



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKI HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA  
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71  
www.hirsztfeld.pl

dr hab n med Edyta Pawlak, prof PAN

Wrocław, dnia 05.05.2026 r.

INSTYTUT IMMUNOLOGII  
I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
im. Ludwika Hirsztfelda  
Polskiej Akademii Nauk  
ZAKŁAD TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
LABORATORIUM IMMUNOPATOLOGII  
53-114 Wrocław, ul. Rudolfa Weigla 12  
NIP: 896-000-56-96

## Recenzja rozprawy doktorskiej

**mgr Agaty Haško**

**pt. „Analiza zaburzeń ekspresji wybranych mikroRNA w chorobie Alzheimera”**

wykonanej w

**Collegium Medicum Uniwersytetu Rzeszowskiego  
Wydziale Medycznym**

pod opieką

**Promotora: prof. dr hab. n. med. Izabeli Zawlik  
Promotora pomocniczego: dr n. med. Natalii Potockiej**



Krajowy Naukowy Ośrodek Wiedzący (KNOW) Wrocławskie Centrum Biotechnologii 2014-2018



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.hirszfeld.pl

## I. OCENA METODOLOGICZNA I FORMALNA PRACY

### Temat pracy, trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Agaty Haško zatytułowana „*Analiza zaburzeń ekspresji wybranych mikroRNA w chorobie Alzheimer’a*” ma charakter klasycznej monografii badawczej z pogranicza neurologii klinicznej, biologii molekularnej, genetyki medycznej, neurobiologii chorób zwyrodnieniowych oraz medycyny translacyjnej. Tematyka pracy została osadzona w jednym z najistotniejszych obszarów współczesnej medycyny: poszukiwaniu płynowych, możliwie mało inwazyjnych markerów biologicznych choroby Alzheimer’a, które mogłyby uzupełnić istniejące markery amyloidowe i tau oraz zwiększyć rozumienie molekularnych mechanizmów progresji otępienia.

Wybór problematyki badawczej należy ocenić jako bardzo trafny. Choroba Alzheimer’a pozostaje najczęstszą przyczyną otępienia w populacji starzejącej się, a jednocześnie jest jednostką, której rozpoznanie i stratyfikacja coraz wyraźniej przesuwają się od klasycznej diagnozy klinicznej ku definicji biologicznej. Aktualne kryteria Alzheimer’s Association z 2024 r. wskazują, że chorobę Alzheimer’a należy rozumieć jako proces biologiczny możliwy do potwierdzenia za pomocą biomarkerów patologii amyloidowej i tau, a nie wyłącznie jako zespół objawów klinicznych. Współczesny rozwój badań nad biomarkerami krwi, w tym p-tau217, p-tau181, stosunkiem Aβ42/Aβ40, NfL i GFAP, tworzy nowy punkt odniesienia dla wszystkich kandydatów biomarkerowych, w tym również mikroRNA.

Na tym tle praca Doktorantki ma szczególne znaczenie, ponieważ nie ogranicza się do opisu stężeń klasycznych białek PMR, ale podejmuje próbę uchwycenia epigenetyczno-regulatorowego wymiaru choroby. MikroRNA są krótkimi niekodującymi cząsteczkami RNA, które regulują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym, a ich stabilność w płynach ustrojowych oraz związek z procesami zapalnymi, synaptycznymi, metabolicznymi i neurodegeneracyjnymi sprawiają, że od kilkunastu lat są intensywnie badane jako potencjalne biomarkery i cele terapeutyczne w chorobach układu nerwowego.

Doktorantka skoncentrowała się na trzech cząsteczkach: miRNA-132-3p, miRNA-146a-5p oraz miRNA-200a-3p. Wybór wymienionych trzech miRNA jest w pełni uzasadniony, łączą one obszar kliniczny, zaangażowanie w kluczowe procesy AD (plastyczność synaptyczna, neurozapalenie, stres amyloidowy) oraz biologiczny. miR-132/212 należy do najważniejszych rodzin miRNA związanych z plastycznością synaptyczną, funkcją neuronów i patologią tau; miR-146a jest uznawany za istotny regulator osi neurozapalnej NF-κB, TLR, IRAK i TRAF6; natomiast miR-200a-3p pojawia się w literaturze w kontekście odpowiedzi komórkowej na stres, regulacji szlaków związanych z amyloidem, BACE1, SIRT1 oraz przeżyciem komórek nerwowych. Ograniczenie panelu do trzech



Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący (KNOW) Wrocławskie Centrum Biotechnologii 2014-2018



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKI HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA  
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71  
www.hirszfeld.pl

cząsteczek jest racjonalne z punktu widzenia pracy doktorskiej, a jednocześnie połączenie na poziomie klinicznym i molekularnym na tyle szerokie, że pozwala na ocenę w obu wymiarach.

Najbardziej oryginalnym komponentem pracy jest powiązanie ekspresji wybranych krążących miRNA z polimorfizmami genów *APOE* i *ACE*. Gen *APOE*, zwłaszcza obecność allelu  $\epsilon 4$ , pozostaje najsilniejszym powszechnym czynnikiem ryzyka późnej postaci choroby Alzheimera, wpływającym na metabolizm lipidów, usuwanie amyloidu, funkcję gleju, neurozapalenie oraz podatność neuronów na uszkodzenie. Gen *ACE*, poprzez związek z układem renina-angiotensyna, ciśnieniem tętniczym, czynnikami naczyniowymi i degradacją A $\beta$ , stanowi interesujący gen kandydujący, choć wyniki badań asocjacyjnych dotyczących polimorfizmu I/D pozostają bardziej heterogenne. Połączenie tych dwóch osi genetycznych z regulacją miRNA nadaje rozprawie wymiar wykraczający poza rutynowe badanie biomarkerowe.

Zasadniczą wartością recenzowanej rozprawy jest więc próba integracji kilku poziomów biologii choroby: obrazu klinicznego i stadium otępienia, klasycznych biomarkerów PMR, profilu ekspresji miRNA w surowicy oraz uwarunkowań genetycznych. Taki projekt badawczy należy uznać za ambitny, aktualny i dobrze wpisujący się w kierunek medycyny precyzyjnej w neurologii. Praca ma charakter eksploracyjno-walidacyjny w ograniczonej kohorcie, ale już na obecnym etapie pokazuje dojrzałość naukową Autorki i umiejętność formułowania problemów badawczych na styku kliniki i biologii molekularnej.

#### Ocena formalno-redakcyjna

Rozprawa została przygotowana w formie zwartej monografii, a jej objętość i zakres odpowiadają wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim w naukach medycznych. Konstrukcja pracy jest logiczna i odpowiada standardom rozpraw doktorskich. Autorka konsekwentnie prowadzi Czytelnika od problemu klinicznego i biologicznego, przez założenia, metody, wyniki, dyskusję, aż do wniosków.

Strona edytorska pracy jest poprawna. Tabele, ryciny i wykresy pełnią funkcję informacyjną i porządkującą. Wykaz skrótów jest przydatny, ponieważ praca obejmuje liczne pojęcia z zakresu neurologii, genetyki, biologii molekularnej i statystyki. Streszczenie w języku polskim i angielskim syntetycznie oddaje cel, materiał, metody i główne wyniki.

Wstęp został opracowany szeroko i wyczerpująco. Pozytywnie oceniam włączenie danych epidemiologicznych, w tym danych Narodowego Funduszu Zdrowia dotyczących Polski, ponieważ pokazuje to społeczne i systemowe znaczenie analizowanego problemu.

Część poświęcona miRNA jest wystarczająco szczegółowa, by uzasadnić wybór markerów.

Cele pracy zostały sformułowane jasno. Zakres pracy jest szeroki i pozwala na ocenę zarówno wymiaru klinicznego, jak i molekularnego.





INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA  
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71  
www.hirszfeld.pl

Hipotezy badawcze zostały sformułowane jasno i precyzyjnie, w sposób możliwy do weryfikacji, a uzyskane wyniki wspierają założone hipotezy.

Piśmiennictwo jest obszerne i adekwatne do tematu.

### **Poprawność formułowania problemów, hipotez i założeń badawczych**

Problem badawczy został sformułowany prawidłowo i wynika z wyraźnej luki poznawczej. Pomimo ogromnego postępu w diagnostyce biologicznej AD nadal brakuje markerów, które w sposób prosty, powtarzalny i mało inwazyjny odzwierciedlałyby dynamikę procesu neurodegeneracyjnego, szczególnie w odniesieniu do heterogenności genetycznej i zapalno-synaptycznej. Doktorantka trafnie rozpoznała, że krążące miRNA mogą być takim uzupełniającym narzędziem badawczym.

Hipotezy zostały sformułowane w sposób przejrzysty i poddający się weryfikacji. Ich zaletą jest połączenie wymiaru klinicznego i molekularnego. Pierwsza hipoteza dotyczyła zależności profilu ekspresji krążących miRNA od stadium AD; druga wpływu obecności allelu APOE  $\epsilon 4$  na ekspresję miRNA; trzecia wpływu allelu insercyjnego ACE na ekspresję miRNA.

W pracy nie ograniczono się zatem do pytania, czy miRNA różnicują pacjentów i grupę kontrolną, lecz postawiono bardziej ambitne pytania o związek ekspresji miRNA ze stadium choroby i genotypem. Taki sposób myślenia świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Celem ich weryfikacji, Autorka podjęła się zbadania zmian ekspresji trzech wybranych miRNA w zależności od stopnia zaawansowania choroby oraz określenia związku pomiędzy ekspresją miRNA a polimorfizmami genów APOE i ACE. Ponadto przeanalizowała zależności z chorobami współistniejącymi, wybranymi parametrami biochemicznymi oraz białkami i wskaźnikami diagnostycznymi PMR, w tym A $\beta$ 1-42, A $\beta$ 1-40, p-Tau, t-Tau, A $\beta$ 1-42/A $\beta$ 1-40, p-Tau/A $\beta$ 1-42 oraz h-Tau/A $\beta$ 1-42.

Wnioski wynikają z przeprowadzonych badań. Za najbardziej uzasadniony uznaje wniosek dotyczący miRNA-132-3p jako potencjalnego markera progresji stadium otępienia. Wnioski dotyczące APOE i ACE są również ważne, lecz powinny być traktowane jako wymagające replikacji.

Uzyskane wyniki potwierdziły założone hipotezy: pierwsza i druga hipoteza uzyskały najsilniejsze potwierdzenie przede wszystkim dla miRNA-132-3p, natomiast trzecia dotyczyła wszystkich trzech analizowanych cząsteczek.

Reasumując, sformułowanie, że badane miRNA mogą w przyszłości stanowić markery diagnostyczne lub prognostyczne, jest właściwe, o ile zachowana zostaje ostrożność wynikająca z braku walidacji zewnętrznej.

### **Trafność doboru metod i narzędzi badawczych oraz umiejętność ich zastosowania**





INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKI HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA  
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71  
www.hirsztfeld.pl

Dobór metod jest adekwatny do założonego celu. Zastosowano adekwatne metody badawcze zarówno w sferze badań molekularnych jak i analizy statystycznej, co uwzględniając dobrze opracowaną stronę kliniczną, zapewniło wielopoziomą ocenę badanego problemu. Warsztat techniczny jest spójny i wskazuje na dobre przygotowanie Doktorantki do pracy z materiałem klinicznym i molekularnym.

Szczególnie wysoko oceniam połączenie biomarkerów PMR z markerami miRNA i genotypem. Taki projekt wymaga dostępu do dobrze scharakteryzowanego materiału klinicznego, odpowiedniej organizacji próbek, współpracy kliniczno-laboratoryjnej oraz zrozumienia znaczenia danych biologicznych. Praca pokazuje, że Doktorantka potrafi prowadzić badania na styku laboratorium i kliniki.

#### **Dobór piśmiennictwa i umiejętność wykorzystywania źródeł**

Dobór piśmiennictwa należy ocenić wysoce pozytywnie. Rozprawa opiera się na literaturze obejmującej wszystkie aspekty poruszane w pracy doktorskiej. Autorka wykazuje swobodę w korzystaniu z danych naukowych i potrafi odnieść własne wyniki do wyników innych badaczy.

Wysoko oceniam fakt, że dyskusja nie ogranicza się do prostego potwierdzania wyników, lecz wskazuje również rozbieżności w literaturze. Jest to szczególnie istotne w obszarze miRNA, gdzie wyniki badań są zależne od rodzaju materiału, protokołów, normalizacji i charakterystyki kohort. Doktorantka rozumie, że miRNA jako biomarkery są obiecujące, ale wymagają dalszej standaryzacji i walidacji.

#### **Poprawność językowa, stylistyczna i interpunkcyjna**

Rozprawa jest napisana z użyciem właściwej terminologii medycznej i molekularnej. Styl jest typowy dla rozpraw doktorskich. Struktura tekstu pozwala na śledzenie toku rozumowania Autorki.

Uwagi językowe dotyczą przede wszystkim drobnych niezręczności, powtórzeń i pojedynczych błędów składniowych. W pracy występują również miejsca wymagające ujednolicenia nazewnictwa miRNA oraz terminów angielskich i polskich. Są to uchybienia redakcyjne, a nie merytoryczne.

#### **PODSUMOWANIE**

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Agaty Hańko pt. „*Analiza zaburzeń ekspresji wybranych mikroRNA w chorobie Alzheimera*” stanowi samodzielne, oryginalne i wartościowe opracowanie naukowe i jest opracowaniem wysoce wartościowym i ambitnym. Autorka wykazała się dobrą ogólną wiedzą teoretyczną w dyscyplinie nauki medyczne, znajomością aktualnych problemów diagnostyki choroby Alzheimera, umiejętnością korzystania z metod biologii molekularnej oraz zdolnością do samodzielnej analizy i interpretacji danych kliniczno-laboratoryjnych.





INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71  
www.hirsztfeld.pl

Systematyczne przeglądy i badania kohortowe dotyczące krążących miRNA w AD wskazują na znaczny potencjał tej klasy cząsteczek, ale także na duże rozbieżności między publikacjami. Wu i współpracownicy już w 2016 r. wskazywali na liczne miRNA różnicujące AD i MCI, ale podkreślali brak pełnej standaryzacji. Nowsze przeglądy z lat 2024–2025 potwierdzają, że miR-132, miR-146a, miR-34a, miR-125b, miR-29 i miR-107 należą do najczęściej dyskutowanych kandydatów, lecz żaden nie osiągnął jeszcze statusu rutynowego biomarkera klinicznego.

W odniesieniu do miR-132 wyniki Doktorantki są szczególnie interesujące. Literatura podkreśla związek miR-132 z funkcją synaps, pamięcią i procesami tau. Prace dotyczące neuronopochodnych egzosomów wykazywały obniżenie miR-132/212 w AD, natomiast niektóre badania surowicy w MCI wskazywały wyniki odmienne, co pokazuje zależność od typu materiału i stadium choroby. Obserwowany w rozprawie spadek miRNA-132-3p wraz z progresją AD jest spójny biologicznie i stanowi jeden z najmocniejszych argumentów za wysoką wartością naukową pracy.

W odniesieniu do miR-146a praca wpisuje się w nurt badań nad neurozapaleniem w AD. Liczne publikacje wskazują na udział miR-146a w regulacji aktywacji mikrogleju i astrocytów oraz w odpowiedzi na amyloid i stres zapalny. Korelacja miR-146a-5p ze wskaźnikami p-Tau/A $\beta$ 42 i h-Tau/A $\beta$ 42 jest zatem wynikiem logicznym biologicznie. Jednocześnie miR-146a jest markerem mało swoistym, ponieważ jego ekspresja ulega zmianie w wielu stanach zapalnych. Oznacza to, że jego potencjalna rola kliniczna może polegać raczej na uzupełnieniu panelu niż na samodzielnej diagnostyce AD.

W odniesieniu do miR-200a-3p literatura jest mniej obszerna, ale wskazuje na jego możliwy udział w odpowiedzi neuronów na toksyczność A $\beta$ , stres oksydacyjny, regulację BACE1 oraz procesy przeżycia komórkowego. Praca Doktorantki wzbogaca ten obszar poprzez powiązanie miR-200a-3p z polimorfizmem ACE. Jest to wątek nowatorski i potencjalnie wartościowy, zwłaszcza w kontekście coraz większego znaczenia komponentu naczyniowego w patogenezie otępienia.

Reasumując, rozprawa doktorska mgr Haško dobrze koresponduje z aktualnym trendem biomedycznym: od pojedynczego biomarkera do zintegrowanego profilu biologicznego. W chorobie Alzheimera najbardziej obiecujące są obecnie modele łączące markery białkowe, genetykę, ocenę funkcji poznawczych, obrazowanie i dane omiczne. W tym kontekście wyniki mgr Agaty Haško mają wysoką wartość koncepcyjną, ponieważ wskazują, że miRNA mogą być nie tylko markerami różnicującymi grupy, ale także wskaźnikami biologicznej heterogenności choroby związanej z APOE i ACE.

Należy podkreślić, iż przedmiotem rozprawy jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Szczególnie wartościowe są wyniki dotyczące miRNA-132-3p jako potencjalnego markera progresji stadium otępienia oraz obserwacje wskazujące na związek APOE  $\epsilon$ 4 i ACE I/D z profilem ekspresji badanych miRNA. Wyniki te mają znaczenie poznawcze i translacyjne, ponieważ





INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKI HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA  
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71  
www.hirsztfeld.pl

poszerzają rozumienie biologicznej heterogenności AD i mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań walidacyjnych.

Wartościowym elementem rozprawy jest próba odniesienia wyników molekularnych do klasycznych markerów PMR i parametrów klinicznych. Integracja danych jest obecnie warunkiem postępu w badaniach biomarkerowych. Pojedynczy marker krwi rzadko wystarcza do diagnostyki choroby tak heterogennej jak AD; większe znaczenie mają modele wielowymiarowe obejmujące klinikę, genetykę, biomarkery białkowe, dane obrazowe i markery regulatorowe. Recenzowana praca idzie w tym kierunku i dlatego zasługuje na wysoką ocenę.

Podsumowując, oceniana dysertacja spełnia kryteria przypisane rozprawom na stopień naukowy doktora, określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Rozprawa prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie nauki medyczne, potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz przedstawia oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Dlatego zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie mgr Agaty Haško do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę aktualność tematu, oryginalność połączenia analiz w obszarze molekularnym i klinicznym, wartość poznawczą uzyskanych wyników, translacyjny potencjał pracy, poprawność metodologiczną oraz dojrzałość naukową Autorki, wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego o **wyróżnienie rozprawy doktorskiej** mgr Agaty Haško.

INSTYTUT IMMUNOLOGII  
I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
im. Ludwika Hirsztfeldta  
Polskiej Akademii Nauk  
ZAKŁAD TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
LABORATORIUM IMMUNOPATOLOGII  
53-114 Wrocław, ul. Rudolfa Weigla 12  
TIP: 896-009-56-96



Krajowy Naukowy Ośrodek Wiedzy (KNOW) Wrocławskie Centrum Biotechnologii 2014-2018