

dr hab. Magdalena Kowalik  
Zespół Fizjologii i Toksykologii  
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności  
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Olsztyn, dnia 14.04.2025 r.

## OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**mgr Ewy Mlyczyńskiej**

**pt. "Expression and role of visfatin and phoenixin-14 in porcine corpus luteum function"**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Mlyczyńskiej została wykonana pod kierunkiem Promotora naukowego Pani prof. dr hab. Agnieszki Rak w Pracowni Fizjologii i Toksykologii Rozrodu Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydziału Biologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Tematem pracy doktorskiej jest wyjaśnienie udziału wisfatyny i feniksyny-14 w regulacji funkcji ciała żółtego (CL) świni domowej w czasie cyklu i wczesnej ciąży. Podjęta tematyka badawcza jest w pełni uzasadniona i wpisuje się w naukowe zainteresowania Zespołu badawczego, w którym Doktorantka realizowała badania do pracy doktorskiej. Należy podkreślić, że badania do pracy doktorskiej były realizowane w ramach projektów badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, w tym projekt OPUS 16 (2018/31/B/NZ9/00781) kierowany przez Panią Promotor, projekt PRELUDIUM 19 (2020/37/N/NZ9/00981) kierowany przez Doktorantkę oraz dwa projekty wewnętrzne Uniwersytetu Jagiellońskiego kierowane również przez Doktorantkę.

Oceniana dysertacja w rzetelny i ciekawy sposób przedstawia i systematyzuje ogrom informacji dotyczących adipokiny - wisfatyny oraz neuropeptydu – feniksyny-14, które zaliczane są do hormonów metabolicznych. Oba hormony mają wielokierunkowe działanie, zaangażowane są w regulację pobierania pokarmu, kontrolę poziomu glukozy i insuliny, modulację odpowiedzi immunologicznej, a także biorą udział w regulacji homeostazy energetycznej, głównie przez modulację metabolizmu węglowodanów czy lipidów. Najnowsze badania wskazują na ich możliwy udział w kontroli funkcji układu rozrodczego samicy. Jednak rola oraz mechanizm działania wisfatyny i feniksyny-14 w regulacji procesów na poziomie ciała żółtego u świni, nie są w pełni wyjaśnione. Właściwe funkcjonowanie ciała żółtego warunkuje prawidłowy przebieg cyklu oraz zapoczątkowanie i utrzymanie ciąży, dlatego też, określenie wpływu wisfatyny i feniksyny-14 na CL oraz wybrane procesy zaangażowane w regulację funkcji tego narządu, których podjęła się Doktorantka należy uznać za nowatorskie i ważne. Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Mlyczyńskiej wpisuje się w przedstawione zagadnienia. Ma ona na celu pełniejsze poznanie roli hormonów metabolicznych w regulacji procesów rozrodczych świni. Zagadnienia poruszane przez Doktorantkę są aktualne i godne uwagi.



Oceniana rozprawa doktorska składa się z dwóch części. Pierwszą część stanowi obszerna, 118-to stronicowa część opisowa w języku angielskim przygotowana na wzór klasycznej monografii obejmująca: spis publikacji składających się na rozprawę doktorską (1 strona), wykaz projektów w ramach których finansowano badania (1 strona), wykaz skrótów (2 strony), streszczenie w języku angielskim (3 strony), streszczenie w języku polskim (4 strony), wstęp (13 stron), hipoteza i cele badań (1 strona), materiał i metody (22 strony), wyniki (26 stron), dyskusja (17 stron), podsumowanie i wnioski (6 stron), ograniczenia badań oraz dalsze perspektywy (2 strony), bibliografia (17 stron, obejmująca 164 pozycji).

Drugą część rozprawy stanowią oryginalne publikacje naukowe, w tym trzy prace opublikowane – niżej wyszczególnione - wraz z oświadczeniami współautorów oraz jeden manuskrypt pracy złożony do recenzji w czasopiśmie *Theriogenology* (IF = 2,4, pkt. MNiSW = 140). Publikacje zostały opublikowane w języku angielskim w latach 2023-2024 w recenzowanych, międzynarodowych czasopismach naukowych z listy Journal Citation Reports, których wskaźniki naukometryczne są wysokie: łączny wskaźnik IF z roku opublikowania prac wynosi 9,1, a liczba punktów MNiSW - 480.

1. **Mlyczyńska E**, Zaobidna E, Rytelewska E, Dobrzyń K, Kieżun M, Kopij G, Szymańska K, Kurowska P, Dall'Aglio C, Smolińska N, Kamiński T, Rak A. Expression and regulation of visfatin/NAMPT in the porcine corpus luteum during the estrous cycle and early pregnancy. *Animal Reproduction Science*, 2023, 250: 107212. (IF = 2,2, pkt. MNiSW = 140)

2. **Mlyczyńska E**, Kurowska P, Wachowska D, Grzesiak M, Dupont J, Rak A. Phoenixin 14 as a novel direct regulator of porcine luteal cell functions. *Biology of Reproduction*, 2024; 110 (1): 154-168. (IF = 3,1, pkt. MNiSW = 200)

3. **Mlyczyńska E**, Rytelewska E, Zaobidna E, Respekta-Długosz N, Kopij G, Dobrzyń K, Kieżun M, Smolińska N, Kamiński T, Rak A. In vitro effect of visfatin on endocrine functions of the porcine corpus luteum. *Scientific Reports*, 2024; 14 (1): 14780. (IF = 3,8, pkt. MNiSW = 140)

Przedstawione publikacje są wieloautorskie, jednak na uwagę zasługuje fakt, że Pani mgr Ewa Mlyczyńska w tych pracach jest pierwszym autorem. Zgodnie z dołączonymi do rozprawy doktorskiej oświadczeniami wszystkich współautorów publikacji, udział Doktorantki w każdej z prac był wiodący, wynosił od 51 do 64% i polegał na: opracowaniu koncepcji i metodologii badań, weryfikacji danych, przeprowadzeniu badań, walidacji i wizualizacji wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu. Należy podkreślić również udział Doktorantki w pozyskiwaniu środków na badania, co miało miejsce w przypadku pracy opublikowanej w *Biology of Reproduction*, która powstała w ramach projektu PRELUDIUM 19. W związku z tym, znaczący wkład Doktorantki w powstanie każdej z prac

nie budzi wątpliwości. Świadczy to o dojrzałości naukowej, dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki oraz umiejętności współpracy w zespole badawczym.

We **Wstępie** części opisowej rozprawy Doktorantka wyczerpująco przedstawiła dotychczasowy stan wiedzy w zakresie omawianego zagadnienia. Szczegółowo opisała budowę i funkcję ciała żółtego, scharakteryzowała budowę wisfatyny i feniksyny-14, ich potencjalne receptory oraz rolę tych hormonów w regulacji wybranych procesów biologicznych, w tym procesów rozrodczych samicy. Ponadto, przedstawiła rolę adipokin i neuropeptydów jako potencjalnych modulatorów funkcji ciała żółtego. Autorka zwróciła uwagę na brak danych dotyczących roli wisfatyny i feniksyny-14 w ciałku żółtym świni oraz nieliczne dane dotyczące możliwego udziału tych hormonów w regulacji procesów angiogenezy i apoptozy komórek. Rozdział ten jest napisany dojrzałe i doskonale prowadzi do postawionej hipotezy badawczej oraz wyjaśnia cele szczegółowe realizowanych badań, co świadczy o pełnym zrozumieniu tematu przez Doktorantkę. **Hipoteza naukowa** oraz **cele** szczegółowe pracy zostały poprawnie sformułowane. Wyróżniono siedem zadań badawczych, które następnie konsekwentnie realizowano. Doświadczenia zostały starannie zaplanowane i wykonane, a metodyka badań została dokładnie opisana w rozdziale **Materiał i Metody**. Opis przeprowadzonych doświadczeń oraz zastosowanych technik badawczych został przygotowany z należytą starannością, dodatkowo został wzbogacony licznymi samodzielnie przygotowanymi rycinami i schematami, które ułatwiają śledzenie dużej ilości przeprowadzonych eksperymentów. Należy podkreślić różnorodność wykonanych analiz, co świadczy o opanowaniu przez Doktorantkę nowoczesnego i żmudnego warsztatu badawczego. Stosowane metody to m.in.: hodowla in vitro komórek lutealnych, wyciszenie genu receptora GPR173 z zastosowaniem siRNA, analiza ekspresji genów metodą real-time PCR, analiza ekspresji białek metodą Western-blot, barwienia immunohistochemiczne i immunofluorescencyjne, analizy kolorymetryczne, immunoenzymatyczne i radioimmunologiczne do oznaczenia koncentracji hormonów, prostaglandyn, czynników angiogennych, analizy aktywności kaspaz 3 i 7, fragmentacji DNA w komórkach oraz analizy statystyczne. Całość wykonanych analiz świadczy o kompetencji metodologicznej Doktorantki oraz Jej przygotowaniu do planowania i wykonywania następnych prac eksperymentalnych. W kolejnym rozdziale Autorka przedstawiła uzyskane w ramach pracy doktorskiej **Wyniki**, łącznie z ich pełną dokumentacją w postaci tabel, wykresów, zdjęć oraz materiałów dodatkowych. Rozdział ten podzielono na podrozdziały, z których każdy dotyczył osobnego zadania badawczego, co ułatwiło analizę i interpretację uzyskanych danych. W rozdziale **Dyskusja** Doktorantka wykazała się dojrzałością naukową oraz zdolnością do kompleksowej interpretacji uzyskanych przez siebie wyników na tle cytowanego piśmiennictwa. Dobór piśmiennictwa zamieszczonego w końcowym rozdziale Autoreferatu jest odpowiedni, powiązany z problematyką pracy i wskazuje na bardzo dobrą znajomość problematyki związanej z tematem dysertacji. W kolejnym rozdziale **Podsumowanie i wnioski** Doktorantka przedstawiła najważniejsze efekty przeprowadzonych badań oraz jeden wniosek,

który w jednoznaczny sposób wskazuje, że wisfatyna i feniksyne 14 wspierają rozwój i funkcje CL świni poprzez aktywację wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych regulujących proces steroidogenezy, sekrecji PG, angiogenezy i apoptozy komórek lutealnych ciała żółtego. Opracowanie kończy rozdział, w którym Autorka przedstawia **ograniczenia** swoich badań **oraz perspektywy badań** nad pogłębieniem roli badanych hormonów metabolicznych w regulacji procesów rozrodu u zwierząt gospodarskich.

Chciałabym podkreślić, że opracowanie tekstowe zostało przygotowane czytelnie, z niezwykłą dbałością o szczegóły, bardzo starannie i estetycznie pod względem językowym i edytorskim. Duża ilość schematów graficznych zarówno w części metodycznej, jaki i w podsumowaniu ułatwia interpretację uzyskanych rezultatów. Świadczy to o ogromnej pracy jaką Doktorantka wykonała w czasie przygotowania tego opracowania. Nieliczne błędy edytorskie i stylistyczne (np. „dostępne w handlu” – str. 12, „brokery INSR” str. 12, „angiopoietin” str. 15), na które jako recenzentka mam obowiązek zwrócić uwagę, nie wpływają na moją wysoką ocenę dysertacji. Jednakże brak cytowań poszczególnych publikacji przy opisie wyników i dyskusji utrudnia analizę i ocenę, które dane zostały opublikowane, a które wysłane do redakcji. Ponadto, inna niż w publikacjach prezentacja danych - graficzna vs tabelaryczna również utrudnia identyfikację poszczególnych prac.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej mgr Ewy Młyczyńskiej zostały już pozytywnie ocenione przez kompetentnych recenzentów oraz redaktorów czasopism, w których zostały opublikowane, dlatego oceniam je w aspekcie poznawczym i jako wkład w rozwój dyscypliny naukowej. Przedstawione publikacje są spójne tematycznie i stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego dotyczącego wyjaśnienia obecności, roli i mechanizmu działania wisfatyny i feniksyne -14 w ciałku żółtym świni domowej. Publikacje te napisane są w przemyślany sposób, z jasno sformułowanymi celami, szczegółową metodyką i prawidłowo przedstawioną dyskusją. Dokumentacja uzyskanych wyników w postaci tabel, wykresów i zdjęć oraz materiałów dodatkowych jest klarowna. Wyniki przedstawione w publikacjach są oryginalne i mają charakter nowatorski, a informacje w nich zawarte wzbogacają wiedzę z zakresu endokrynnego oddziaływania hormonów tkanki tłuszczowej oraz neuropeptydów na funkcjonowanie układu rozrodczego samicy. Ich wartość poznawcza jest wysoka, o czym świadczy fakt ich opublikowania w bardzo dobrych czasopismach naukowych.

Wartość merytoryczną i metodyczną recenzowanej rozprawy doktorskiej, jej założenia oraz szeroki zakres otrzymanych wyników oceniam bardzo pozytywnie, jednak mam kilka pytań/ uwag, o których wyjaśnienie proszę Doktorantkę podczas publicznej obrony:

1. Na jakiej podstawie wybrano dawki wisfatyny oraz feniksyne-14 do doświadczeń in vitro? Czy sprawdzano wpływ zastosowanych dawek czynników na żywotność komórek lutealnych?

2. W rozdziale Materiał i Metody zabrakło wg mnie wyjaśnienia w jaki sposób przeprowadzono proces optymalizacji transfekcji komórek lutealnych? Czy sprawdzano różne czasy transfekcji w celu uzyskania optymalnego poziomu wyciszenia?
3. Jakie doświadczenia funkcjonalne zaplanowałyby Pani w celu jednoznacznego potwierdzenia, iż badane hormony są zaangażowane w procesy angiogenezy w CL?
4. Jaki problem badawczy, który wyłonił się trakcie realizacji badań, uważa Pani za najbardziej interesujący i wymagający dalszych analiz?

Przedstawione uwagi mają charakter dyskusyjny i nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej ocenianej dysertacji.

Za najważniejsze osiągnięcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Ewy Młyczyńskiej uznaję: (1) określenie ekspresji i lokalizacji wisfatyny i feniksyny-14 w CL świni domowej; (2) wykazanie, że ekspresja transkryptu i białka badanych hormonów zależy od fazy cyklu rujowego i/lub okresu wczesnej ciąży; (3) określenie udziału wisfatyny i feniksyny-14 w regulacji steroidogenezy, produkcji i wydzielaniu prostaglandyn, angiogenezy i apoptozy w CL; (4) określenie ścieżek sygnałowych zaangażowanych w działanie wisfatyny i feniksyny-14 w ciałku żółtym; (5) udowodnienie luteotropowego działania wisfatyny i feniksyny-14 na komórki lutealne CL świni domowej.


**Podsumowując**, rozprawę doktorską Pani mgr Ewy Młyczyńskiej oceniam bardzo wysoko. Stanowi ona oryginalne, interesujące i kompleksowe opracowanie dostarczające nowych informacji na temat roli wisfatyny i feniksyny-14 w regulacji funkcji ciała żółtego świni domowej. Tematyka podjęta przez Autorkę jest aktualna i nowatorska, a uzyskane wyniki wzbogacają w znaczący sposób dotychczasową wiedzę z zakresu biologii rozrodu. Uzyskane wyniki badań stanowią nie tylko wartość poznawczą, ale są również podstawą do planowania i prowadzenia kolejnych interesujących eksperymentów. Należy podkreślić, że przeprowadzone badania wymagały od Doktorantki dużego zaangażowania i opanowania czasochłonnych technik badawczych, znajomości aktualnej literatury, opracowania i prezentacji wyników, poprawnego wnioskowania i przygotowywania publikacji do druku co predysponuje Ją do dalszej pracy naukowej.

#### WNIOSEK KOŃCOWY

Z pełnym przekonaniem uznaję, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Ewy Młyczyńskiej zatytułowana: ” **Expression and role of visfatin and phoenixin-14 in porcine corpus luteum function**” spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023.742 ze zm.) stawiane kandydatom ubiegającym się o uzyskanie stopnia naukowego doktora. Dlatego też, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki

biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Ewy Młyczyńskiej do dalszych etapów postępowania o nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną dysertacji, nowatorstwo i oryginalność uzyskanych wyników, co znajduje odzwierciedlenie w opublikowaniu ich w czasopismach o światowym zasięgu, przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wniosek o wyróżnienie recenzowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

A handwritten signature in black ink that reads 'Magdalena Kowalik'.

dr hab. Magdalena Kowalik