

Prof. dr hab. Jacek Kuźnicki

Warszawa, dn. 03 sierpnia 2026 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anity Lizińczyk
pt. „Rola apolipoproteiny E w patogenezie chorób prionowych”**

**Równorzędnymi promotorami rozprawy są
dr hab. Magdalena Druszczyńska prof. Uniwersytetu Łódzkiego
oraz dr. hab. n. med. Martin Sadowski
z *New York University Grossman School of Medicine, USA***

Ogólny opis pracy

Tematem recenzowanej rozprawy doktorskiej mgr Anity Lizińczyk jest rola apolipoproteiny E w patogenezie chorób prionowych. Rozprawę stanowi cykl dwóch publikacji opublikowanych w czasopiśmie *Acta Neuropathologica Communications* w 2021 i 2026 r. (IF odpowiednio 7,6 i 5,7), mającym duży prestiż w naukach neurobiologicznych, uzupełniony o szczegółowy Opis tych prac w języku angielskim. W obu publikacjach Doktorantka jest jedną z dwóch równorzędnych pierwszych autorek.

Taka formuła rozprawy doktorskiej jest w pełni akceptowalna biorąc pod uwagę wymogi ustawowe oraz jakość obu publikacji, zróżnicowanie metod, szczegółowe omówienie wyników i rozbudowaną dyskusję. Dołączony do tych prac Opis zawiera spis publikacji Doktorantki, listę jej ustnych i plakatowych prezentacji, źródła finansowania badań oraz typowe elementy rozprawy jak: streszczenia po polsku i angielsku, hipotezę badawczą, cele pracy, opis metod, wyniki, konkluzje oraz bibliografię (49 pozycji). Zarówno w publikacjach (87 pozycji literaturowych w pierwszej i 126 pozycji w drugiej) jak i w Opisie Doktorantka powołuje się na najważniejsze prace innych autorów dotyczące chorób prionowych oraz innych chorób neurodegeneracyjnych, ze szczególnym uwzględnieniem choroby Alzheimera (AD). Lista ta wydaje się wyczerpująca i umożliwia ocenę oryginalności podjętej tematyki, jakości badań oraz ich znaczenia dla rozwoju nauki. Na końcu dokumentu (str. 145-153) znajdują się oświadczenia Doktorantki i współautorów dotyczące ich wkładu w obie publikacje. Wynika z nich, że mgr Anita Lizińczyk miała 35% wkład w publikacji z 2021 r. i 40% w publikacji z 2026 r., co zgadza się z oświadczeniami pozostałych współautorów.

Cele pracy i uzasadnienie podjęcia tematu

Celem projektu, którego realizacja i wyniki są główną częścią rozprawy, jest ustalenie roli ludzkiej apolipoproteiny E (APOE) w patogenezie prionów oraz zidentyfikowanie mechanizmów w to zaangażowanych. Biorąc pod uwagę niewystarczający stan wiedzy na ten temat, podjęcie tej tematyki jest w pełni uzasadnione. Ze względu na to, że u człowieka występują trzy allele *APOE*, uznano za konieczne porównanie roli każdego z nich w rozwoju patogenezы prionowej. Było to istotne, gdyż wiadomo, że forma *APOE4* jest czynnikiem ryzyka w AD.

Badania przeprowadzono na szczepach myszy, gdyż dostęp do pośmiertnego materiału ludzkiego jest ograniczony oraz istnieje wysokie ryzyko transmisji ludzkich prionoz. Realizację projektu podzielono na pięć etapów (str. 24 Opisu). W pierwszym zbadano jak zakażenie prionami wpływa na badany organizm i jak zmienia się ekspresja *ApoE*. Kolejnym było wyjaśnienie, jak usunięcie genu *ApoE* wpływa na tempo powstawania choroby prionowej i jej nasilenie. Trzecim etapem było zbadanie jakie mechanizmy są aktywne w nieobecności ApoE. Następnie wyjaśniano jak ludzkie odmiany białka APOE wpływają na czas inkubacji i przebieg choroby prionowej. Ostatnim etapem było zidentyfikowanie mechanizmów zależnych od poszczególnych odmian APOE w przebiegu choroby.

Materiał badawczy i metody

Chociaż u ludzi występują trzy allele genu *APOE*, to u myszy znana jest tylko jedna forma *ApoE*. Dzięki temu można było stworzyć jedną linię myszy nieprodukującą białka *ApoE* w żadnym narządzie (całkowity knock-out – myszy *ApoE*^{-/-}) oraz trzy linie myszy z dwualleliczną, ukierunkowaną zamianą (*TR-targeted replacement*) genu *ApoE* na ludzkie allele *APOE* e2, e3 i e4. W liniach tych miała miejsce ekspresja jednego ludzkiego allele pod promotorem mysiego *ApoE* (*APOE-TR* e2/e2, *APOE-TR* e3/e3 i *APOE-TR* e4/e4). Piątą badaną linią były myszy ekspresjonujące dziką (WT) formę endogennej *APOE* (str. 25 Opisu). Do badań wykorzystywano homogenat mózgu pobrany z ostatnich faz choroby prionowej szczepu myszy 22L, który nie stwarza ryzyka transmisji choroby prionowej na ludzi. Używając tego homogenatu wywoływano chorobę prionową u wszystkich 5 linii myszy i przeprowadzono cztery typy oznaczeń: analizę behawioru, ilościowe oznaczenia neuropatologiczne, analizę transkrypcji wybranych genów i badanie białek. Ich szczegółowy opis znajduje się na stronach 26-27 Opisu. Wśród metod oceniających zmiany patologiczne znalazły się: analiza obecności zmian gąbczastych w korze ruchowej M1, ocena ilości białka prionowego (PrP) w mózgu w korze somatosensorycznej S1 oraz analiza Western blot białka PrP w homogenacie mózgu, ocena poziomu PrPSc (zakaźnej i toksycznej konformacji komórkowego białka prionowego PrPC) w mózgu i śledzienie, test rozpuszczalności białka prionowego w detergentach w homogenatach mózgu i ocena oligomeryzacji białka prionowego w homogenatach mózgu. Ponadto, oznaczano całkowity poziom *ApoE* w mózgu oraz poziom ekspresji *ApoE* w formie specyficznej dla komórek mikrogleju i astrocytów, wykrywano kompleksy *ApoE*/PrP w homogenacie kory mózgowej w korze somatosensorycznej S1 oraz oceniano poziom astrogliozy i mikroglejozy. Wykonano też profilowanie transkryptomiczne astrocytów i mikrogleju, w których oznaczono poziom ekspresji wybranych genów. Oznaczono też poziom wybranych cytokin i chemokin w mózgu.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że w Opisie dobrze scharakteryzowano materiał badawczy, czyli linie myszy oraz szczegółowo opisano rodzaje doświadczeń. Liczba myszy w każdej grupie pozwoliła na uzyskania wyników statystycznie istotnych. Załączone schematy: Fig. 1 na str. 18, Fig. 2 na str. 28; Fig. 12 na str. 68; Fig. 10 na str. 117 są przejrzyste i pozwalają dobrze zrozumieć schemat badawczy i wyniki.

Wyniki kolejnych etapów pracy

Jednym z kluczowych wyników **pierwszego** etapu było pokazanie, że podczas gdy w grupie kontrolnej, tj. zaszczepionej homogenatem z mózgu zdrowych myszy (*Normal Brain Homogenate*, NBH) sygnał *ApoE* jest ograniczony do astrocytów, to u myszy zaszczepionych homogenatem inicjującym chorobę prionową (22L) zaobserwowano w porównaniu z grupą kontrolną 24-krotny wzrost ekspresji *ApoE* w mikrogleju identyfikowanym przeciwciałami na IBA1. Natomiast w astrocytach poziom *ApoE* był istotnie zmniejszony. Następnie wykazano, że zmiana ekspresji *ApoE* w tych komórkach związana jest z funkcjonalną transformacją astrocytów ze stanu spoczynkowego do stanu określanego jako przewlekłe reaktywny (zmniejszona ekspresja *ApoE*) oraz transformacją mikrogleju ze stanu obserwacji do fenotypu patologicznego MGnD – *microglial neurodegenerative phenotype*. Innymi słowy w mikrogleju miała miejsce derepresja genu *ApoE*.

Wyniki **drugiej** części wskazano, że brak *ApoE* znacząco skraca okres latencji choroby, przyspieszając pojawienie się objawów neurologicznych i molekularnych takich jak zmiany gąbczaste w mózgu, akumulacja PrPSc i utrata neuronów. Obserwacje te wskazują na dotychczas niedocenianą rolę *ApoE* w patogenezie choroby prionowej.

W **trzeciej** części wykazano nasilenie aktywacji astrocytów i mikrogleju w odpowiedzi na homogenat mózgu 22L u myszy *ApoE*^{-/-} (*ApoE*^{-/-}22L) w porównaniu ze zwierzętami posiadającymi dziką formę *ApoE* traktowanymi tym homogenatem (myszy B622L). Przyspieszony przebieg patologii prionowej przy braku ekspresji *ApoE* jest związany ze wzmocnionym fenotypem mikrogleju MGnD

i przewlekle reaktywnych astrocytów. Mikroglej MGnD nie fagocytuje resztek neuronów ani PrPSc, co nasila odpowiedź neurozapalną i wydzielanie cytokin prozapalnych przez mikroglej MGnD i astrocyty. ApoE ma zatem kluczową rolę jako opsonina i czynnik promujący aktywność fagocytarną mikrogleju. Natomiast brak ApoE sprawia, że degradacja lizosomalna jest nieefektywna.

W **czwartej** części ustalano, czy i jeśli tak, to jak poszczególne allele *APOE* wpływają na czas inkubacji i nasilenie choroby prionowej. W tym celu zaszczerpiono myszy *APOE*-TR e2/e2, *APOE*-TR e3/e3 i *APOE*-TR e4/e4 homogenatem 22L i porównywano ich parametry behawioralne i neuropatologiczne. Zaobserwowano znaczące różnice w układzie nerwowym między tymi trzema typami zwierząt polegające na ocenie ogólnego wyniku w skali scrapie (TSS), gdzie najbardziej intensywne patologie uwidoczniły się w przypadku szczepu z ekspresją *APOE*4, mniejsze u myszy z *APOE*2, a najmniejsze z *APOE*3. Nie znaleziono natomiast istotnych różnic pomiędzy myszami płci żeńskiej i męskiej, co wskazuje na brak wpływu płci na patologię prionową.

W **piątej** części, która była ostatnim etapem pracy, identyfikowano w przebiegu choroby prionowej mechanizmy, które zależały od poszczególnych allele *APOE*. Zidentyfikowano dwa mechanizmy zaangażowane w patologię prionów. Jeden z nich to akumulacja i agregacja PrPSc, a drugi to reakcja neurozapalna. Pierwszy mechanizm jest znacząco wzmacniany przez allele e4, a drugi zarówno przez allele e4 i w mniejszym stopniu przez allele e2. W podsumowaniu stwierdzono, że allele e4 jest powiązany ze zwiększoną akumulacją i oligomeryzacją PrPSc oraz odpowiedzią neurozapalną związaną z odkładaniem się PrPSc, podczas gdy allele e2 jedynie z odpowiedzią neurozapalną. Te obserwacje wyjaśniają, dlaczego zarówno allele e4, jak i e2 skracają okres latencji choroby, przyspieszają postęp objawów neurologicznych i są powiązane z większym nasileniem zmian neuropatologicznych w porównaniu z allele e3.

Wnioski

Z przeprowadzonych doświadczeń i analizy wyników zawartych w obu publikacjach Doktorantka wyciągnęła 5 wniosków, które są zebrane w Opisie na str. 36.

1. Podczas choroby prionowej poziom mózgowej ApoE wzrasta, co jest związane ze specyficzną zmianą ekspresji tego białka w komórkach mikrogleju i astrocytach. Zmniejszona ekspresja ApoE w astrocytach jest zastępowana syntezą tego białka przez mikroglej o fenotypie MGnD.
2. Brak ekspresji ApoE u myszy sprzyja patologii prionowej.
3. Brak ApoE wzmacnia prozapalny charakter mikrogleju i zmniejsza jego funkcje fagocytarne do usuwania PrPSc i resztek neuronalnych. To przyczynia się do ich akumulacji, co nasila neurozapalenie. ApoE działa jako opsonina promująca prawidłową funkcję fagocytarną mikrogleju.
4. Allele *APOE* różnicowo modulują patologię prionów, najmocniej allele e4, w mniejszym stopniu allele e2 w porównaniu z allele e3.
5. Allele e4 *APOE* wywołuje proteinopatię PrPSc, wspierając konwersję PrPC do PrPSc, akumulację i oligomeryzację PrPSc i ma najsilniejsze działanie prozapalne w porównaniu z allele e2 i allele e3.

Dyskusja

W Opisie rozprawy doktorskiej nie ma niestety wyodrębnionej części pt. Dyskusja. Jest to niezrozumiałe, bo jej brak powoduje, że nie tylko recenzent, ale i każdy inny czytelnik będzie zmuszony do zapoznania się ze szczegółową dyskusją w każdej publikacji. Obie dyskusje są bardzo obszerne, a dużą ich część stanowi powtórzenie wyników. Co więcej, nie są napisane precyzyjnie, niektóre fragmenty wydają się odnosić do tych samych zagadnień i trudno jest wyodrębnić najważniejsze elementy. Niewątpliwie, krótkie podsumowanie obu dyskusji byłoby bardzo przydatne.

Uwagi krytyczne dotyczące spraw technicznych

Powyższe i poniższe uwagi krytyczne nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę rozprawy doktorskiej. Z obowiązku recenzenta muszę jednak wskazać takie elementy, który budzą wątpliwości lub wywołują pytania. I tak, opis wywoływania choroby prionowej u myszy jest nieprecyzyjny. W Opisie są sformułowania typu „*intraperitoneally inoculated with 22L mouse adapted scrapie strain*”, podczas gdy jak napisano w metodach pracy z 2021 r. chodziło o homogenat otrzymany z mózgu myszy znajdujących się w terminalnym stanie choroby prionowej. Nie stosowano przyjętego sposobu rozróżniania nazw białek od nazw genów, które powinny być pisane kursywą. Ludzkie białka i geny pisane są zawsze wielkimi literami, a w przypadku ssaków nazwa zaczyna się wielką literą, co w Opisie nie jest stosowane w przypadku nazwy mysiej apolipoproteiny E (apoE).

Zdjęcia mikroskopowe preparatów immunohistochemicznych są w niektórych przypadkach mało kontrastowe i wydają się trudne do wykonania dokładnej analizy ilościowej. Na przykład, na Fig. 6i z pracy z 2021 r. – panel 22L 15wpi obraz WT versus *ApoE*^{-/-} wydaje się różnić, podczas gdy analiza ilościowa tej różnicy nie pokazuje. Podobnie wątpliwości powstają podczas analizy Fig. 1e-f z pracy z 2026 r. Według analizy ilościowej próby e3/ e3 versus e4/e4 w panelu 22L15wpi mają bardzo niską i jednakową intensywność sygnału (1f), podczas gdy obserwacja wizualna wydaje się wskazywać na różnice (1e). Jakość barwienia na Fig. 5a,c w pracy z 2026 r. (str. 108) jest bardzo niska, a mimo to wyniki ilościowe są bardzo jednoznaczne (Fig. 5d). Czy można było to potwierdzić metodą Western blot?

Te wątpliwości mogłyby być wyjaśnione, gdyby w Opisie znalazły się szczegółowe objaśnienia jak przetwarzano zdjęcia mikroskopowe na dane liczbowe. Co prawda w publikacjach z 2021 i 2026 r. jest odniesienie do prac Pankiewicz i wsp. 2017, 2020, w których taka metoda jest opisana, ale dotyczy to jakościowo lepszych obrazów. Nie jest też jasne, dlaczego na jednym panelu próby z różnymi allele są pokazywane w poziomie (Fig. 1), a na kolejnych - w pionie (Fig. 5 i 7)?

Intensywność prążków na kliszach po barwieniu blotów przeciwciałami wywoływanymi chemiluminescencją przedstawiano ilościowo. Jednak by wyniki były w pełni miarodajne krytyczny jest czas po jakim zatrzymano reakcję. Niektóre immunoblotty wydają się być wywoływane zbyt długo i wydają się prześwietlone. Krótsze wywoływanie mogłoby też pokazać np. na Fig. 4a w pracy z 2026 r. (str. 106), czy we wszystkich próbach każda odmiana białka APOE jest dimerem, czy tylko APOE4? Czy jest inne wyjaśnienie na podwójny prążek?

Podsumowanie recenzji

Autorka podjęła ważny i ciekawy temat, uzyskała interesujące wyniki, które mają nie tylko wartość naukową, ale mogą stanowić punkt wyjścia do badań aplikacyjnych dotyczących leczenia chorób prionowych. Podsumowała je w postaci pięciu wniosków, które dobrze oddają osiągnięcia pracy opublikowanej w dwóch oryginalnych artykułach w czasopiśmie o dużym współczynniku wpływu. Uzyskane wyniki oceniam wysoko. Wstęp w Opisie oraz w obu publikacjach wskazuje na rozległą wiedzę teoretyczną Autorki w odniesieniu do chorób prionowych i innych chorób neurodegeneracyjnych. Pod względem metodycznym również bardzo wysoko oceniam warsztat badawczy Doktorantki. Powyższe uwagi krytyczne nie zmieniają mojego poglądu, że jest to bardzo dobra praca, mająca znaczący udział w zrozumieniu mechanizmów chorób prionowych. Co więcej, wskazanie, iż allele e4 jest najbardziej niekorzystnym dla ich rozwoju stanowi dobrą wskazówkę dla badaczy choroby Alzheimera i innych chorób neurodegeneracyjnych, mogącą rozszerzyć poszukiwanie nowych i bardziej skutecznych terapii.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Anity Lizińczyk spełnia warunki określone w art. 190 pkt 2 i 3. Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668). **Tym samym składam wniosek do Komisji**

UŁ ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Anity Lizińczyk do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie zgłaszam wniosek o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej, gdyż dotyczy ona ważnego tematu, wykonano ogromną ilość pracy z wykorzystaniem optymalnego modelu, tj. szczepów myszy modyfikowanych białkiem prionowym, u których endogenne białko ApoE wymieniono na ludzkie odmiany białka APOE. W badaniach zastosowano wachlarz różnorodnych technik badawczych, od behawioralnych przez immunoanalizy skrawków mózgu do transkryptomiki i proteomiki, wymagających dużej dokładności. Doświadczenia wykonano i udokumentowano starannie, a wyniki tej pracy opublikowane w bardzo dobrym czasopiśmie znacząco poszerzają wiedzę w zakresie funkcjonowania układu nerwowego, roli białka APOE oraz mikrogleju i astrocytów w chorobie prionowej.

Z poważaniem,

Prof. dr hab. Jacek Kuźnicki
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej
i Komórkowej w Warszawie
Członek rzeczywisty PAN