończenia ciąży poprzez urodzenie martwego płodu. Przyczyna zgonu badanych płodów była nieznana lub określona

mało precyzyjnie. Dążenie do poznania przyczyn przedwczesnego zakończenia ciąży zmuszało do wnikliwego prześledzenia czynników determinujących, stymulujących i kształtujących rozwój prenatalny. Badałam zatem działanie czynników stanowiących środowisko matczyne płodów, określając ich zakres, rodzaj i siłę oddziaływania na rozwój płodowy. Efektem tych badań było określenie roli pojedynczo i w zespole działających, matczynych czynników ryzyka, uznanych obecnie za istotnie determinujące rozwój płodowy. Ówczesna literatura nie była jednoznaczna w tym temacie a nawet pojawiały się całkiem sprzeczne doniesienia. Prowadząc badania nad uwarunkowaniami pozagenetycznymi rozwoju płodowego określałam **wpływ wieku matki, liczby przebytych ciąż, poronień naturalnych i sztucznych na rozwój cech somatycznych w okresie płodowym**. Wyniki moich badań wskazały, że optymalny biologicznie okres prokreacji przypada na wiek 25-35 lat. Wiek matki poniżej i powyżej tego przedziału znamienne wpływa na podwyższenie ryzyka urodzenia dziecka z wymiarami ciała poniżej przeciętnej, przedwcześnie lub z objawami retardacji wewnątrzmacicznej czyli z cechami, które obniżają zdolności adaptacyjne noworodka do życia pozałonowego. W efekcie przeprowadzonych badań stwierdziłam, że zaawansowany wiek matki (tj. powyżej 40 lat) jest nie tylko niezależnym czynnikiem ryzyka wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrostu, ale także czynnikiem ryzyka zgonu wewnątrzmacicznego płodu. Badania te potwierdziły także częstsze występowanie patologii rozwojowych i śmierci okołoporodowej w grupach noworodków pierwotnych i pochodzących z porodów czwartego, piątego i dalszych. Ponadto wskazały, że spośród badanych matczynych czynników ryzyka, najsilniej zaburza rozwój przebycie poronienia sztucznego powodując różnego rodzaju powikłania w przebiegu kolejnej ciąży. Uzyskiwane w trakcie badań wyniki, sukcesywnie opracowane, publikowałam w czasopismach (II.B.16; II.B.17; II.B.20; II.B.21; II.B.22). Początkowo oceniałam związki między pojedynczo działającym czynnikiem pozagenetycznym a rozwojem poszczególnych cech somatycznych. W dalszej kolejności badałam kompleksowe oddziaływania czynników matczynych i starałam się ocenić czy ewentualne ich konsekwencje stanowią przyczynę opóźnienia rozwoju płodu lub czy może nawet są tak silne, że stanowią czynnik selekcji i doprowadzają do przedwczesnego zgonu płodu. Całościowe ujęcie zagadnienia przedstawiłam w artykułach opublikowanych zarówno w czasopismach krajowych i zagranicznych (II.B.26; II.B.30; II.B.37; II.B.45; II.B.50; II.B.51; II.B.53) oraz prezentowałam na konferencjach, zjazdach i kongresach krajowych i międzynarodowych organizowanych przez Polskie Towarzystwo Antropologiczne, Polskie Towarzystwo Anatomiczne, Europejskie Towarzystwo

Antropologiczne (EAA) (Jena 1998, Warszawa 1999, Bydgoszcz 2000, Warszawa 2000, Toruń 2001, Agrigento 2001, Szczecin 2002, Gdańsk 2003).

W konsekwencji otrzymanych wyników stwierdziłam, że działające zespołowo maczynne czynniki ryzyka są przyczyną obniżenia poziomu rozwoju płodów, ale nie stanowią czynnika selekcji doprowadzającego do zgonu. Przyczynę zgonu należy upatrywać w działaniu czynnika selekcji, który jest złożonym mechanizmem relacji organizmu maczynnego i rozwijającego się płodu, poddawanego przez cały okres rozwoju wewnątrzmacicznego wpływowi determinacji pośredniej.

Wyniki tych badań wskazały, że płód z olbrzymią wrażliwością reaguje na stymulacje środowiska wewnątrzmacicznego, na które składają się silnie i wielokierunkowo powiązane ze sobą czynniki maczynne, płodowe, łożyskowe i maciczne.

Przekonanie, że przyczyn zaburzeń rozwoju wewnątrzmacicznego płodu należy szukać w grupie czynników mało znanych, czynników maciczno-łożyskowych skierowało moje badania prowadzone wspólnie z dr hab. K. Cieślik właśnie w ich kierunku. Celem podjętych działań były **badania wydolności jednostki płodowo-łożyskowo-maczynnej**, które mogą dostarczyć informacji o stanie zagrożenia płodu jeszcze przed zaistnieniem u niego nieodwracalnych zmian (II.B.33; II.B.37; II.B.41).

Łożysko jest obecnie przedmiotem intensywnych badań. Poznanie wielorakich wpływów łożyska ma bezpośrednie znaczenie w określaniu i przewidywaniu zagrożeń w rozwoju płodów. Wszelkie nieprawidłowości łożyska mogą mieć bardzo istotny wpływ nie tylko na rozwój płodu, ale także na przebieg ciąży i porodu. Zaburzenia rozwojowe łożyska we wczesnej ciąży najczęściej prowadzą do poronień a w bardziej zaawansowanej mogą być przyczyną nieprawidłowej wymiany maczyno-płodowej w rezultacie doprowadzając do zahamowania wzrostu płodu i innych zagrożeń dla jego życia. Wciąż dyskusyjne jest określenie jego pełnych możliwości czynnościowych. Stąd moje badania nad wpływem zmian strukturalnych i funkcjonalnych łożyska na rozwój płodów. Badania histopatologiczne 890 popłodów, wykonane w Pracowni Patomorfologii Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu ujawniły, że zmiany patomorfologiczne dotyczyły długości i różnorodnych przyczepów sznura pępowinowego do łożyska natomiast czynnościowe- ograniczonej maczyno-płodowej wymiany krwi, zaburzeń krążenia w łożysku, zmian zapalnych w obrębie popłodu i przedwcześnie oddzielonego łożyska.

Wyniki moich badań pozwoliły na stwierdzenie, że zmiany morfologiczne zlokalizowane w popłodzie w niewielkim stopniu wpływają na urodzeniowe parametry biometryczne noworodków pochodzących z ciąży bliźniaczej dwukosmówkowej, natomiast wpływ zmian o charakterze czynnościowym jest znamienny statystycznie i częściej są one przyczyną zaburzeń rozwoju płodu. Spośród badanych zmian czynnościowych najsilniejszy okazał się wpływ zmian zapalnych w obrębie łożyska. Istotnie obniżają one parametry urodzeniowe noworodków i wywołują poród przedwczesny. Wyniki tych badań potwierdzają fakt, że łożysko jest silnym i żywotnym organem o wszechstronnych funkcjach, posiadającym znaczną fizjologiczną rezerwę czynnościową. Jedynie w nielicznych przypadkach łożysko zostaje uszkodzone na tyle, żeby nie mogło pełnić swojej funkcji. Wiele zmian patologicznych łożyska nie ma następstw klinicznych (publikacja II.B.41 i II.A.13 oraz 1 manuskrypt oddany do druku do czasopisma „Placenta”).

Zagadnieniem niewątpliwie interesującym i nadal kontrowersyjnym jest związek pomiędzy wielkością łożyska, a rozwojem płodu. Próbując rozwiązać ten problem podjęłam badania, których celem było ustalenie zależności pomiędzy rodzajem i wielkością łożyska a masą ciała płodów i noworodków oraz próba odpowiedzi na pytanie: czy wielkość łożyska może być czynnikiem ograniczającym masę płodów? Wyniki moich badań opublikowane w *Anthropological Review* (II.B.43) wskazują, że wzrost łożyska z pewnością ulega spowolnieniu w ciągu kilku ostatnich tygodni ciąży. Wydaje się, że nie ma powodu, dla którego łożysko, gdy już osiągnie wielkość wystarczającą do spełniania swojej roli, miałoby nadal rosnąć. Zmniejszanie się wartości wskaźnika wagowego łożysko-płód aż do momentu porodu świadczy o zwiększaniu się masy płodu do końca ciąży. Nie ulega wątpliwości, że wielkość łożyska (jego masa) wpływa na masę płodu, ale mało prawdopodobne jest, aby w końcowym etapie ciąży, po zakończonym wzrastaniu łożyska jego masa mogła mieć wpływ ograniczający masę płodu.

Mechanizm działania czynników selekcji, ich zakres oraz rodzaj i siła ich oddziaływania na rozwój płodowy to nie tylko zagadnienia poznawcze, ale to również wartość aplikacyjna. Szczególnie w naszym kraju o dużej jeszcze śmiertelności przed i okołoporodowej jest to zagadnienie bardzo ważne również z społecznego punktu widzenia. Stąd też wyniki moich badań prezentowane na konferencjach wzbudzały zainteresowanie zarówno teoretyków przedmiotu jak i praktyków położnictwa (Szczecin 2005, Warszawa 2007, Kielce 2010).

Prowadzone przez mnie badania nad środowiskowym uwarunkowaniem rozwoju płodowego, w tym poszukiwanie czynników selekcji działających na tym etapie rozwoju,

doprowadziły do wniosków, które skłoniły mnie do wnikliwego prześledzenia relacji genotyp-środowisko, w rozwoju prenatalnym. Szczególnie atrakcyjne wydały mi się obserwacje dotyczące bliźniąt, poprzez możliwość wykorzystania faktu identyczności genetycznej u bliźniąt jednojajowych. Opierając się na metodzie bliźniąt, można badając bliźnięta w okresie prenatalnym można uchwycić efekty działania genów i środowiska.

W 2002 rozpoczęłam badania na temat „**Genetycznych i środowiskowych uwarunkowań rozwoju płodowego - metoda bliźniąt**”. Badania te w latach 2004-2006 zostały objęte 3-letnim interdyscyplinarnym projektem badawczym o charakterze międzyuczelnianym (AM, UAM, AWF) nr 502-2-9001. Sukcesywnie wyniki badań prezentowałam na konferencjach Polskiego Towarzystwa Gemellologicznego organizowanych w Szczecinie w latach 2003, 2004, 2005 i publikowałam w specjalistycznym czasopiśmie całkowicie poświęconym bliźniętom: Gemellological Review (II.B.30; II.B.31; II.B.33) oraz w Polskim Przeglądzie Nauk o Zdrowiu 2005 (II.B.34).

Badania oparte o metodę bliźniąt napotykają na ogromne trudności natury technicznej. Po pierwsze metoda bliźniąt jest metodą statystyczną, stąd też rzetelność i precyzja wyników bardzo istotnie zależy od liczebności i reprezentatywności materiału. Sprawą kluczową było zebranie do badań odpowiednio licznej grupy par bliźniąt, która była limitowana częstością urodzeń noworodków pochodzących z ciąży bliźniaczej. W Polsce ciąża bliźniacza występuje raz na 80 porodów. Bliźnięta MZ stanowią 30% wszystkich porodów bliźniaczych, a tylko 30 % bliźniąt MZ posiada oddzielne kosmówki i owodnie. Drugim utrudnieniem w metodzie bliźniąt są wysokie nakłady finansowe, których wymagają **badania zygotywności bliźniąt**, oparte na analizach DNA, dając w zamian niebudzący żadnych wątpliwości wynik. Znajomość typu zygotywności bliźniąt, a także typu ich błon płodowych, która daje możliwość poznania wpływu czynników środowiskowych na funkcjonowanie genów jest koniecznym warunkiem prawidłowego stosowania metody bliźniąt. Ocena zygotywności bliźniąt była wykonywana w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, z którym współpraca początkowo ograniczona tylko do diagnostyki zygotywności, rozwinęła się i przerodziła we wspólne badania, zaakceptowane i finansowane przez MNiSW jako projekt badawczy nr NN 303457238. Projekt ten, noszący tytuł „Określenie stopnia determinacji genetycznej w auksologicznych badaniach prenatalnych – analiza zmienności genetycznej bliźniąt” został przyznany w 2010 roku i kierowany był przez prof. AWF dr hab. Krystynę Cieślik. Mimo, że

projekt został zakończony w 2014 roku, jednak interesujące wyniki przeprowadzonych badań sugerowały dalsze ich kontynuowanie.

W projekcie realizowane były dwa równoległe cele główne:

- ❖ Pierwszym było ustalenie wzajemnych proporcji między zmiennością genetyczną, a środowiskową i równocześnie określenie względnego udziału zmienności genetycznej w zmienności fenotypowej cechy przy pomocy różnego rodzaju współczynników odziedziczalności (II.A.1; II.A.6; II.A.8; II.A.9; II.B.50).
- ❖ Drugim celem badań, wynikającym z założeń pierwszego, był cel molekularny. Dotyczył on nie tylko określenia zygotywności bliźniąt w oparciu o wyniki badań DNA, ale również analizy zmienności genetycznej bliźniąt. Badania obejmowały polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnych DNA, heteroplazmię mitochondrialnego DNA oraz występowanie chimeryzmu komórek krwi obwodowej u bliźniąt.

Należy podkreślić, że ten aspekt badań miał charakter absolutnie nowatorski i zaowocował bardzo interesującymi wnioskami (II.A.2; II.A.3; II.B.49; II.A.4).

Wymierny efekt przeprowadzonych badań to: 890 par bliźniąt objętych badaniami antropologicznymi i molekularnymi w zakresie odcisku genetycznego i określenia polimorficznych alleli metodą hybrydyzacji z sondami molekularnymi i amplifikacji metodą PCR. Materiałem wyjściowym do badań molekularnych była krew pępowinowa badanych bliźniąt. Wykonano profile genetyczne w obrębie 21 loci zlokalizowanych na różnych chromosomach. W celu określenia stopnia heteroplazmii wykonano również analizy porównawcze sekwencji pętli D mitochondrialnego DNA u badanych bliźniąt. Najbardziej przydatną metodą przesiewową uwidaczniania polimorfizmu w regionie obejmującym fragment pętli D mtDNA okazała się analiza heterodupleksów (PCR-HD) (publikacja: II.B.51).

Badania były wykonywane najnowszymi technikami. Doświadczenia Laboratorium Genetyki Molekularnej w Poznaniu w zakresie metod oznaczania zygotywności, jednoznacznie wskazały, że najdokładniejszą formą analizy jest równoległe stosowanie analizy RFLP i multipleks PCR. W badaniu typu RFLP wykonano analizę restrykcyjną z zastosowaniem enzymu restrykcyjnego *HinfI* lub *HaeIII* i specyficznych sond molekularnych (GTG)₅, MS31 (7p22-pter), MS43A (12q24.3-qter), MS1 (1p33-p35) komplementarnych do sekwencji minisatelitarnych znajdujących się w genomie. Do amplifikacji wykorzystano metodę multipleks PCR, w której jednorazowo analizuje się 16 loci przy użyciu komercyjnego zestawu *PowerPlex HS 16 System* firmy Promega. Wszystkie 16 loci podlegają jednoczesnej

amplifikacji typu multipleks i powstałe produkty PCR są rozdzielane w pojedynczej kapilarze lub na jednym torze w elektroforezie płytowej. W ten sposób określone są długości poszczególnych produktów PCR, co następnie jest przeliczane na liczbę powtórzeń mikrosatelitarnych, charakterystycznych dla danego człowieka. W przypadku bliźniąt monozygotycznych liczba powtórzeń dla poszczególnych markerów jest identyczna.

Znaczenie badań objętych projektem i wymierny efekt podjętego problemu:

- ❖ Realizacja projektu pozwoliła na rozwinięcie badań w zakresie diagnostyki zygotywności bliźniąt oraz na prowadzenie badań ściśle powiązanych z praktyką. Podkreślić należy, że dotychczas w naszym kraju nie określano na taką skalę zygotywności bliźniąt za pomocą analizy polimorfizmu DNA.
- ❖ Badania molekularne systematycznie prowadzone w ramach projektu umożliwiają scharakteryzowanie bliźniąt w badanej populacji. Skorelowanie wyników badań molekularnych z dalszym monitorowaniem bliźniąt umożliwia wyciągnięcie wniosków, pozwalających na wczesne wykrywanie zaburzeń rozwojowych występujących w ciążyach wielopłodowych.
- ❖ Rodzice wszystkich bliźniąt, których zygotywność została określona na podstawie badań polimorfizmów DNA lub badań histopatologicznych płodu zostali poinformowani o wynikach badań. Wiedza na temat zygotywności bliźniąt jest potrzebna rodzicom w przypadku wystąpienia u dzieci chorób genetycznych i chorób, w leczeniu, których wykorzystuje się możliwości transplantacyjne. Nie bez znaczenia dla rodziców i w przyszłości dla samych bliźniąt jest prawo jednostki do własnej tożsamości i odpowiedzialność prawna bliźniąt.
- ❖ Bezbłędne oznaczenie typu zygotywności i kosmówkowości pozwala na wykorzystanie badań bliźniąt jednozygotycznych do poznania nieznannej jeszcze roli genomu mitochondrialnego w różnicowaniu międzypersonalnym.
- ❖ Przeprowadzone badania molekularne ujawniły różnice genetyczne wśród bliźniąt jednozygotycznych. W ocenie zygotywności bliźniąt oraz w diagnostyce molekularnej chorób wykorzystujemy badania pięciu głównych klas DNA: RFLP (ang. *restriction fragment length polymorphism*), VNTR (ang. *variable number of tandem repeats*), STR (ang. *short tandem repeats or microsatellite*), SNP (ang. *single-nucleotide polymorphism*) i CNV (ang. *copy-number variation*). Nasza uwaga skupia się na badaniach CNV, które są szczególnie interesujące u bliźniąt, ponieważ zmiana CNV

może prowadzić do zmian fenotypowych, mimo jednozygotyczności (publikacja: II.A.2).

- ❖ Wykonując analizy, których celem było rozstrzygnięcie zygotywności bliźniąt udało się w obrębie bliźniąt wskazać występowanie chimeryzmu komórek krwi (publikacja: II.A.4). Zjawisko przenikania komórek matki do płodu, mimo że znane już od około 50 lat, jest obecnie przedmiotem intensywnych badań medycznych, ponieważ z najnowszych prac wynika, że mikrochimeryzm może wpływać na stan zdrowia i przebieg chorób. W niektórych przypadkach może on wywoływać atak immunologiczny, a w innych pomagać w leczeniu. Zbadanie zjawiska mikrochimeryzmu być może pozwoli też ujednoczyć terminologię tłumaczącą występowanie chimeryzmu i mozaicyzmu u bliźniąt. Dotychczas bowiem w literaturze trudno znaleźć rygorystyczne rozgraniczenie pomiędzy chimeryzmem, a mozaicyzmem w badaniach bliźniąt. Poszukiwanie roli mikrochimeryzmu stanowi ważny cel badań klinicznych, dlatego każda informacja o jego występowaniu jest cenna nie tylko ze względów poznawczych (terapia chorób immunologicznych).

- ❖ Wyniki naszych badań potwierdzają, że liczba błon kosmówkowych w ciąży bliźniaczej różnicuje rozwój płodów (publikacja: II.B.39). Konsekwencje jednokosmówkowości to zwiększona umieralność noworodków, głównie wcześniaków, przedwczesny poród, gorszy stan ogólny w momencie urodzenia oraz niższy poziom rozwoju cech somatycznych. Wobec powyższego jednokosmówkowość można uznać za istotny czynnik zagrożenia rozwoju płodu.

Określenie kosmówkowości jest bardzo istotne już w 1 trymestrze ciąży. Wczesne rozpoznanie TTTS-u, lepsze wyniki leczenia i mniejsza częstość występowania powikłań. Trafne rozpoznanie ryzyka wystąpienia powikłań może wpłynąć na zdrowie dziecka i matki. Istnieje potrzeba precyzyjnej oceny tego ryzyka (to cel naszych badań), gdyż to pomoże zaprojektować działania profilaktyczne. Monitorowanie stanu płodów z ciąży 1-kosmówkowej jest niezwykle istotnym elementem intensywnej opieki w medycynie perinatalnej.

- ❖ Wyodrębnienie i określenie czynników, które mogą mieć niekorzystny wpływ na rozwój płodu (Wyniki badania wpływu palenia przez ciężarne na stan rozwoju płodu i noworodka zostały opublikowane w „Przeglądzie Lekarskim” (II.B.38), a wpływu

stopnia zurbanizowania miejsca zamieszkania kobiet na parametry urodzeniowe ich dzieci w „Ginekologii Polskiej” (II.A.10).

Jednym z badanych przeze mnie środowiskowych czynników zagrożenia był fakt palenia papierosów przez ciężarną. Uzyskane wyniki potwierdzają dane z piśmiennictwa wskazujące na wyraźnie negatywny wpływ palenia przez ciężarne na stan rozwoju płodu i noworodka. Dodatkowo wskazują one, że siła destrukcyjna nikotynizmu matki jest większa niż innych badanych środowiskowych czynników zagrożenia. Ciekawy i moim zdaniem inspirujący do dalszych badań jest wynik uzyskany przeze mnie przy ocenie wpływu zygotywności i kosmówkowości na siłę reakcji bliźniąt poddanych działaniu nikotyny. Silniejsze negatywne reakcje zaobserwowane u bliźniąt dwuzygotycznych i dwukosmówkowych, mogą sugerować większą niż u monozygotycznych podatność na wpływ czynników środowiska (publikacja: II.B.38).

W kolejnej pracy (II.A.10) porównałam stan rozwoju noworodków z ciąży bliźniaczych urodzonych przez matki zamieszkujące aglomerację poznańską, małe miasta i wsie Wielkopolski. Otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, że noworodki matek mieszkających w aglomeracji poznańskiej w porównaniu z noworodkami matek pochodzących z obszarów wiejskich w Wielkopolsce charakteryzują się wyższym poziomem rozwoju somatycznego, lepszym stanem ogólnym i dłuższym rozwojem płodowym oraz rzadziej narażone są na zgony wewnątrzmaciczne i martwe urodzenia. Stopień zurbanizowania miejsca zamieszkania kobiet można uznać za czynnik częściowo różnicujący stan urodzeniowy noworodków. Różnice te spowodowane są nierównym poziomem społeczno-ekonomicznym i związanym z nim wykształceniem matki oraz niejednakowym dostępem do ośrodków służby zdrowia na obszarach miejskich i wiejskich, a tym samym różnymi możliwościami korzystania z opieki zdrowotnej.

- ❖ Medyczne i rozwojowe konsekwencje zapłodnienia in vitro są nadal przedmiotem dyskusji i badań. Najczęściej wymieniane są problemy okołoporodowe: przedwczesny poród, niska masa urodzeniowa, większa umieralność okołoporodowa, częstsze wady rozwojowe. Duże ryzyko niekorzystnego wpływu na rozwój niesie fakt ciąży wielopłodowej – bardzo częstej w przypadku zapłodnienia in vitro. W naszych badaniach zestawiających stan noworodków z ciąży bliźniaczej po zapłodnieniu

pozaustrojowym oraz stan rozwoju bliźniąt poczętych naturalnie, uzyskane wyniki upoważniają do stwierdzenia, że w okresie okołourodzeniowym stan ogólny bliźniąt obu grup jest podobny i potwierdzają tezę, że liczba i stopień powikłań okołoporodowych może być konsekwencją ciąży mnogich (publikacja (II.B.42) oraz praca oddana do druku do „Journal of Maternal- Fetal & Neonatal Medicine”).

- ❖ Uzyskane wyniki nie tylko mają znaczenie poznawcze, mogą również być wykorzystane przez praktyków w antropologii, medycynie prenatalnej i perinatalnej. Są one sukcesywnie upowszechniane w publikacjach i referatach (II.A.2; II.A.3; II.B.38; II.B.41; II.B.39; II.A.4; II.B.55; II.A.15).

Zwieńczeniem pracy naukowej koncentrującej się wokół badań dotyczących rozwoju i zmienności organizmu człowieka w okresie pre i perinatalnym jest przedłożona przeze mnie monografia habilitacyjna pt: „Wykorzystanie metody bliźniąt do określenia udziału czynników genetycznych i środowiskowych w zmienności cech ilościowych w okresie okołourodzeniowym” zaprezentowana jako osiągnięcie naukowe wykazane w punkcie 4.1, 4.2, 4.3 i 4.4 autoreferatu. Stanowi ona podsumowanie tych szerokich i długofalowych badań.

Poza tematyką badawczą objętą grantem, w ramach współpracy z Zespołem Funkcji Kwasów Nukleinowych Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu uczestniczyłam również w badaniach dotyczących problemu genetycznych uwarunkowań chorób dziedzicznych i nowotworów. Współpraca ta zaowocowała trzema oryginalnymi publikacjami z listy filadelfijskiej, których jestem współautorem. Pierwsza praca pt. „*A Simple Method for TPMT and ITPA Genotyping Using Multiplex HRMA for Patients Treated with Thiopurine Drugs*” (II.A.11) jest z zakresu farmakogenetyki i stanowi opis nowej, szybkiej metodyki do wykrywania 4 najczęstszych polimorfizmów genów S-metylotransferazy tiopuryny (*TPMT*: c.238G>C, c.460G>A, c.719A>G) i pirofosfatazy TRIFOSFORAN INOZYNY (*ITPA*: c.94C>A) warunkujących deficyt enzymów TPMT oraz ITPA, a w konsekwencji zmiany w metabolizmie tiopuryn, brak efektu terapeutycznego i działania niepożądane leków tiopurynowych. Leki te stosowane są w podtrzymaniu immunosupresji po przeszczepach i w zachowaniu stanu remisji w chorobach zapalnych. Opracowany i zwalidowany test molekularno-genetyczny z użyciem zmodyfikowanej WYSOKOROZDZIELCZEJ ANALIZY krzywej TOPNIENIA DNA (ang. *high resolution melting analysis, HRMA*)

pozwała w krótkim czasie oznaczyć warianty genów *TPMT* i *ITPA* w celu określenia predykcyjnej reakcji pacjenta na terapię tiopurynami.

Druga praca pt. „*The effect of UGT1A9, CYP2B6 and CYP2C9 genes polymorphism on individual differences in propofol pharmacokinetics among Polish patients undergoing general anaesthesia*” (II.A.12) dotyczy również medycyny personalizowanej i badań farmakogenetycznych. Miała ona na celu określenie podłoża genetycznego warunkującego osobniczo-zmienny profil farmakokinetyczny pacjentów populacji polskiej poddanych znieczuleniu ogólnemu propofolem. Grupę badaną stanowiło 85 pacjentów, u których oznaczone zostały *loci* genów *UGT1A9* (UDP-GLUKURONYLOTRANSFERAZA rodzina 1, polipeptyd A), *CYP2B6* (cytochrom P450, rodzina 2B, polipeptyd 6) i *CYP2C9* (cytochrom P450, rodzina 2C, polipeptyd 9), a następnie skorelowane z danymi klinicznymi i wartościami średniego czasu przebywania anestetyku w organizmie (ang. *mean retention time*, MR) wynikającymi z pomiarów poziomu propofolu w osoczu z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *high-performance liquid chromatography*, HPLC). Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że polimorfizm c.516G>T genu *CYP2B6* koreluje z tempem metabolizmu propofolu i zmiany w tym genie mogą odgrywać istotną rolę w optymalizacji znieczulenia propofolem.

Trzecia publikacja pt. „*DNA variants in Helicobacter pylori infected patients with chronic gastritis, dysplasia and familial gastric cancer*” (nieopublikowana-po pozytywnej recenzji) opisuje wyniki badań podłoża molekularno-genetycznego predysponującego do występowania przewlekłego zapalenia błony śluzowej żołądka, dysplazji i rodzinnego rak żołądka u pacjentów zakażonych bakterią *Helicobacter pylori*.

Równolegle obok głównego kierunku mojej działalności naukowej dotyczącego prawidłowości rozwoju pre i perinatalnego człowieka realizowałam badania, których tematyka związana była z naukami o kulturze fizycznej. Podjęcie tego rodzaju badań było konsekwencją mego zatrudnienia na etacie dydaktyczno-naukowym w Zakładzie Anatomii Funkcjonalnej, AWF w Poznaniu. Już w drugim roku pracy zostałam włączona w działalność naukowo-badawczą Katedry w temacie „**Kształtowanie się cech morfologicznych i czynnościowych w ontogenezie człowieka**”. Jednym z nurtów tej tematyki była **antropomorfologia mięśni badanych w warunkach przyżyciowych**. Skromna ilość opracowań na ten temat zarówno w piśmiennictwie krajowym i zagranicznym zwiększyła moje zainteresowanie tym problemem. Celem tych badań była **ocena ukształtowania mięśni, proporcji wewnątrz-mięśniowych**

oraz stosunków mięśniowo-szkieletowych dostępnych w badaniu na człowieku żywym w zależności od typu budowy ciała, płci, pochodzenia społecznego oraz intensywności uprawiania ćwiczeń fizycznych.

Z zakresu **antropomorfologii mięśni** badanych w warunkach przyżyciowych opublikowałam 4 artykuły. Prace te dotyczyły mięśnia: **naramiennego, piersiowego większego i brzuchatego łydki** (II.B.18; II.B.19; II.B.24; II.B.47). Badania w/w mięśni przeprowadziłam na 122 studentkach i 151 studentach AWF w Poznaniu. Wnioski z prowadzonych badań można sprowadzić do następujących: cechy pomiarowe mięśni wykazują zróżnicowanie płciowe, typ budowy konstytucjonalnej silniej wiąże się z morfologią badanych mięśni w grupie męskiej, w obu grupach płciowych występują jednakowo silne zależności wewnątrz-mięśniowe i mięśniowo-szkieletowe. Pochodzenie społeczne nie różnicuje istotnie pomiarów ani wskaźników badanych mięśni. Natomiast intensywność uprawiania ćwiczeń fizycznych w różnym stopniu wpływa na stan ukształtowania mięśni oraz ich przyczepów. Jest to zależne od położenia mięśnia i zaangażowania jego w trakcie ćwiczeń fizycznych a także od rodzaju pracy treningowej czyli przewagi pewnych elementów ćwiczeń nad innymi w danej dyscyplinie sportowej.

Rezultaty tych badań stanowią znaczący wkład do biologii rozwoju człowieka, anatomii palpacyjnej będącej podstawę terapii manualnej, antropologii sportu oraz biomechaniki, stąd też cieszyły się zainteresowaniem na konferencji anatomicznej (Kraków 1992) i konferencjach sportowych (Katowice 1995, Ljubljana 1999). Ponadto wyniki tych badań wykorzystuję prowadząc zajęcia z anatomii prawidłowej i palpacyjnej ze studentami Wychowania Fizycznego i Fizjoterapii AWF w ramach działalności dydaktycznej Zakładu Anatomii, w którym do dziś jestem zatrudniona.

W ramach prowadzonych badań związanych z kształtowaniem się cech morfofunkcyjnych w ontogenezie człowieka zainteresowałam się **problemem aktywności fizycznej kobiet w szczególnych okresach ich życia tj. w okresie ciąży i w okresie menopauzy.**

Podjęłam badania w efekcie, których mogłam stwierdzić w jakim stopniu cecha biologiczna, jaką jest uzyskana dzięki aktywności ruchowej sprawność fizyczna, na tle innych cech biologicznych i czynników kulturowych, różnicuje przebieg klimakterium u kobiet. Badania przeprowadzone w grupie 350 kobiet w wieku 40 - 75 lat, dowodzą, że występowanie symptomów klimakteryjnych u kobiet zależy od wielu cech biologicznych organizmu i

czynników środowiskowych. Syntetyczne ujęcie tych związków pozwala na sformułowanie następujących wniosków:

1. Wyższa sprawność fizyczna, budowa ciała i lepszy stan zdrowia są związane ze zwiększoną aktywnością fizyczną i wyższym poziomem wykształcenia.
2. Przebieg klimakterium u kobiet modyfikowany jest nie tylko cechami biologicznymi ich organizmu, ale również czynnikiem środowiskowym, jakim jest aktywność fizyczna.

Wyniki tych badań opublikowałam w „Przeglądzie Naukowym Kultury Fizycznej Uniwersytetu Rzeszowskiego” oraz w „Studies in Physical Culture and Tourism” (II.B.35; II.B.36). W sposób jednoznaczny pokazują one związki aktywnego trybu życia ze sprawnością fizyczną, samopoczuciem i zdrowiem kobiet w okresie klimakterium. Stopień nasilenia dolegliwości okresu przekwitania modyfikowany jest właśnie wymienionymi wyżej czynnikami, zwłaszcza poziomem aktywności ruchowej, która w długofalowym działaniu może, obok łagodzenia dolegliwości klimakteryjnych i utrzymania prawidłowego składu ciała, zapobiegać chorobom układu krążenia i osteoporozie.

Aktywność fizyczna kobiet w ciąży jest ważnym zagadnieniem w kwestii profilaktyki zdrowotnej ciężarnych kobiet, stanowi bowiem czynnik mający wpływ na urodzenie zdrowego noworodka. Wraz z rozwojem medycyny oraz poszerzaniem się wiedzy na temat fizjologii ciąży zmieniają się również rekomendacje dotyczące aktywności fizycznej kobiety w tym okresie. Odchodzi się od asekuracyjnego podejścia, sugerującego kobiecie ograniczenie wszelkiej aktywności związanej z wysiłkiem. Literatura przedmiotu popiera aktywność fizyczną w ciąży podkreślając jej korzystny wpływ, ale pojawiają się też głosy twierdzące, że ćwiczenia w ciąży mogą również spowodować zagrożenie wynikające ze zbyt intensywnego ćwiczenia czy nieprawidłowego doboru ćwiczeń. Celem moich badań, w których uczestniczyły 132 kobiety była **analiza aktywności fizycznej ciężarnych i określenie jej wpływu na przebieg ciąży, poród i stan urodzeniowy dziecka**. Do jego realizacji wyznaczyłam szereg zadań badawczych. Jednym z nich było określenie czynników socjoekonomicznych decydujących o podejmowaniu aktywności fizycznej. Dokonałam też charakterystyki aktywności fizycznej ciężarnych, określając typ i częstość wykonywanych ćwiczeń fizycznych oraz określiłam czynniki motywujące ciężarne do podejmowania aktywności fizycznej i jej efekty odczuwane przez kobietę. Ponadto porównałam przebieg ciąży, rodzaj i długość porodu oraz stan urodzeniowy noworodków kobiet uprawiających regularną aktywność fizyczną z

ciężarnymi niećwiczącymi. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdziłam, że na podejmowanie aktywności fizycznej przez ciężarne miał wpływ wiek kobiety i jej wykształcenie. Poziom aktywności fizycznej prezentowany przez badane kobiety ciężarne nie wpłynął na długość trwania ciąży ani na rodzaj porodu, ale rzutował na długość porodu oraz kondycję fizyczną rodzących. Matki aktywne urodziły dzieci z większą masą ciała i z większą punktacją niż matki nieaktywne, ale różnice te nie były istotne statystycznie (publikacja: II.B.57).

Badając wpływ aktywności fizycznej kobiet na przebieg ciąży zainteresowałam się problemem kręgosłupa kobiet w tym szczególnym okresie ich życia. Obiektem moich zainteresowań stały się **zmiany zachodzące w okresie ciąży oraz w okresie porodu dotyczące stanu kręgosłupa, jego ruchomości oraz tego w jakim stopniu aktywność fizyczna podejmowana przez kobiety w szkołach rodzenia wpływa na te zmiany.** Znaczenie podjętych przeze mnie badań podkreśla fakt braku w literaturze informacji na ten temat. Można to wytłumaczyć trudnościami w dostępie do materiału badawczego oraz brakiem odpowiedniego sprzętu umożliwiającego przeprowadzenie nieinwazyjnego, bezpiecznego dla ciężarnych badania. Badania prowadzone były w Klinice św. Rodziny w Poznaniu oraz w prywatnym gabinecie ginekologicznym przy wykorzystaniu nowoczesnych technik pomiarowych w postaci elektrogoniometrii tensometrycznej (rezystencjalnej). Efektem tych badań jest praca opublikowana w „Fizjoterapii Polskiej” (II.B.40), której wyniki w sposób jednoznaczny określają tendencję zmian krzywizn fizjologicznych kręgosłupa oraz jego odcinkowej ruchomości i stanowią podstawę do programowania właściwych ćwiczeń ruchowych dla kobiet w ciąży oraz ćwiczeń korygujących zmiany powstałe w czasie ciąży dla kobiet w porodu.

Tematykę znaczenia aktywności fizycznej w rozwoju człowieka kontynuowałam w badaniach nad otyłością dzieci prowadzonych przez pracowników Zakładu Anatomii. Zdaniem wielu autorów nadwaga i otyłość jako jedno z najczęściej występujących zaburzeń rozwojowych u dzieci i młodzieży może prowadzić do pojawienia się patologii i dysfunkcji, dotyczących wszystkich układów i narządów. Wobec powagi problemu zdrowotnego jaki stanowi otyłość uważam zagadnienia profilaktyki i terapii otyłości za niezmiernie ważne. Tendencje zmian w częstości występowania otyłości u dzieci i młodzieży powinny być dokładnie monitorowane. Wyniki naszych badań obejmujących 904 dzieci z Leszna i 471 dzieci z powiatu leszczyńskiego celem, których było określenie skali (rozmiarów) problemu otyłości

u dzieci w regionie leszczyńskim i próba oceny skuteczności działania aktywności fizycznej jako czynnika zapobiegającego problemowi nadwagi i otyłości u dzieci zostały częściowo opublikowane (publikacja: (II.B.58) dotyczy określenia częstości występowania nadwagi i otyłości wśród dzieci szkół leszczyńskich, a publikacja (II.B.44) weryfikuje powszechnie stosowane metody oceny prawidłowości masy ciała u dzieci). Natomiast wyniki przeprowadzonego eksperymentu polegającego na ocenie skuteczności działania zwiększonej aktywności fizycznej jako czynnika ograniczającego nadwagę i otyłość są w toku opracowań. Interesujące jest czy działanie zwiększonego wysiłku fizycznego bez wprowadzania zmian w diecie i trybie życia dzieci będzie wystarczające do zmniejszenia nadwagi i otyłości badanych.

Kontynuując, w ramach działalności statutowej Zakładu, tematykę związaną z kształtowaniem się cech morfologicznych i czynnościowych w ontogenezie człowieka podjęłam wraz z współpracownikami **badania dotyczące elektrogoniometrii zakresów ruchów w stawach człowieka u osób zdrowych uprawiających różne dyscypliny sportowe i w patologii układu ruchu oraz badania pedobarograficzne nakierowane na analizę wyników pomiarów przeprowadzonych na określonych grupach sportowych.**

Badania elektrogoniometryczne prowadzone są w trzech kierunkach:

- ❖ wpływu stanów patologicznych (skolioz idiopatycznych, bólów kręgosłupa, stanów po zabiegach krążków międzykręgowych) na zmiany parametrów funkcjonalnych kręgosłupa w postaci ruchomości odcinkowej oraz wartości kątowych jego krzywizn;
- ❖ wpływu uprawiania różnych dyscyplin sportowych (kick-boxingu, rugby, judo, baletu, footballu amerykańskiego) na zakres ruchów w stawach;
- ❖ wpływu wybranych metod rehabilitacji układu ruchu (terapii manualnej metodą McKenzie wzbogaconą o Techniki Energii Mięśniowej, terapii powięziowej, zabiegu dekompresji kości krzyżowej) na podstawę ciała (zmiany w obrębie napięć mięśniowych i parametrów funkcjonalnych kręgosłupa).

Z tego zakresu tematycznego pojawiły się publikacje w czasopismach o zasięgu międzynarodowym z IF, będących na liście MNiSW (II.A.5; II.A.7). Określenie wpływu i możliwości zastosowania terapii mięśniowo- powięziowej na przywrócenie prawidłowych wartości kątowych krzywizn fizjologicznych kręgosłupa, zaburzonych treningiem kickboxingu oraz określenie skuteczności połączenia metod McKenziego wzbogaconych o Techniki Energii Mięśniowej w leczeniu dolegliwości bólowych odcinka lędźwiowego kręgosłupa to

najważniejsze osiągnięcia poznawcze tych publikacji. Natomiast zastosowanie praktyczne otrzymanych wyników badań upatruję w doborze metod treningowych oraz ćwiczeń kompensacyjnych w określonej dyscyplinie sportowej oraz w rehabilitacji leczniczej bólów kręgosłupa.

Badania pedobarograficzne przeprowadziliśmy na grupie biegaczy długodystansowych. Celem badań było porównanie rozkładu sił nacisków stóp na podłoże u osób zmieniających sposób biegania z biegania w obuwiu amortyzacją na bieganie w obuwiu minimalistycznym lub boso. Do badań sił reakcji podłoża wykorzystaliśmy platformę podometryczno-tensometryczną WIN-POD badającą siły nacisku stóp na podłoże. Określiliśmy siły nacisku podczas biegu w różnym rodzaju obuwia (z amortyzacją, minimalistycznych) oraz boso. Z analizy badań wynika także, iż technika biegu, lądowanie oraz odbicie jest inne w różnym rodzaju obuwia. Podczas biegania boso i w butach minimalistycznych lądowanie odbywa się na przodostopiu bądź śródstopiu, a odbicie prowadzone jest z palców. Natomiast podczas biegania w butach z amortyzacją lądowanie odbywa się na pięcie, a odbicie prowadzone jest ze śródstopia i przodostopia. Gromadzenie się największych sił nacisku na głowach kości śródstopia podczas biegu boso u osób wcześniej przez wiele lat biegających w butach z amortyzacją może prowadzić do kontuzji narządu lokomocji a zwłaszcza do zapalenia rozciągną podeszwowego stopy. Wyniki badań skierowaliśmy do publikacji w czasopiśmie „The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness” (II.A.14). Uważam, że najważniejszym osiągnięciem poznawczym tej publikacji jest określenie sił reakcji podłoża podczas biegu w różnego rodzaju obuwiu i boso dające możliwości modyfikacji systemu treningowego pod kątem zmniejszenia obciążeń aparatu ruchu. Udowodniliśmy, że przejście na bieganie naturalne (boso lub w butach minimalistycznych) u osób, które od dziecka używały butów z amortyzacją może powodować kontuzje narządu lokomocji, a zwłaszcza zapalenie rozciągną podeszwowego stopy. Znaczenie praktyczne tych badań znajduję w modyfikacji treningu biegowego w zależności od użytego obuwia. Badania wykazały, że podczas zmiany obuwia z amortyzacją na buty minimalistyczne lub bieganie boso powinna wystąpić stopniowa adaptacja stopy do zmieniających się warunków kinematycznych, powinno się także zwrócić uwagę na technikę biegu oraz twardość nawierzchni, po której się biega.

Podsumowanie działalności naukowo-badawczej

Główne problemy badawcze:

1. Problem dymorfizmu płciowego w okresie rozwoju płodowego:

- ❖ kształtowanie się z wiekiem różnic dymorficznych cech morfologicznych;
- ❖ zróżnicowanie międzypłciowe dynamiki rozwoju cech oraz ich stopnia zaawansowania rozwojowego;
- ❖ współzależności rozwojowe badanych cech w obu grupach płciowych płodów;
- ❖ różnice w reagowaniu obu płci na wpływy pozagenetycznych czynników zagrożenia.

Efekty: liczne publikacje (11) + rozprawa doktorska

2. Problem pozagenetycznych uwarunkowań rozwoju płodowego człowieka:

- ❖ badanie czynników determinujących, stymulujących i kształtujących rozwój prenatalny;
- ❖ badania wydolności jednostki płodowo-łożyskowo-matczynej;
- ❖ badanie zależności rozwoju płodów i noworodków od stanu łożyska (określenie zmian morfologiczno-czynnościowych łożyska i ich konsekwencji rozwojowych);
- ❖ poznanie i określenie biologicznych mechanizmów przyczyn wewnątrzmacicznego opóźnienia rozwoju oraz przedwczesnego zakończenia ciąży.

Efekty: liczne publikacje (13)

3. Problem określenia udziału czynników genetycznych i oddziaływań środowiskowych w zmienności cech fenotypowych w okresie prenatalnym, na podstawie badań bliźniąt. Problem badawczy objęty projektem finansowanym przez MNiSW - „Określenie stopnia determinacji genetycznej w auksologicznych badaniach prenatalnych – analiza zmienności genetycznej bliźniąt”, w którym realizowane były dwa równoległe nurty badawcze.

- ❖ Auksologiczny
 - określenie stanu rozwoju noworodków pochodzących z ciąży bliźniaczej;
 - określenie wpływu środowiska wewnątrzmacicznego na rozwój płodów;
 - ustalenie różnic wewnątrzparowych u bliźniąt monozygotycznych i dwuzygotycznych oraz określenie stopnia ich istotności;

- analiza zmienności fenotypowej prowadzona w zależności od tygodnia ciąży, płci i matczynych czynników ryzyka oznaczonych dla każdej pary bliźniąt;
- określenie zakresów i kierunków stopnia odziedziczalności cech, jej stałości i zmienności w czasie;
- ocena stopnia ekosensytywności cechy, jej stałości i zmienności w czasie.

❖ Molekularny

- diagnostyka zygotyczności bliźniąt;
- analiza zmienności genetycznej bliźniąt (badania występowania chimeryzmu komórek krwi obwodowej u bliźniąt, badania polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych DNA, heteroplazmii mitochondrialnego DNA oraz badania zmierzające do poznania roli genomu mitochondrialnego w różnicowaniu osobniczym).

Efekty: liczne publikacje (20) + monografia

4. Problem genetycznych uwarunkowań chorób dziedzicznych i nowotworów:

- ❖ Czynniki genetyczne zaangażowane w reakcję na leki tiopurynowe u chorych z nieswoistymi zapaleniami jelit.
- ❖ Podłoże molekularno-genetyczne predysponujące do występowania przewlekłego zapalenia błony śluzowej żołądka, dysplazji i rodzinnego raka żołądka u pacjentów zakażonych bakterią *Helicobacter pylori*.
- ❖ badania z zakresu farmakogenetyki w anestezji i leczeniu bólu.

Efekty: liczne publikacje (3)

5. Problem kształtowanie się cech morfologicznych i czynnościowych w ontogenezie człowieka:

- ❖ Antropomorfologia mięśni badanych w warunkach przyżyciowych.
- ❖ Stan funkcjonalny kręgosłupa u ciężarnych kobiet.
- ❖ Wpływ aktywności fizycznej na przebieg klimakterium.
- ❖ Wpływ aktywności fizycznej ciężarnych na przebieg ciąży, poród i stan urodzeniowy dziecka.
- ❖ Aktywność fizyczna jako czynnik zapobiegający problemowi nadwagi i otyłości u dzieci.

- ❖ Elektrogoniometria zakresów ruchów w stawach człowieka u osób zdrowych - w sporcie i w patologii układu ruchu.
- ❖ Wpływ wybranych metod rehabilitacji układu ruchu na podstawę ciała (zmiany w obrębie napięć mięśniowych i parametrów funkcjonalnych kręgosłupa).
- ❖ Badania pedobarograficzne sportowców oraz w patologii układu ruchu.

Efekty: liczne publikacje (12)

Poznań, 21.03.2017r. *M. Waszak*