

dr hab. n. med. Ewa Golańska

Łódź, 28.07.2026

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anity Lizińczyk

Rola apolipoproteiny E w patogenezie chorób prionowych

(Role of Apolipoprotein E in the Pathogenesis of Prion Diseases)

przedłożonej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne

Promotorami pracy są dr hab. Magdalena Druszczyńska, profesor Uniwersytetu Łódzkiego oraz dr hab. n. med. Martin Sadowski, profesor New York University Grossman School of Medicine.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w języku angielskim i zaopatrzona w streszczenie po polsku. Rozprawa oparta jest na dwóch powiązanych tematycznie artykułach oryginalnych, które ukazały się w Acta Neuropathologica Communications w roku 2021 oraz 2026 (IF 7.6 i 5.7; łączna punktacja MNiSW 280). Manuskrypt zawiera skrócony wyciąg z treści dwóch powyższych publikacji, który został podzielony na rozdziały o tradycyjnym układzie: Introduction, Hypothesis, Specific aims of the project, Methodology, Results, Conclusions, Bibliography. Do rozprawy włączone zostały ponadto obydwa artykuły oryginalne wraz z obszernymi materiałami dodatkowymi, a także informacja o źródłach finansowania projektów. Załączony został również wykaz innych publikacji Autorki, obejmujący jedną pracę niepowiązaną z treścią rozprawy, której Doktorantka jest współautorką i która została opublikowana w 2020 roku w Molecular Neurodegeneration (IF 14.19), a także 9 doniesień zjazdowych, w większości dotyczących tematyki patogenezy chorób neurodegeneracyjnych. Całkowity IF publikacji Doktorantki wynosi 27.49, a punktacja MNiSW 420.

W rozprawie zamieszczono ponadto oświadczenia Doktorantki oraz wszystkich współautorów obydwu artykułów, dotyczące udziału procentowego oraz charakteru wkładu w powstanie publikacji. W obydwu pracach Doktorantka jest jedną z dwóch równorzędnych pierwszych autorek, z wkładem wynoszącym 35% i 40%, a jej udział obejmuje zarówno planowanie i wykonywanie eksperymentów, jak i opracowanie wyników i przygotowanie publikacji.

Na początku rozprawy Doktorantka przedstawia wprowadzenie teoretyczne, w którym w sposób jasny, czytelny i wyczerpujący charakteryzuje choroby wywołane przez priony oraz mechanizmy prowadzące do ich powstawania. Choroby prionowe stanowią unikalną grupę wśród schorzeń spowodowanych przez odkładanie się w mózgu nieprawidłowo zwiniętych białek, ponieważ w ich przypadku białko kluczowe dla patogenezы choroby jest zarazem czynnikiem zakaźnym. W związku z tym choroby te mogą występować nie tylko w postaci sporadycznej lub uwarunkowanej genetycznie (jak pozostałe choroby neurodegeneracyjne), lecz mogą być także nabyte, np. przez spożycie żywności zawierającej priony lub w wyniku niektórych procedur medycznych. Choroby wywołane przez priony należą do schorzeń rzadkich, jednak ze względu na ich zakaźny charakter, brak możliwości leczenia oraz szybki przebieg choroby prowadzący nieuchronnie do śmierci stanowią poważny problem medyczny i epidemiologiczny. Prace podjęte przez Doktorantkę wpisują się w ważny nurt badań nad – nie do końca wyjaśnioną – etiopatogenezą tych chorób.

Apolipoproteina E, główny przedmiot naukowych zainteresowań Doktorantki, to białko fizjologicznie związane z transportem lipidów, które uczestniczy również w procesach patologicznych w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych, a polimorficzne warianty genu *APOE* i kodowane przez nie izoformy białka są powiązane z ryzykiem zachorowania na sporadyczną postać choroby Alzheimera. O ile rola tego białka została dobrze zbadana w przypadku AD i znane są także jego powiązania z niektórymi innymi schorzeniami, takimi jak postępujące porażenie nadjądrowe czy zwyrodnienie korowo-podstawne, jego znaczenie w chorobach prionowych wciąż pozostaje niewyjaśnione.

Na podstawie przedstawionych we Wstępie przesłanek Autorka stawia hipotezę, że białko ApoE odgrywa istotną rolę również w przebiegu chorób wywołanych przez priony i wskazuje jako główny cel badawczy pracy ustalenie roli apolipoproteiny E oraz określenie wpływu poszczególnych wariantów *APOE* na patogenezę zakażenia prionami. Cel ten jest dokładnie sprecyzowany w postaci pięciu celów szczegółowych, obejmujących analizę zmian w ekspresji

apoE w trakcie trwania choroby; ustalenie wpływu poszczególnych polimorficznych alleli *APOE* oraz braku ekspresji genu *ApoE* na czas inkubacji i przebieg choroby, a także identyfikację mechanizmów, za pośrednictwem których białko apoE moduluje patologiczne zjawiska związane z przebiegiem choroby prionowej. Wszystkie cele sformułowane są w sposób logiczny, przejrzysty i adekwatny do postawionej hipotezy.

Dobór materiału i metod badawczych jest właściwy do zaplanowanych celów. Prace prowadzono z wykorzystaniem modelu myszy: o genotypie dzikim, z modyfikacją *knock-out* *ApoE*^{-/-} oraz modeli transgenicznych z wprowadzonymi ludzkimi allelami genu *APOE*. W oryginalnych publikacjach stanowiących podstawę rozprawy opisano także eksperymenty z użyciem hodowli linii komórkowych N2A. Myszy inokulowane były za pomocą szczepu 22L scrapie, a w kolejnych etapach pracy wykorzystano bardzo szeroką gamę metod badawczych: od oceny neuropatologicznych markerów choroby (barwienia immunohistochemiczne i badania mikroskopowe, w tym mikroskopia konfokalna ze skanowaniem laserowym), poprzez badania proteomiczne (immunoprecypitacja, Western blot, ELISA), po molekularne analizy transkryptomiczne (qRT-PCR oraz profilowanie ekspresji genów z użyciem platformy NanoString). Zastosowanie różnorodnej metodyki umożliwiło wielopłaszczyznowe podejście do podejmowanych problemów badawczych. Dzięki takiemu podejściu wyniki uzyskane w badaniach mikroskopowych były uzupełniane o jakościowe i ilościowe dane na temat białek istotnych z punktu widzenia patogenezы choroby (apoE, PrP, białkowe markery astrocytów i komórek mikrogleju) oraz weryfikowane na poziomie RNA.

Wyniki przeprowadzonych badań opisane są w sposób logiczny i uporządkowany, według kolejności realizowania poszczególnych celów pracy. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka formułuje wnioski ujęte w pięciu punktach. Wszystkie przedstawione wnioski są spójne z przedstawionymi wynikami, a cele postawione na początku pracy zostały zrealizowane. Za najważniejsze osiągnięcia pracy uważam:

- wykazanie, że ekspresja apoE w mózgu zwiększa się pod wpływem zakażenia scrapie, i że jest to powiązane ze zmianą źródła pochodzenia tego białka (z astrocytów, które są głównymi producentami białka apoE w warunkach fizjologicznych, na komórki mikrogleju);
- ustalenie, że brak białka apoE skutkuje wzmożoną odpowiedzią neurozapalną oraz skróceniem okresu inkubacji i zwiększeniem tempa rozwoju choroby;

- ustalenie wpływu poszczególnych alleli *APOE* na konwersję PrP^C-PrP^{Sc}, oligomeryzację i akumulację białka prionu w mózgu, ze wskazaniem na genotyp $\epsilon 4/\epsilon 4$ jako najbardziej promujący zjawiska patologiczne w przebiegu choroby, a także wykazanie bezpośredniego oddziaływania pomiędzy białkami ApoE i PrP.

Dyskusja przedstawiona w obydwu załączonych publikacjach jest obszerna, wnikliwa i dowodzi bardzo dobrej znajomości aktualnej literatury związanej z poruszaną tematyką. Na uwagę zasługuje również bardzo staranne opracowanie rozprawy, nie tylko pod względem merytorycznym, ale również redakcyjnym.

Podczas zapoznawania się z rozprawą nasunęły mi się następujące pytania i uwagi:

1. Większość ilościowych oznaczeń białek opisanych w rozprawie wykonywana była z wykorzystaniem metody Western blot. Pomiar densytometryczny prążków z odniesieniem do beta-aktyny jako białka referencyjnego jest obarczony dużym błędem i uznawany za metodę półilościową, w odróżnieniu od metody immunoenzymatycznej ELISA, która umożliwia dokonanie bezwzględnego pomiaru stężenia białka. Dlaczego zatem w prezentowanych badaniach wybrano taką właśnie metodę?
2. W badaniach nad osłabioną aktywnością fagocytarną mikrogleju u myszy *ApoE*^{-/-} stwierdzono zwiększoną ilość transkryptów CD38 i Trem2 przy jednoczesnej obniżonej ekspresji obserwowanej na poziomie białka. Interesująca byłaby kontynuacja badań i wyjaśnienie, jaki mechanizm jest odpowiedzialny za zaobserwowaną rozbieżność (hamowanie translacji czy nietrwałość/degradacja powstających białek?), a także, czy/ jaką rolę w tym mechanizmie odgrywa obecność lub brak białka apoE.
3. W artykułach oryginalnych Autorki jednym z diskutowanych zagadnień jest zależność przebiegu choroby prionowej od drogi inokulacji (domózgowo lub dootrzewnowo) oraz od szczepu prionu użytego do zakażenia zwierząt laboratoryjnych. Powstaje zatem pytanie, w jakim stopniu wyniki badań uzyskanych na mysim modelu można odnieść do patomechanizmów chorób prionowych u ludzi? Pytanie wydaje się tym bardziej zasadne, że najczęstszą chorobą wywołaną przez priony u człowieka jest sporadyczna postać choroby Creutzfeldta-Jakoba, uznawana za samoistną, w której nie dochodzi do zakażenia cząsteczkami białka prionu pochodzącymi z zewnątrz. W tej chorobie proces powstawania i szerzenia się nieprawidłowego białka prionu rozpoczyna się samoczynnie w ośrodkowym układzie nerwowym, a więc mechanizmy biochemiczne i molekularne uczestniczące w rozwoju choroby mogą być inne niż w przypadku

zakażanych dootrzewnowo zwierząt. Ludzkie białko prionu nie jest również tożsame z eksperymentalnymi szczepami scrapie. Czy Doktorantka widzi możliwość kontynuacji badań z wykorzystaniem materiału tkankowego od zmarłych na CJD (na przykład bloczków parafinowych będących w posiadaniu ośrodków, które prowadzą diagnostykę *post-mortem* tej choroby)?

Powyższe komentarze nie wpływają na moją wysoką ocenę pracy, należy traktować je jedynie jako sugestie i przyczynek do ewentualnej dyskusji podczas obrony.

Podsumowując, rozprawę doktorską oraz cały dorobek naukowy Pani mgr Anity Lizińczyk oceniam bardzo pozytywnie. Recenzowana praca stanowi oryginalne rozwiązanie postawionego problemu badawczego, podjęta przez Autorkę tematyka jest aktualna i interesująca, a uzyskane wyniki wnoszą nowe elementy w rozwój wiedzy na temat patomechanizmów chorób wywołanych przez priony. Udział Doktorantki w planowaniu, wykonaniu badań i analizie uzyskanych wyników zaprezentowanych w oryginalnych publikacjach oceniam jako znaczący, a całość przedstawionej rozprawy dowodzi dużej wiedzy Autorki oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Biorąc pod uwagę wszystko powyższe, stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr Lizińczyk odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk biologicznych oraz spełnia warunki określone w art. 187 ust.1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2022.poz.574).

W związku z tym zwracam się z wnioskiem do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pani mgr Anity Lizińczyk do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Dodatkowo ze względu na następujące przesłanki:

- wyróżniającą jakość przeprowadzonych badań (szeroki zakres badań, wielowątkowe podejście i różnorodność wykorzystanych metod),
- innowacyjność i wysoką wartość poznawczą otrzymanych wyników (praca dotyczy zagadnień, które zostały podjęte przez Doktorantkę po raz pierwszy i nie były wcześniej opisywane w literaturze),

a także ze względu na fakt, iż wyniki zawarte w rozprawie zostały opublikowane w dwóch wysoko punktowanych publikacjach (łączna punktacja MNiSW 280),

z pierwszoautorskim udziałem mgr Lizińczyk, **wnoszę o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.**

Z wyrazami szacunku,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'EGolańska', with a stylized, cursive script.

dr hab. n. med. Ewa Golańska