

Olsztyn, 15 września 2025 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauliny Małgorzaty Lipińskiej-Kranc zatytułowanej
„Metabolizm energetyczny w oocytach i zarodkach przedimplantacyjnych bydła”

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Pauliny Małgorzaty Lipińskiej-Kranc obejmuje badania nad metabolizmem energetycznym oocytów i zarodków bydłowych, ze szczególnym uwzględnieniem roli, jaką pełnią pęcherzyki zewnątrzkomórkowe płynu pęcherzykowego (tzw. follikulosomy) oraz lipidy komórkowe. Badania ukierunkowane na poznanie mechanizmów warunkujących prawidłowy rozwój zarodków mają ogromne znaczenie w kontekście stale rozwijających się i wymagających optymalizacji metod wspomaganego rozrodu u ssaków, zwłaszcza wobec obserwowanego w ostatnich dekadach spadku sukcesu rozrodczego u wielu gatunków.

Ze względu na dynamiczne zmiany zachodzące podczas dojrzewania oocytu, a następnie - po zapłodnieniu - w trakcie pierwszych podziałów komórkowych zarodka, kluczową rolę odgrywają mechanizmy kontrolujące prawidłowy metabolizm komórkowy. Jest to szczególnie istotne do momentu powstania w pełni funkcjonującego łożyska, które przejmuje rolę odżywiania histotrofowego. Złożoność tych procesów od lat stanowi przedmiot intensywnych badań, mających na celu lepsze zrozumienie regulacji metabolicznych i molekularnych, w tym roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jako mediatorów komunikacji międzykomórkowej.

W swoich badaniach Pani mgr inż. Lipińska-Kranc skoncentrowała się na dwóch kluczowych etapach warunkujących prawidłowy rozwoju ssaków: dojrzewaniu oocytów oraz wczesnych etapach embriogenezy (przed implantacją), posługując się modelem zwierzęcia gospodarskiego – krową (*Bos taurus*). Model ten w ostatnich latach zyskuje szczególne znaczenie zarówno w kontekście badań podstawowych nad rozrodem, jak i zastosowań translacyjnych. Ze względu na liczne podobieństwa fizjologiczne do człowieka uważa się, że model bydła może stanowić wartościowe odniesienie także w badaniach nad wspomaganym rozrodem człowieka.

Koncentrując się na metabolizmie energetycznym oocytów i zarodków bydłowych na wczesnych etapach rozwoju, Doktorantka podjęła się rozwiązania ważnego problemu poznawczego, jakim jest rola środowiska pęcherzykowego oraz dynamiki metabolizmu lipidów w warunkowaniu jakości gamet i zarodków. W rozprawie scharakteryzowano follikulosomy jako element komunikacji międzykomórkowej w kompleksach oocyt-cumulus, wykazując ich obecność wzdłuż połączeń *trans-zonalnych* oraz korzystny wpływ suplementacji follikulosomami na rozwój blastocyst w warunkach *in vitro*. Szczególnie interesujące okazały się wyniki badań w modelu farmakologicznie zahamowanego metabolizmu energetycznego, które wskazały, że suplementacja follikulosomami może częściowo kompensować negatywne skutki ograniczonej dostępności energii, wspierając dojrzewanie oocytów oraz poprawiając parametry rozwojowe zarodków, w tym ich zdolność do wylęgania z osłonki przejrzystej. Szczegółowo opisano również zmiany parametrów kropli lipidowych podczas rozwoju przedimplantacyjnego u bydła, wskazując na ich dynamiczną regulację w krytycznych momentach, takich jak aktywacja genomu zarodkowego. Zaobserwowano również różnice związane z obecnością genomu ojcowskiego (zapłodnienie *in vitro* vs. partenogeneza) oraz cechy gatunkowo-specyficzne (krowa vs. świnia).

INFORMACJE O KANDYDATCE

Pani mgr inż. Paulina Małgorzata Lipińska-Kranc jest absolwentką Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, gdzie 2 lipca 2020 r. uzyskała tytuł magistra na podstawie pracy wykonanej w Katedrze Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach. Pracę doktorską wykonała

pod kierunkiem dr hab. Eweliny Warzych-Plejer, prof. UPP, w Pracowni Biotechnologii Rozrodu tejże Katedry. Doktorantka nie ubiegała się wcześniej o nadanie stopnia doktora. Od lutego 2023 r. jest zatrudniona na stanowisku młodszego embriologa w Centrum Ginekologii, Położnictwa i Leczenia Niepłodności „Klinika Pastelova”.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA PRACY

Praca doktorska została napisana w języku polskim i ma formę rozprawy opartej na dwóch wieloautorskich publikacjach opublikowanych w języku angielskim. Jedna z nich ukazała się w czasopiśmie *Biology of Reproduction* (2025), a druga w *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (2023). W obu artykułach Pani mgr inż. Paulina Małgorzata Lipińska-Kranc występuje jako pierwsza autorka.

Część pierwsza rozprawy (97 stron) stanowi obszernie wprowadzenie merytoryczne do zagadnień poruszanych w obu publikacjach i zawiera m.in. informacje o finansowaniu badań i publikacji w otwartym dostępie (np. fundusz statutowy uczelni, Erasmus+, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Towarzystwo Biologii Rozrodu), streszczenia w języku polskim i angielskim, rozbudowany wstęp teoretyczny (18 stron), hipotezę badawczą i cele pracy, materiały i metody (15 stron), omówienie wyników (11 stron), dyskusję (14 stron), podsumowanie z wnioskami oraz bibliografię obejmującą 138 pozycji. Część ta kończy się wymaganymi oświadczeniami Doktorantki oraz Promotor, Pani dr hab. Eweliny Warzych-Plejer, prof. UPP. Wprowadzenie oceniam jako poprawne, choć można by je udoskonalić poprzez mocniejsze skupienie na kluczowych aspektach rozprawy i uniknięcie powtarzania treści, które znajdują się już w publikacjach.

Część druga prezentuje dwie publikacje:

1. **Lipinska, P.**, Smits, K., Van Soom, A., Pavani, K.C., Warzych, E. Follicular-fluid extracellular vesicles support energy metabolism of bovine oocytes, improving blastocyst development and quality. *Biology of Reproduction* 2025, 113(1), 109-126.
2. **Lipinska, P.**, Pawlak, P., Warzych, E. Species and embryo genome origin affect lipid droplets in preimplantation embryos. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2023, 11, 1187832.

Do każdej publikacji dołączono oświadczenia o współautorstwie. Brakuje natomiast odrębnych oświadczeń dotyczących indywidualnego wkładu Doktorantki. Informacje o zakresie jej prac zostały jednak jasno przedstawione w sekcjach *Author Contributions* obu artykułów i potwierdzają jej znaczący udział zarówno w realizacji badań, jak i przygotowaniu manuskryptów. Uzupełnienie tych informacji stanowi również sekcja 4.3., określająca zakres prac wykonanych przez Doktorantkę.

Publikacje te tworzą spójny cykl tematyczny, wnosząc istotny wkład w badania nad statusem energetycznym oocytów i przedimplantacyjnych zarodków bydła. Stanowią one potwierdzenie wartości merytorycznej rozprawy oraz świadczą o znaczeniu przeprowadzonych badań dla lepszego zrozumienia mechanizmów regulacji procesów metabolicznych w gametach i zarodkach ssaków.

OCENA MERYTORYCZNA

Wstęp stanowi spójne uzasadnienie podjętych badań. Doktorantka najpierw omawia rozwój technik wspomaganego rozrodu u zwierząt (sztuczne nasieniowanie, kriokonserwacja, transfer zarodków), ich rosnącą skalę w produkcji bydła oraz istniejącą lukę skuteczności – niższą jakość i wydajność obserwowaną w przypadku zarodków uzyskiwanych w warunkach *in vitro* w porównaniu do *in vivo*. Następnie uzasadnia wybór modelu bydłęcego i przedstawia architekturę pęcherzyka jajnikowego, w tym rolę komórek ziarnistych, wieńca promienistego i płynu pęcherzykowego oraz znaczenie połączeń *trans-zonalnych* i szczelinowych w przekazywaniu sygnałów i metabolitów do oocyty. Dalej wprowadzono dwa główne filary merytoryczne pracy dotyczące follikulosomów oraz metabolizmu energetycznego i lipidów, których znaczenie zestawiono z aktualnym stanem wiedzy. Całość prowadzi do tezy, że pogłębienie wiedzy o roli follikulosomów i metabolizmu lipidów może przełożyć się na skuteczniejsze procedury wspomaganego rozrodu i w konsekwencji na wyższą jakość uzyskiwanych zarodków, co płynnie otwiera część dotyczącą założeń rozprawy.

W części **Hipoteza i cele pracy** Doktorantka sformułowała hipotezę, zgodnie z którą środowisko pęcherzykowe – a szczególnie obecne w nim pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (follikulosomy) – odgrywają kluczową

rolę w regulacji metabolizmu energetycznego oocytów oraz powstałych z nich zarodków. Założono ponadto, że metabolizm lipidowy w zarodkach ulega dynamicznym zmianom podczas rozwoju przedimplantacyjnego, co odzwierciedla zmienne zapotrzebowanie na różne źródła energii na kolejnych etapach embriogenezy. Cele badawcze zostały sformułowane jasno, a ich zakres należy ocenić pozytywnie – obejmują one zarówno badania o charakterze mechanistycznym (rola follikulosomów w kompleksie oocyt–cumulus), jak i porównawczo-opisowym (profilowanie parametrów lipidów w zależności od etapu rozwoju, gatunku czy obecności gamety męskiej). Taki układ pozwala na spójną weryfikację hipotezy oraz buduje szeroką perspektywę poznawczą, istotną dla zrozumienia czynników determinujących jakość oocytów i zarodków.

Sekcja **Materiały i metody** w rozprawie budzi pewne zastrzeżenia dotyczące spójności i kompletności. Z jednej strony szczegółowo opisano liczne procedury laboratoryjne, co w dużej mierze wynika z przeniesienia metodologii z publikacji źródłowych. Z drugiej strony, w samej rozprawie nadal widoczne są niespójności i braki, które zostaną wskazane w kolejnej części recenzji.

W krótkim rozdziale podsumowującym **Wyniki** Doktorantka przedstawiła najważniejsze osiągnięcia opisane w dwóch publikacjach, z których każda wnosi istotny wkład w zrozumienie mechanizmów regulacji kompetencji rozwojowej oocytów i zarodków. Oba artykuły zostały poddane recenzji i zaakceptowane w uznanych czasopismach międzynarodowych, co potwierdza ich wartość merytoryczną.

W pierwszej pracy (*Biology of Reproduction*, 2025) Doktorantka scharakteryzowała follikulosomy jako istotny element komunikacji w kompleksach oocyt–cumulus, wykorzystując analizę Nanoparticle Tracking Analysis, Western blot oraz obrazowanie w transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Wykazała ich obecność wzdłuż połączeń *trans-zonalnych*, a także w komórkach pęcherzykowych, osłonce przejrzystej, przestrzeni okołoołtkowej i w oocycie. W warunkach ograniczonego metabolizmu (inhibitory glikolizy/szlaku pentozofosforanowego [IODH+] lub β -oksydacji kwasów tłuszczowych [ETO+]) odsetek komórek pęcherzykowych „EV-pozytywnych” był istotnie wyższy niż w kontroli. Suplementacja pożywek stosowanych w dojrzewaniu oocytów follikulosomami nie zmieniała poziomu dojrzewania jądrowego (MII) w kontroli, natomiast istotnie podnosiła MII w obu układach z inhibitorami; poprawiała też wskaźniki rozwojowe zarodków: wzrost odsetka blastocyst odnotowano przy zahamowaniu glikolizy/szlaku pentozofosforanowego (IODH+), a odsetek wylęgłych blastocyst był wyższy we wszystkich grupach suplementowanych follikulosomami. Równolegle wykazano modyfikacje parametrów kropli lipidowych oraz zmianę ekspresji genów związanych z metabolizmem (m.in. *GLUT1*) zarówno w oocytach, jak i w komórkach pęcherzykowych, zależnie od warunków hodowli. Lipidomika blastocyst pochodzących z oocytów dojrzewających w zadanych warunkach eksperymentalnych potwierdziła spadek wielu acylokarnityn po suplementacji follikulosomami przy hamowaniu glikolizy/szlaku pentozofosforanowego (IODH+) oraz wzbogacenie szlaków biosyntezy fosfolipidów i metabolizmu kwasu arachidonowego przy hamowaniu β -oksydacji (ETO+).

Druga publikacja (*Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2023) prezentuje dynamikę profilu lipidowego podczas rozwoju zarodków. Analiza kropli lipidowych wykazała istotne zmiany parametrów kropli lipidowych między kolejnymi etapami rozwojowymi, przy czym minimalne wartości (zawartość lipidów oraz powierzchnia zajmowana przez krople lipidowe) obserwowano w stadium 8–16 komórek, odpowiadającym głównemu oknu aktywacji genomu zarodkowego u bydła. Porównania zarodków bydłych uzyskanych w zapłodnieniu *in vitro* i partenogenetycznych wskazały na istotną rolę genomu ojcowskiego w kształtowaniu profilu lipidowego. Z kolei analizy międzygatunkowe (krowa vs. świnia) ujawniły różnice charakterystyczne dla danego gatunku: u świń krople lipidowe były większe i – przy porównywalnych etapach – mniej liczne niż u krowy (w zygotach oraz zarodkach 2- i 8–16-komórkowych), natomiast w blastocystach świń odnotowano wyższe wartości badanych parametrów. Dodatkowo wykazano, że ponad połowa lipidów blastocysty lokalizuje się w komórkach węzła zarodkowego u krowy, a około 40% w partenogenetycznych zarodkach świńskich.

W sekcji Wyniki zaprezentowano również dane niepublikowane. Analiza liczby komórek oraz zawartości lipidów przypadającej na pojedynczy blastomer wykazała, że najmniejszą liczbą komórek charakteryzowały się blastocysty partenogenetyczne świni, którym towarzyszyła jednocześnie najwyższa zawartość lipidów w przeliczeniu na jedną komórkę. W zarodkach bydłych uzyskanych w wyniku zapłodnienia *in vitro* lub partenogenezy różnice w zawartości lipidów na komórkę były najbardziej wyraźne w stadium ekspandującej

blastocysty, szczególnie w przypadku zarodków partenogenetycznych. Z kolei porównanie międzygatunkowe (krowa vs. świnia) zarodków partenogenetycznych ujawniło, że u bydła wyższa zawartość lipidów utrzymuje się w stadium moruli, natomiast u świni wyższe wartości obserwowano w badanych stadiach blastocysty (zarówno wczesnej, jak i ekspandującej).

Prezentowane wyniki ukazują znaczenie follikulosomów w warunkowaniu kompetencji rozwojowej oocytów oraz rolę lipidów jako dynamicznie regulowanego źródła energii i potencjalnego markera jakości zarodków. Stanowią one spójny i wartościowy wkład do poznania mechanizmów metabolicznych leżących u podstaw wczesnego rozwoju ssaków, podkreślając zarówno praktyczne implikacje dla doskonalenia technik wspomaganego rozrodu, jak i fundamentalne aspekty biologii gamet oraz zarodków.

Dyskusja jest obszerna, dobrze udokumentowana literaturą i konsekwentnie odnosi wyniki badań do wcześniejszych doniesień. Doktorantka trafnie akcentuje znaczenie swoich obserwacji w kontekście jakości gamet i zarodków oraz potencjalnych zastosowań w biotechnologii rozrodu. Jednocześnie można zauważyć, że momentami dyskusja jest rozbudowana nadmiernie kosztem syntetycznych podsumowań, a niektóre fragmenty mogłyby zostać wyraźniej ukierunkowane na praktyczne implikacje uzyskanych wyników. Zabrakło także bardziej zdecydowanego wskazania ograniczeń pracy oraz wyraźnie zarysowanych kierunków dalszych badań, co wzmocniłoby krytyczny wymiar tej części rozprawy.

Podsumowanie i wnioski pracy są klarowne i logicznie powiązane z przedstawionymi wynikami. Doktorantka właściwie wskazuje, że follikulosomy mogą pełnić istotną rolę w regulacji metabolizmu energetycznego oocytów, a profil lipidowy zarodków ulega dynamicznym zmianom zależnym od etapu rozwoju, obecności genomu ojcowskiego i różnic gatunkowych. Wnioski wiernie odzwierciedlają uzyskane rezultaty – w większości są trafne i wynikają bezpośrednio z przeprowadzonych analiz. W kilku przypadkach mają one charakter uogólnienia, dlatego odniosę się do nich w kolejnej sekcji. Całość tej sekcji rozprawy spójnie nawiązuje do hipotezy i celów badawczych, a także podkreśla znaczenie uzyskanych obserwacji dla zrozumienia mechanizmów warunkujących jakość gamet i zarodków.

UWAGI I PYTANIA

Po przestudiowaniu całości dysertacji pragnę podkreślić, że zawarte poniżej krytyczne uwagi w żadnym stopniu nie obniżają wysokiej wartości przedstawionej pracy. Rozprawę czytałam z dużym zainteresowaniem i przyjemnością. Mam świadomość, że w tak obszernym i wieloaspektowym opracowaniu trudno całkowicie uniknąć pewnych nieścisłości. Poniżej wskazuję te najistotniejsze.

1. Wstęp – dużą wagę poświęcono w nim zapoznaniu czytelnika z zagadnieniami niezbędnymi do zrozumienia podjętych badań. Należy docenić szeroki zakres przedstawionych treści, jednak obszerność tego materiału spowodowała, że pojawiły się miejscami uproszczenia i uogólnienia, które prowadzą do nieścisłości lub błędów merytorycznych:

- Pęcherzyki jajnikowe (strona 13) – to sformułowanie wymaga doprecyzowania: „w jajnikach samic dojrziałych płciowo można zaobserwować pęcherzyki we wszystkich fazach rozwoju”. Nie jest ono prawdziwe dla każdego gatunku. U niektórych gatunków, ze względu na falowy charakter wzrostu pęcherzyków, w danym momencie może brakować pęcherzyków przedowulacyjnych, znów u gatunków rozmnażających się sezonowo poza okresem rozrodczym obserwuje się jedynie wczesne pęcherzyki.
- Nomenklatura pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (strona 17) – określenie „trzy główne źródła” (apoptotyczne, ektosomy, egzosomy) odnosi się do mechanizmów biogenezy, a nie do źródeł. Obecnie, zgodnie z wytycznymi MISEV2023, zaleca się stosowanie operacyjnych kategorii „small EVs” (<200 nm) i „large EVs” (>200 nm). A termin „egzosomy” powinno stosować się jedynie po potwierdzeniu endosomalnego pochodzenia. Podobnie, tetraspaniny i inne białka (np. CD63, CD9, ALIX, TSG101) nie są markerami specyficznymi dla egzosomów, lecz markerami wzbogaconymi w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych.
- Funkcje pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (strona 17) – zdanie sugerujące, że w procesie przekazywania ładunku molekularnego pęcherzyków internalizacja i interakcja białek powierzchniowych to oddzielne

mechanizmy, jest nieprecyzyjne. Istnieje wiele doniesień, wskazujących, że interakcja białek powierzchniowych często inicjuje internalizację pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.

- Losy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w komórkach docelowych (strona 17) – stwierdzenie, że „prawdopodobnie najczęstszym losem” pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w komórce docelowej jest ich degradacja w lizosomach, jest uproszczeniem. Prawdą jest, że interakcja pęcherzyk-komórka może przebiegać z udziałem różnych ścieżek: szlaku endo-lizosomalnego, fuzji z błoną plazmatyczną (i bezpośredniego dostarczenia ładunku), a nawet transkomórkowej autofagii. Ich los zależy zarówno od składu molekularnego, jak i rodzaju oraz stanu/stadium rozwojowego komórki docelowej.
- Metabolizm glukozy (strona 19) – stwierdzenie, że metabolizm glukozy pokrywa „około 50–70% całkowitego zapotrzebowania energetycznego organizmu”, wymaga doprecyzowania. Zdanie to jest prawdziwe tylko dla niektórych tkanek (np. mózg, erytrocyty), natomiast zwłaszcza w spoczynku duża część energii pochodzi z utleniania kwasów tłuszczowych.
- Opis glikolizy (strona 20) – sformułowanie „prowadząc do powstania dwóch cząsteczek ATP” może być mylące. W glikolizie netto powstają 2 ATP (na 1 cząsteczkę glukozy), ale brutto 4 ATP, ponieważ 2 są zużywane na etapie inwestycji energetycznej.
- Szlaki metaboliczne (strona 20) – stwierdzenie, że wszystkie wymienione w paragrafie szlaki dostarczają NADPH, jest nieścisłe. NADPH wytwarza głównie szlak pentozofosforanowy, inne szlaki dostarczają prekursorów biosyntezy.
- Metabolizm w pęcherzyku jajnikowym (strony 23-24) – stwierdzenie o przekazywaniu NADPH do oocyta przez połączenia *trans-zonalne* wymaga wskazania cytowania - potwierdzenia w badaniach mechanizmu transportu NADPH do oocyta połączeniami *trans-zonalnymi*. Warto zaznaczyć, że w piśmiennictwie naukowym funkcjonuje również pogląd, że komórki otaczające dostarczają substraty (pirogonian, mleczan, aminokwasy), z których oocyt sam generuje NADPH i energię.

2. **Materiały i metody** – Sekcja ta, mimo że obszerna i szczegółowa, charakteryzuje się pewnymi niespójnościami i brakami, które ograniczają pełną przejrzystość metodologiczną. Dotyczą one zwłaszcza różnego poziomu szczegółowości między eksperymentami (np. podanie ras zwierząt w jednym doświadczeniu i brak tych danych w drugim), a także braku opisu sposobu doboru genów referencyjnych w analizach transkryptomicznych, kontroli eksperymentów (np. kontaminacja DNA genomowym), czy uzasadnienia stosowanych dawek i potencjalnego wpływu rozpuszczalników (np. DMSO). Ponadto, procedury analizy obrazowej kropli lipidowych, choć opisane, nie zawierają wystarczających informacji o sposobach minimalizowania błędów pomiarowych czy stopniu automatyzacji analiz ani jednoznacznego wskazania, czy ustawienia mikroskopii konfokalnej były utrzymywane na stałym poziomie między grupami. Należy jednak podkreślić, że publikacja w *Biology of Reproduction* uzupełnia część braków (m.in. szczegółowy opis lipidomiki blastocyst, charakterystykę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, wskazanie ras bydła), jednak wciąż pozostają kwestie niewyjaśnione, takie jak pełna liczebność dawczyń jajników oraz ich status metaboliczny czy kontrola cytotoksyczności inhibitorów. Te elementy mogłyby wzmocnić przejrzystość metodologiczną pracy i zwiększyć jej wartość porównawczą. Uwagi te nie podważają wartości uzyskanych danych, ale wskazują na potrzebę większej standaryzacji opisu metodologii.

3. Wnioski

- Wniosek 1, dotyczący transportu follikulosomów przez połączenia *trans-zonalne*, opiera się na obserwacjach mikroskopowych, które sugerują taką możliwość, lecz nie dowodzą tej drogi transportu. Brakuje doświadczeń funkcjonalnych, które pozwoliłyby jednoznacznie potwierdzić, że połączenia *trans-zonalne* są rzeczywistą i wyłączną drogą dla follikulosomów. Sformułowanie to należy więc traktować raczej jako hipotezę niż wniosek.
- Wniosek 2, mówiący o kompensacyjnej roli follikulosomów w warunkach „stresu metabolicznego”, znajduje poparcie w danych wskazujących na poprawę wskaźników dojrzewania i rozwoju po suplementacji. Wymaga jednak doprecyzowania: w badaniach zastosowano farmakologiczne inhibitory szlaków metabolicznych, a nie rzeczywisty „stres metaboliczny” w sensie biologicznym. Co więcej,

obserwowane zmiany w parametrach kropli lipidowych i ekspresji genów mogą być wtórne wobec globalnej poprawy homeostazy metabolicznej, a nie wynikać bezpośrednio z ukierunkowanego działania follikulosomów. Należy też zaznaczyć, że nie przeprowadzono analizy ładunku molekularnego follikulosomów, co ogranicza możliwość interpretacji obserwowanych efektów suplementacji w oocytach i zarodkach.

W przypadku prac o wysokim stopniu złożoności naukowej, lektura nieuchronnie rodzi pytania i refleksje, które mogą stanowić wartościowy wkład w dalsze pogłębienie analiz i dyskusji nad poruszonymi zagadnieniami:

- 1) Jak odróżniłaby Pani obecność follikulosomów w przestrzeniach *trans-zonalnych* od ich rzeczywistego, kierunkowego transportu do oocytu? Jaki pojedynczy eksperyment byłby tu najbardziej rozstrzygający?
- 2) Co, Pani zdaniem, utrudnia interpretację wyników dotyczących acylokarnityn w blastocystach i jak można to metodycznie rozwiązać?
- 3) Jaką metodę izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wybrałaby Pani do zastosowań w dojrzewaniu oocytów *in vitro*, biorąc pod uwagę kompromis między uzyskiem a czystością? Jakie markery jakości należałoby wprowadzić do rutyny laboratoryjnej?
- 4) Jak można przetestować hipotezę o udziale szlaku kwasu arachidonowego i eikozanoidów w poprawie wylęgania blastocyst po suplementacji follikulosomami?
- 5) Jak Pani interpretuje obserwowane różnice międzygatunkowe w profilach lipidowych zarodków (bydło vs. świnia)? Czy uważa Pani, że wynikają one głównie z odmiennych strategii metabolicznych tych gatunków, różnic w składzie oocytów i środowiska pęcherzykowego, czy też z innych, specyficznych czynników biologicznych?

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca doktorska Pani mgr inż. Pauliny Małgorzaty Lipińskiej-Kranc pt.: „Metabolizm energetyczny w oocytach i zarodkach przedimplantacyjnych bydła” stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego i świadczy o szerokiej wiedzy teoretycznej Kandydatki oraz jej umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Na podstawie przedstawionej analizy stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz.U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny *Nauki Biologiczne* Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Autorki rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz nadanie jej stopnia naukowego doktora.

