

Prof. dr hab. Grażyna Jasińska
Katedra Zdrowia Środowiskowego
Instytut Zdrowia Publicznego
Wydział Nauk o Zdrowiu
Uniwersytet Jagielloński

Kraków, 15 lipca 2025

Ocena osiągnięć naukowych dr Pauliny Agnieszki Pruszkowskiej-Przybylskiej w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne

Wskaźniki bibliometryczne całości dorobku naukowego:

Zgodnie z bazą Web of Science (Core Collection) pani dr Paulina Pruszkowska-Przybylska opublikowała 22 artykuły naukowe. Łączna liczba cytowań to 163, a indeks h wynosi 7. Artykuły publikowane są w uznanych pismach w dziedzinie biologii człowieka i antropologii biologicznej, oraz w dobrych pismach ogólnobiologicznych.

Ocena Osiągnięcia Naukowego „Wskaźnik palcowy 2D:4D i poziom metylacji DNA jako markery programowania epigenetycznego w tym prenatalnego w fizjologii człowieka na różnych etapach ontogenezy”

Osiągnięcie habilitacyjne stanowi siedem publikacji, z których w sześciu Habilitantka była pierwszą autorką.

Od wielu lat wiadomo, że warunki w trakcie wczesnego rozwoju, w tym płodowego i w dzieciństwie mają ogromne znaczenie dla późniejszej kondycji biologicznej i zdrowia człowieka. Jednym z istotnych czynników wpływających na rozwój i determinujących metabolizm, stan zdrowia i ryzyko chorób jest płodowe środowisko hormonalne. Uważa się, że nawet stosunkowo niewielkie różnice w stężeniach hormonów płciowych, estrogenów i androgenów, mogą mieć znaczenie dla rozwoju. Jednym z kluczowych problemów metodologicznych w badaniach wpływu wczesnego środowiska hormonalnego u człowieka są trudności w zbadaniu poziomów hormonów płciowych w życiu płodowym. W związku z tym poszukuje się biomarkerów wskazujących narażenie na te hormony. Za taki biomarker uznano wskaźnik palcowy 2D:4D. W związku z tym, że wskaźnik ten jest łatwy do zmierzenia (ale do tej kwestii jeszcze w tej recenzji wróć) pojawiła się ogromna liczba artykułów opisujących badania korelujące ten wskaźnik z bardzo różnymi cechami.

Należy podkreślić, że w ostatnich latach wiele aspektów stosowania wskaźnika 2D:4D jest krytykowane. Jednym z problemów jest brak dowodów na rzeczywiste powiązania tego wskaźnika z płodowym środowiskiem hormonalnym, kolejnym są problemy statystyczne związane ze stosowaniem zmiennych ilorazowych, a zwłaszcza jeśli w analizach pojawia się inna zmienna wyrażana ilorazowo (np. BMI). Poza tym z krytyką spotyka się tzw. efekt szuflady (*publication bias*), kiedy autorzy nie publikują wyników nieistotnych lub niezgodnych z hipotezami.

Nie oceniam jednak negatywnie stosowania tego wskaźnika w badaniach Habilitantki, bo być może wiedza na temat problemów metodologicznych jego stosowania nie była jeszcze tak

powszechna jak obecnie w czasie kiedy Jej badania były prowadzone. Ciekawym nurtem badań Habilitantki są natomiast analizy wieku epigenetycznego.

Oceniam oryginalne artykuły naukowe, a nie ich opis w Autoreferacie. Natomiast chciałabym się odnieść do bardzo częstych stwierdzeń z Autoreferatu o nowatorstwie badanego zagadnienia. To nowatorstwo często w ocenie Habilitantki wynika np. z prowadzenia badań na grupie polskiej. Oczywiście prowadzimy badania na różnych populacjach, najczęściej tych do których mamy najłatwiejszy dostęp. Jednak na ogół nie zakładamy różnic w przebiegu procesów biologicznych pomiędzy populacjami. Raczej zakładamy uniwersalność tych procesów i w związku z tym nie ma większego znaczenia jaką populację badamy. Zmienności biologicznej spodziewamy się na poziomie między-osobniczym, a nie między-populacyjnym. Oczywiście populacje mogą się różnić stylem życia czy warunkami środowiskowymi, ale to jest inne zagadnienie badawcze. Podsumowując, testowanie opisanego już zagadnienia w polskiej populacji nie jest nowatorskim aspektem prowadzenia badań.

Ocena publikacji wchodzących w skład Osiągnięcia Naukowego

(H1) Pruszkowska-Przybylska, P., Sitek, A., Rosset, I., Sobalska-Kwapis, M., Słomka, M., Strapagiel, D., Żądzińska, E. & Morling, N. (2021). Associations between second to fourth digit ratio, cortisol, vitamin D, and body composition among Polish children.

W pracy brak hipotez badawczych i przekonującego merytorycznego uzasadnienia podjęcia tego zagadnienia. We Wstępie znajdują się informacje o poprzednich badaniach, ale jest to tylko opis wyników, a nie spójne podsumowanie istniejącej wiedzy i wskazanie zasadności dalszych badań. Dodatkowo opis metodologii nie pozwala na ocenę czy próbki kortyzolu były pobierane w sposób pozwalający na analizy, które traktowały stężenia kortyzolu jako bazowe. Kortyzol wykazuje dużą zmienność okołodobową, w związku z tym by ocenić zależności z którymkolwiek z badanych w pracy czynników konieczne jest pobieranie próbek natychmiast po obudzeniu się. Jeśli próbki nie były pobierane w ten sposób trudno oczekiwać jakichkolwiek biologicznie uzasadnionych zależności. Cała próba liczyła nieco ponad 130 dzieci, ale po podziale na płeć i wartości wskaźnika 2D:4D liczebności grup znacząco się zmniejszyły, co znacznie ogranicza moc statystyczną testów i zwiększa ryzyko błędów II rodzaju. W Dyskusji tej pracy Autorki piszą "The number of investigated individuals in the various groups was not large enough to reach firm conclusions based on robust statistical power" co rodzi zasadnicze pytanie – po co prowadzić badanie i publikować wyniki jeśli Autorki same są przekonane, że próba jest tak nieliczna, że nie pozwala na przeprowadzenie rzetelnych analiz statystycznych? Jaki jest wkład takich publikacji w rozwój wiedzy?

Kolejny potencjalny problem metodologiczny wynika z metody oznaczania hormonów. Autorzy przyznają, że metoda ELISA może być mniej precyzyjna niż np. spektrometria mas, co może wpływać na dokładność oznaczeń witaminy D i kortyzolu. ELISA jest często stosowana, ale brak odniesienia do poziomu dokładności tych pomiarów w badaniach grup dzieci stanowi ograniczenie badania. W badaniu brak jest również pełnej kontroli zmiennych środowiskowych. Nie kontrolowano takich czynników jak stres, dieta czy suplementacja witaminy D.

W pracy nie uniknięto również pewnych niedociągnięć statystycznych. I tak np. wskaźnik 2D:4D jest zmienną ciągłą i w związku z tym traktowanie go jako zmiennej binarnej wymaga lepszego uzasadnienia. Dodatkowo w pracy podkreśla się statystycznie istotną różnicę w

stężeniu witaminy D u chłopców w zależności od wskaźnika 2D:4D, mimo że sam efekt jest słaby i oparty na małej liczbie przypadków. O ile w Dyskusji Autorki zwróciły uwagę na ten problem, o tyle w Streszczeniu znajduje się zdanie: "...it might indicate an effect of prenatal programming on the concentrations of steroid hormones in later life". Autorki słusznie przyznają, że większość zależności okazała się nieistotna statystycznie, ale nie analizują wnikliwie potencjalnych przyczyn takiego wyniku – np. wpływu sezonowości, czy zmienności dziennej hormonów.

(H2) Kobus, M., Sitek, A., Rosset, I., Pruszkowska–Przybylska, P., & Żądzińska, E. (2021). Association of prenatal sex steroid exposure estimated by the digit ratio (2D: 4D) with birth weight, BMI and muscle strength in 6-to 13-year-old Polish children.

W badaniu na podkreślenie zasługuje liczebność próby, która jest znacząca i pozwala na rzetelne analizy statystyczne. Nowatorskim aspektem tej pracy jest również uwzględnienie interakcji między prenatalnymi czynnikami hormonalnymi a postnatalnymi trajektoriami wzrostu i siły mięśniowej w kontekście dimorfizmu płciowego. Jednak i w tej publikacji znajdują się pewne niedociągnięcia. Choć badanie obejmuje dużą próbę dzieci, jego przekrojowy charakter ogranicza możliwość wnioskowania przyczynowego o wpływie ekspozycji prenatalnej na rozwój postnatalny. Dane podłużne pozwoliłyby na lepsze śledzenie trajektorii rozwoju. W wielu analizach stwierdzono istotność statystyczną przy bardzo niskich wartościach współczynników korelacji (np. $r \approx 0.06-0.09$), co może wskazywać na słabą siłę związku i ryzyko nadinterpretacji wyników. Przy tak dużej liczebności próby nawet niewielkie różnice mogą być statystycznie istotne, ale pojawia się pytanie o ich znaczenie biologiczne.

(H3) Pruszkowska-Przybylska P., Kobus M., Iljin A., Wiktorska J.A., Żądzińska E., Sitek A. (2021). Thyroid diseases and second to fourth digit ratio in Polish adults.

W pracy zastosowano dobrze ugruntowane narzędzia pomiarowe u ponad 170 dorosłych osób. W części zastosowano odpowiednie metody statystyczne, jednak brak wielowymiarowej analizy ogranicza możliwość wnioskowania o współzależnościach między zmiennymi.

Praca podejmuje temat niemal nieobecny w literaturze: potencjalny związek między prenatalną ekspozycją hormonalną (reprezentowaną przez 2D:4D) a występowaniem chorób tarczycy w życiu dorosłym. Autorki przedstawiają to zagadnienie jako nową ścieżkę w badaniach nad wczesnym programowaniem hormonalnym i jego skutkami zdrowotnymi. Natomiast uzasadnienie teoretyczne przeprowadzenia tego badania nie jest w pełni przekonujące. Autorki powołują się na zależności pomiędzy chorobami tarczycy a stężeniami hormonów płciowych w dorosłości, ale nie uzasadniają dlaczego spodziewają się związku pomiędzy 2D:4D a hormonami tarczycy. Czy zakładają, że 2D:4D jest predyktorem hormonów płciowych w dorosłości? Zgodnie z moją wiedzą nie ma na to mocnych dowodów (np. badanie mojego zespołu, które analizowało związek pomiędzy 2D:4D a estradiolem i progesteronem w próbkach pobieranych codziennie przez cały cykl menstruacyjny nie wykazało żadnych statystycznie istotnych zależności).

Pytania rodzi też liczebność uczestników w niektórych grupach, zwłaszcza tylko kilku mężczyzn z chorobami tarczycy. Autorzy przyznają, że liczebność nie pozwoliła na zastosowanie modeli wielowymiarowych – co istotnie osłabia analityczną jakość pracy. Nie uwzględniono również niektórych istotnych czynników wpływających na funkcjonowanie

tarczycy, takich jak status hormonalny (np. menopauza, terapia hormonalna), czas trwania choroby, stosowane leki, palenie, aktywność fizyczna czy dieta. Analiza opiera się na kategoryzacji wzorca palców (≥ 1 vs < 1), co jest podziałem arbitralnym. Na gruncie statystycznym ryzykowną praktyką jest korelowanie dwóch zmiennych wyrażonych jako indeksy ilorazowe (2D:4D z BMI lub WHR). Szereg artykułów zwraca uwagę na własności statystyczne indeksów ilorazowych, które są skomplikowane i czasami generują artefakty.

(H4) Pruszkowska-Przybylska, P., Brennecke, S., Moses, E. K., & Melton, P. E. (2022). Evaluation of epigenetic age calculators between preeclampsia and normotensive pregnancies in an Australian cohort.

Tę pracę można uznać za oryginalną i inowacyjną ponieważ testuje hipotezę szybszego starzenia epigenetycznych wśród ciężarnych kobiet ze stanem przedrzucawkowym. Badanie ma zdecydowaną przewagę nad poprzednimi badaniami, gdzie analizowano głównie pojedyncze wskaźniki DNAmAge. W pracy tej zastosowano zaawansowaną i starannie dobraną metodologię obejmującą siedem modeli epigenetycznego starzenia. Badanie jest innowacyjne dzięki równoległemu zastosowaniu aż siedmiu wskaźników starzenia. Wnioski uzyskane w tej pracy mogą stanowić podstawę do przyszłych badań nad molekularnymi predyktorami ryzyka komplikacji ciąży. Praca bardzo dobrze zaplanowana od strony metodologii badawczej, oparta na przekonująco zarysowanym podłożu teoretycznym, z bardzo wyczerpującą i przejrzystą dyskusją wyników.

Badania ma pewne ograniczenia. Jednym z nich jest niepełna kontrola zmiennych potencjalnie zakłócających, a innym fakt, że materiał biologiczny pobrano dopiero po rozpoznaniu stanu przedrzucawkowego, co ogranicza możliwość określenia, czy różnice w DNAmAge są przyczyną, skutkiem czy współwystępującym zjawiskiem. Pomiar w pojedynczym punkcie czasowym uniemożliwia również analizę dynamiki zmian metylacji w czasie. Niemniej pomimo tych ograniczeń praca ta stanowi istotne osiągnięcie metodologiczne i poznawcze.

(H5) Pruszkowska-Przybylska, P., Kobus, M., Żądzińska, E., Rosset, I., Pruszkowska, M., Kuczyński, W., & Sitek, A. (2023). The age difference in 2D: 4D among the Polish population: An exploratory study.

Badanie podjęło ważny metodologiczny problem zależności wskaźnika 2D:4D od wieku. Wiele poprzednich badań wykazywało lub opierało się na założeniu, że wskaźnik ten stabilizuje się w okresie prenatalnym i jego wartość nie zmienia się w trakcie rozwoju postnatalnego i w dorosłości. Analizy wskazujące, że ten wskaźnik jednak zmienia się z wiekiem podważałyby sens stosowania go jako markera hormonalnego środowiska prenatalnego. Na dodatek kontrola do wieku nie jest tu możliwa (wbrew temu co sugerują Autorzy), bo jeśli wskaźnik rzeczywiście zmienia się nie ma żadnej pewności, że jego zmiany są liniowe.

Badanie Habilitantki jednak nie jest przekonujące ze względu na metodologię. Wskaźnik 2D:4D jest z jednej strony łatwy do zmierzenia, nieinwazyjny, pomiary możliwe do przeprowadzania w każdych warunkach. Jednakże ta łatwość pomiarów jest pozorna w związku z subtelnymi różnicami w długości palców. Pomiary powinny być wykonane na skanach dłoni. Każdy skan powinien być zmierzony dwukrotnie, w odstępie czasowym, przez jednego badacza czy badaczkę, i procedura pomiarowa powtórzona przez innego badacza. W tym badaniu nie ma pewności czy pomiary były prowadzone przez tę samą osobę, czy różne

osoby i były robione za pomocą suwmiarki. Tak robione pomiary z dużym prawdopodobieństwem nie mają wymaganej w badaniach precyzji.

Niemniej należy mieć nadzieję, że praca ta może stanowić punkt wyjścia dla rewizji interpretacji wskaźnika 2D:4D w kontekście badań nad płcią, rozwojem i biomarkerami hormonalnymi.

(H6) Pruszkowska-Przybylska, P., Dupont, M. E., Jacobsen, S. B., Smerup, M., Tfelt-Hansen, J., Morling, N., & Andersen, J. D. (2024). Evaluation of DNAmAge in paired fresh, frozen, and formalin-fixed paraffin-embedded heart tissues.

Badanie podejmuje pionierską próbę oceny wpływu metod przechowywania materiału biologicznego na szacunki wieku epigenetycznego za pomocą różnych „zegarów” metylacyjnych. Dotychczas brakowało danych porównujących DNAmAge w tkance świeżej, mrożonej i FFPE, szczególnie w kontekście serca – tkanki rzadko uwzględnianej w tego typu analizach. Innowacyjność polega także na połączeniu podejścia forensycznego i biomedycznego oraz wskazaniu potrzeby opracowania specyficznego modelu DNAmAge dla tkanek sercowych.

Praca wnosi nową wiedzę do dziedziny epigenetyki, pokazując, że sposób przechowywania tkanek wpływa na oszacowania DNAmAge, a FFPE może prowadzić do istotnego ich zaniżania. Jest to jedno z pierwszych badań testujących wiele zegarów metylacyjnych w jednej tkance i na tym samym materiale biologicznym, co pozwala na unikalne porównania między algorytmami. Praca ta stanowi ważny krok w kierunku walidacji narzędzi epigenetycznych dla zastosowań klinicznych i sądowych w odniesieniu do konkretnego typu tkanki.

(H7) Pruszkowska-Przybylska, P., Noroozi, R., Rudnicka, J., Pisarek, A., Wronka, I., Kobus, M., Wysocka, B., Ossowski, A., Spólnicka, M., Wiktorska, J., Iljin, A., Pośpiech, E., Branicki, W. & Sitek, A. (2024). Potential Predictor of Epigenetic Age Acceleration in Men: 2D: 4D Finger Pattern.

Praca wprowadza podejście polegające na powiązaniu wskaźnika 2D:4D – traktowanego tu znów, pomimo licznych opinii krytycznych, jako wskaźnik prenatalnej ekspozycji hormonalnej – z przyspieszeniem wieku epigenetycznego u dorosłych mężczyzn. Nowatorskie jest tu wykorzystanie różnorodnych epigenetycznych zegarów (w tym PhenoAge i DNAmTL), co pozwala na ocenę różnych aspektów biologicznego starzenia.

Oprócz zasadniczych ograniczeń wynikających z uznawania wskaźnika 2D:4D jako biomarkera prenatalnego narażenia na hormony badanie ma jeszcze kilka problemów metodologicznych. Badanie opiera się na stosunkowo niewielkiej liczbie uczestników, co ogranicza moc statystyczną. Brakuje analizy mocy (power analysis), która mogłaby uzasadnić wiarygodność uzyskanych wyników. Skupienie się wyłącznie na mężczyznach eliminuje możliwość porównań między płciowych i ogranicza zakres generalizacji. Ponownie, jak w poprzednich artykułach przedstawionych do oceny, zaklasyfikowanie uczestników na podstawie arbitralnego progu 2D:4D może prowadzić do uproszczenia i utraty informacji. Przeanalizowanie zmiennej jako ciągłej byłoby metodologicznie bardziej rzetelne i pozwoliłoby uniknąć efektów progowych. W modelach nie uwzględniono czynników takich jak poziom aktywności fizycznej, palenie, stres, dieta czy status hormonalny (np. testosteron), które mogą wpływać na epigenetyczne starzenie niezależnie od

2D:4D. Dodatkowo, w pracy brak głębszej dyskusji o mechanizmach biologicznych. Pomimo tego, że praca przywołuje hipotezę o wpływie hormonów płciowych na metylację, nie podejmuje bardziej pogłębionej analizy możliwych dróg molekularnych, np. z udziałem receptorów androgenowych lub czynników transkrypcyjnych wpływających na zegary epigenetyczne.

Pozostałe osiągnięcia Habilitanki

Pani dr Paulina Pruszkowska-Przybylska wykazuje się bardzo dobrą aktywnością naukową. Nawiązuje współpracę krajowe i zagraniczne. Odbyła staże naukowe, np. w Australii i Danii, których rezultatem były publikacje. Aplikuje o granty zewnętrzne. Kierowała własnym projektem badawczym MINIATURA w ramach grantu otrzymanego z Narodowego Centrum Nauki. Fakt, że nie otrzymała innych grantów wynika z pewnością również z bardzo niskiego współczynnika finansowania w NCN.

Dr Pruszkowska-Przybylska prowadzi również aktywną działalność dydaktyczną i popularyzującą naukę, łącznie z promotorstwem prac dyplomowych. Za działalność dydaktyczną otrzymała nagrody i wyróżnienia.

W Autofereracie znajduje się również zarys planów na przyszłość. Planów nie oceniam, natomiast obecnie odchodzi się od stosowania wskaźnika 2D:4D jako biomarkera hormonalnego środowiska prenatalnego, ze względu na liczne ograniczenia metodologiczne. W związku z tym pozwalam sobie zasugerować rozważenie modyfikacji tych planów.

Podsumowując, działalność naukowa Pani dr Pruszkowskiej-Przybylskiej jest na dobrym poziomie. Jest ona aktywną badaczką, nawiązującą wartościowe współpracy naukowe. Zwłaszcza badania epigenetyczne zasługują na uznanie, ze względu na ich innowacyjne aspekty.

W związku z powyższym popieram dopuszczenie Pani dr Pruszkowskiej-Przybylskiej do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U 2024 r. poz. 1571 ze zm.). Wniosek Habilitanki spełnia kryteria sprecyzowane w art. 219 tejże ustawy.

Prof. dr hab. Grażyna Jasińska