

Olsztyn, 27.01.2026

Prof. dr hab. Agnieszka Waclawik,
Kierownik Zespołu Biologii Molekularnej Rozrodu
InLife Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk
ul. Trylińskiego 18, 10-683 Olsztyn
a.waclawik@pan.olsztyn.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Wiszpolskiej

pt. „Wpływ bisfenolu A (BPA) na transkryptom wątroby i nerek myszy (łac. *Mus musculus*)”

Ogólna charakterystyka

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Fizjologii i Patofizjologii Człowieka Collegium Medicum Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, pod kierunkiem Pani dr hab. n. med. Marty Majewskiej, prof. UWM (promotor), oraz Pani dr hab. n. med. Ewy Lepiarczyk, prof. UWM (promotor pomocniczy). Badania były finansowane ze środków statutowych Collegium Medicum UWM (nr 61.610.008–110) oraz w ramach projektu Preludium Narodowego Centrum Nauki (nr 2018/31/N/NZ7/01252). Badania przeprowadzono zgodnie z decyzją Lokalnej Komisji Etyki ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie (nr 46/2019).

Rozprawa doktorska składa się z cyklu dwóch oryginalnych artykułów naukowych, stanowiących spójną całość, opublikowanych w czasopismach z listy *Journal Citation Reports* (JCR): *Cancers* (2023) oraz *Frontiers in Molecular Biosciences* (2023). Łączny współczynnik oddziaływania (*impact factor*, IF) obu czasopism wynosi 10,2, natomiast suma punktów MEiN – 340. W obu publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym; przy czym w artykule opublikowanym w czasopiśmie *Cancers* udział Doktorantki oraz Pani dr hab. n. med. Ewy Lepiarczyk został określony jako równorzędny. Publikacje mają charakter wieloautorski (łącznie jedenastu autorów). Z dołączonych do rozprawy doktorskiej oświadczeń wynika, że wkład Doktorantki w powstanie publikacji wchodzących w skład Jej rozprawy doktorskiej jest znaczący. Pani mgr Monika Wiszpolska brała udział w opracowaniu koncepcji badań oraz określeniu ich celu i metodyki, wykonaniu i analizie badań laboratoryjnych, interpretacji wyników, a także w przygotowaniu i redakcji manuskryptów do publikacji.

Cykl publikacji, stanowiący zasadniczą część rozprawy doktorskiej, poprzedzony jest polskojęzycznym opracowaniem obejmującym: spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, spis treści, wykaz skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp zakończony sformułowaniem celu badań i hipotez badawczych, opis metodyki, prezentację wyników, podsumowanie i wnioski oraz piśmiennictwo. Ponadto do rozprawy dołączono analizę bibliometryczną dorobku naukowego Doktorantki oraz oświadczenia współautorów publikacji. Pod względem formalnym rozprawa doktorska mgr Marty Wiszpolskiej spełnia wymagania stawiane tego typu opracowaniom.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Celem pracy była ocena wpływu przewlekłej ekspozycji doustnej na związek endokrynnie czynny - bisfenol A (BPA; 50 mg/kg m.c. przez 3 miesiące) na profil transkryptomyczny wątroby i nerek myszy. Rozprawa integruje wyniki dotyczące genów o zróżnicowanej ekspresji (DEG), długich niekodujących RNA (DEL) oraz zdarzeń alternatywnego splicingu (DAS) z analizą funkcjonalną przeprowadzoną z wykorzystaniem ontologicznych baz danych genów (GO) oraz bazy szlaków sygnałowych KEGG, a także z walidacją wybranych genów metodą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR).

Doktorantka zastosowała kompleksową analizę transkryptomiczną obejmującą izolację RNA, przygotowanie bibliotek Illumina TruSeq, sekwencjonowanie na NovaSeq 6000, kontrolę jakości danych (FastQC), mapowanie odczytów (STAR), analizę różnicowej ekspresji (DESeq2), identyfikację zdarzeń alternatywnego splicingu oraz adnotacje funkcjonalne (g:Profiler, GO, KEGG). Dane surowe uzyskane w wyniku sekwencjonowania zostały zdeponowane w Europejskim Archiwum Nukleotydów (ENA; PRJEB65086 – wątroba, PRJEB59035 – nerka). Walidację wyników analiz transkryptomicznych przeprowadzono metodą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym.

Rozprawa wnosi oryginalny, wielopoziomowy opis odpowiedzi narządów detoksykacyjnych na ekspozycję na bisfenol A, uwzględniający analizę DEG–DEL–DAS. Uzyskane wyniki sugerują zaburzenia fosforylacji oksydacyjnej, funkcji mitochondriów i rybosomów, autofagii oraz nagromadzenia reaktywnych form tlenu w odpowiedzi działanie badanego związku. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej są merytorycznie istotne dla dyscypliny nauk medycznych. Praca jest spójna, rzetelna i oryginalna, a zakres zastosowanych metod (sekwencjonowanie nowej generacji, analizy DEG/DEL/DAS, analizy GO/KEGG, qPCR) jest adekwatny do sformułowanych celów badawczych.

Do najważniejszych wyników pracy można zaliczyć:

- W **wątrobie** zidentyfikowano 101 genów o zróżnicowanej ekspresji (48 o podwyższonej oraz 53 o obniżonej ekspresji) oraz 8 długich niekodujących RNA. Wykazano również 215 zdarzeń alternatywnego splicingu (RI, SE, A5SS, A3SS, MXE). Analizy funkcjonalne wskazywały m.in. na zaburzenia modyfikacji makrocząsteczek, procesów metabolicznych białek oraz elementów fosforylacji oksydacyjnej i karcynogenezy. Wybrane geny (np. *GSTA1*, *DOCK1*, *NFIB*, *SPINK1*) powiązano z hepatotoksycznością i karcynogenezą. Walidacja metodą qPCR potwierdziła profile ekspresji siedmiu genów (m.in. *INTS2*, *INHBA*, *HEG1*).
- W **nerce** ujawniono 433 geny o zróżnicowanej ekspresji (232 o podwyższonej oraz 201 o obniżonej ekspresji), 95 długich niekodujących RNA oraz 383 zdarzenia alternatywnego splicingu, z dominującym udziałem zdarzeń typu RI. Analizy GO i KEGG wskazały na zaburzenia fosforylacji oksydacyjnej, funkcji mitochondriów i rybosomów, a także na aktywację szlaków związanych z chemiczną karcynogenezą indukowaną przez reaktywne formy tlenu. Walidacja qPCR potwierdziła kierunek zmian ekspresji 13 genów (m.in. *SULT2A1/SULT2A2*, *AKT3*, *ATM*).

Publikacjom wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej towarzyszy opracowanie w języku polskim, obejmujące 30 stron. Należy podkreślić, że ta część pracy została przygotowana starannie oraz poprawnie zarówno pod względem merytorycznym, jak i językowym. We wstępie Doktorantka klarownie wprowadza czytelnika w zagadnienia

związane z bisfenolem A, uzasadniając wybór tematyki dotyczącej oddziaływania tego endokrynnie czynnego związku na organizm człowieka. Ponadto dokonuje przeglądu dotychczasowej literatury dotyczącej wpływu bisfenolu A na wątrobę i nerki, narządy odpowiedzialne za detoksykację, metabolizm oraz eliminację toksyn i związków chemicznych.

W dalszej części opracowania polskojęzycznego Doktorantka zawarła jasno i poprawnie sformułowany cel pracy oraz hipotezy badawcze. Cel pracy został zrealizowany dzięki odpowiednio zaplanowanym doświadczeniom opisanym w rozdziale Metodyka. W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawiła najważniejsze wyniki badań. Opracowanie zamyka podsumowanie i wnioski. Chciałabym zaznaczyć, że wnioski zostały sformułowane zasadniczo poprawnie. Uważam jednak, że wnioski piąty i szósty wymagają korekty, ponieważ w obecnym brzmieniu sugerują, iż w rozprawie badano nagromadzenie reaktywnych form tlenu lub wykazano progresywne uszkodzenie nerek. Można pozostawić te odniesienia, jednak należy zastosować takie sformułowania, aby jednoznacznie wskazywały, że są to przesłanki wynikające z danych literaturowych, a nie z badań własnych. Podobne niefortunne sformułowania występują również w streszczeniu, tj. we fragmencie „Wyniki potwierdzają, iż BPA wpływa na profil transkryptomyczny genów w wątrobie i nerkach, przyczyniając się do ich dysfunkcji. W wątrobie, zaburza funkcję rybosomów oraz prowadzi do dysregulacji procesów fosforylacji oksydacyjnej. W nerkach indukuje stres oksydacyjny oraz zakłóca prawidłową pracę mitochondriów”. Są to pewnego rodzaju skróty myślowe, dlatego fragmenty te powinny zostać odpowiednio przeredagowane, tak aby precyzyjnie odzwierciedlały zakres przeprowadzonych badań.

Pytania i uwagi

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej były już poddane wnikliwej analizie przez redakcję czasopism i recenzentów, a fakt ich opublikowania w uznawanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym świadczy o ich istotnej wartości naukowej. Niemniej jednak lektura rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Wiszpolskiej nasunęła mi kilku pytań i uwag, zarówno o charakterze merytorycznym, jak i redakcyjnym, które przedstawiam poniżej.

- 1) Zastosowano pojedynczą, stosunkowo wysoką dawkę 50 mg/kg m.c. (LOAEL). Proszę o rozwinięcie, w jaki sposób Autorka ocenia przekładalność uzyskanych wyników na typowe niskodawkowe narażenie populacyjne ($\mu\text{g/kg/d}$). Czy rozważano zastosowanie wariantu wielodawkowego lub niższych dawek, a także krótkoterminowych i długoterminowych punktów czasowych?
- 2) Czy mierzono rzeczywiste spożycie wody i/lub BPA oraz stężenia BPA lub jego glukuronidu we krwi, moczu bądź tkankach? Jeżeli nie, informacja ta powinna zostać uwzględniona w ograniczeniach badania, gdyż brak jest danych dotyczących efektywnych dawek osiąganych przez zwierzęta.
- 3) Badania przeprowadzono wyłącznie na samicach; proszę o odniesienie się do potencjalnych różnic płciowych w odpowiedzi na badany związek endokrynnie czynny oraz o uzasadnienie wyboru samic jako modelu badawczego.
- 4) W analizach DAS w wątrobie przyjęto próg $\text{FDR} < 0,05$, natomiast w nerce $\text{FDR} < 0,001$; z kolei dla analiz DEG zastosowano kryteria $|\log_2\text{FC}| > 1$ oraz $q < 0,05$. Proszę o uzasadnienie zastosowania odmiennych progów istotności statystycznej między tkankami oraz o odniesienie się do ich wpływu na porównywalność uzyskanych wyników.

- 5) Czy w analizach transkryptomicznych (w tym modelach DESeq2) uwzględniono efekt serii („batch effect”)?
- 6) W metodycy wskazano, że do analiz wybrano próby RNA o współczynniku integralności (RIN) powyżej 7,5. najwyższym RIN. W związku z tym proszę wyjaśnić czy wszystkie zwierzęta weszły do analiz.
- 7) Jak zweryfikowano stabilność użytych do analiz genów referencyjnych *UBC* i *ACTB*? Jakie były efektywności starterów w metodzie Pfaffla i czy uwzględniono je w kalkulacji względnej ekspresji?
- 8) Proszę o doprecyzowanie informacji zawartych w oświadczeniach załączonych do publikacji. Jakie analizy laboratoryjne były wykonywane przez Doktorantkę oraz czy przeprowadzała ona również analizy bioinformatyczne?
- 9) Które wnioski uznaje Pani za specyficzne dla danego narządu, a które za wspólne dla wątroby i nerki? Proszę wskazać 2–3 „uniwersalne biomarkery” zmian indukowanych przez BPA.
- 10) Jak Pani zinterpretuje wyniki analiz KEGG dotyczące szlaków „Alzheimer/Parkinson” w nerce, aby uniknąć nadinterpretacji?
- 11) Proszę przedstawić plan walidacji funkcjonalnej wyników, wskazując kluczowe markery immunochemiczne, cechy histologiczne oraz spodziewane zmiany parametrów biochemicznych (AST/ALT, kreatynina/BUN) i ich powiązanie z danymi transkryptomicznymi.
- 12) Jakie znaczenie dla zdrowia publicznego mają uzyskane wyniki w kontekście monitoringu niskodawkowej ekspozycji na BPA oraz potencjalnych paneli biomarkerów możliwych do klinicznego zastosowania?

Pragnę jednak zaznaczyć, że nieliczne uwagi krytyczne zawarte w recenzji w żaden sposób nie umniejszają wartości merytorycznej całej pracy. Większość moich uwag ma charakter dyskusyjny i zachęca do wymiany poglądów, nie decydując jednak o całościowym odbiorze ocenianej pracy doktorskiej.

Wniosek końcowy

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje teoretyczną wiedzę mgr Marty Wiszpolskiej w zakresie dyscypliny nauk medycznych oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Oceniana rozprawa doktorska w pełni spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z tym zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Marty Wiszpolskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



Prof. dr hab. Agnieszka Wacławik