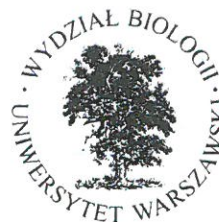




UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

Wydział Biologii

Instytut Biologii Rozwoju i Nauk Biomedycznych, Zakład Embriologii
dr hab. Anna Ajduk, prof. ucz.



Warszawa, 29 sierpnia 2025 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauliny Lipińskiej-Kranc

pt. "Metabolizm energetyczny w oocytach i zarodkach przedimplantacyjnych bydła"

Mgr inż. Paulina Lipińska-Kranc uzyskała tytuł magistra 02.07.2020 r. w Katedrze Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Od lutego 2023 r. pracuje w Centrum Ginekologii, Położnictwa i Leczenia Niepłodności Klinika Pastelova na stanowisku młodszego embriologa. Wcześniej nie ubiegała się o stopień doktora.

Praca doktorska mgr inż. Pauliny Lipińskiej-Kranc została wykonana z wykorzystaniem zarodków krowy i świni, które są coraz częściej stosowanym modelem w biologii rozwoju ssaków. W jej skład wchodzi dwie publikacje dotyczące dwóch różnych, ale ściśle powiązanych ze sobą zagadnień:

- 1) roli follikulosomów w dojrzewaniu oocytów krowy, w warunkach kontrolnych oraz stresu metabolicznego, oraz rozwoju powstających z nich zarodków, ze szczególnym uwzględnieniem ich zawartości lipidowej (wyniki opisane w artykule Lipińska i wsp., 2025 opublikowanym w czasopiśmie *Biology of Reproduction* - doi: 10.1093/biolre/iaaf096),
- 2) charakterystyki kropli lipidowych występujących w zarodkach krowy i świni powstałych w wyniku zapłodnienia *in vitro* bądź partenogenezy (wyniki opisane w artykule Lipińska i wsp., 2023 opublikowanym w czasopiśmie *Frontiers in Cell and Developmental Biology* – doi: 10.3389/fcell.2023.1187832).

Ocena formalna pracy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska opiera się na dwóch wymienionych powyżej publikacjach napisanych w języku angielskim. Ponadto zawiera bardzo obszerne opracowanie opublikowanych

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 212, faks: 22 55 41 210
e-mail: a.ajduk@uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

wyników w języku polskim, składające się z następujących części: Wstęp, Hipoteza i cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie dyskusji i wnioski. Dodatkowo, w jej skład wchodzi: spis skrótów, streszczenie polskie i angielskie, bibliografia, spis rycin i tabel oraz oświadczenia doktorantki, jej promotorki i współautorów prac dotyczące ich udziału w powstaniu materiału wykorzystanego w rozprawie. Muszę przyznać, że ta „hybrydowa” konstrukcja pracy wywołała u mnie pewną konfuzję – początkowo nie było dla mnie jasne, czy mam do czynienia z tradycyjną rozprawą doktorską, do której publikacje są dołączone jedynie jako rodzaj załączników, czy też z rozprawą, której podstawą są właśnie publikacje. Jednak biorąc pod uwagę skrótowy opis Materiałów i metod oraz Wyników zawarty w polskojęzycznym opracowaniu oraz liczne odwołania do rycin w publikacjach, doszłam do wniosku, że jest to jednak rozprawa oparta na publikacjach Doktorantki. O ile doceniam Wstęp i Dyskusję w języku polskim, które w sposób obszerniejszy niż w artykułach przedstawiają kontekst naukowy prezentowanych badań, oraz rozdział poświęcony hipotezom i celom badawczym, pokazujący tok myślenia Doktorantki, to 25-stronnicowe streszczenie metodyki i wyników, uważam za zbędne i utrudniające pracę recenzentowi. Rozumiem, że praca doktorska ma m.in. pokazać, że Doktorantka potrafi opisać w prawidłowy sposób swoje badania, ale jeśli pełniła ona znaczącą rolę w pisaniu publikacji (a zakładam, że tak było w przypadku tej rozprawy), dwukrotne powtarzanie tych samych treści nie jest konieczne. Jeśli zaś są wątpliwości co do roli Doktorantki w napisaniu artykułów, to rozprawa powinna mieć czysto tradycyjną formę.

Zarówno część polska jak i angielska pracy jest napisana poprawnym, jasnym językiem. Piśmiennictwo jest dobrze dobrane.

Inne uwagi do strony formalnej pracy:

- 1) Tytuł rozprawy jest zbyt ogólny i nie oddaje dobrze opisywanych zagadnień. Metabolizm energetyczny to bardzo szerokie zagadnienie, a Doktorantka skupia się jedynie na jego niewielkim i dość niszowym wycinku związanym z lipidami, pomijając „mainstreamowe” zagadnienia aktywności mitochondriów, produkcji ATP itp. Myślę, że tytuł nawiązujący do gospodarki lipidowej oocytów i zarodków byłby bardziej na miejscu.
- 2) Doktorantka w klarowny sposób wypunktowuje swoją rolę w badaniach opisanych w pracy. Brakuje mi jednak podobnego opisu jej roli w przygotowywaniu manuskryptów zawartych w rozprawie publikacji. Byłabym wdzięczna za dodatkowe informacje na ten temat w czasie obrony.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 212, faks: 22 55 41 210
e-mail: a.ajduk@uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

3) W części polskiej rozprawy zauważyłam kilka sformułowań, które moim zdaniem można by poprawić:

- a. Doktorantka wielokrotnie pisze o *wylęgniętych* blastocystach (odpowiednik ang. *hatched blastocysts*). Wydaje mi się, że częściej spotyka się zgrabniejsze określenie *wyklute* blastocysty.
- b. s. 17 – nie nazwałabym pęcherzyków zewnątrzkomórkowych „częstkami”. To jednak sformułowanie zarezerwowane dla obiektów znacznie mniejszych i prostszych, np. cząstek elementarnych w fizyce. Lepiej byłoby określić pęcherzyki mianem struktur.
- c. s. 18 – zamiast kolokwialnego sformułowania „odporność na stres” lepiej byłoby napisać o odporności na czynnik stresogenny.

Ocena merytoryczna pracy

Podjęta przez mgr inż. Lipińską-Kranc tematyka badawcza jest bardzo ciekawa i aktualna. Po latach fascynacji transkryptomiką i proteomiką, przychodzi teraz czas na lipidomikę. Szczególnie zainteresowały mnie badania dotyczące follikulosomów – bardzo doceniam fakt, że Doktorantce udało się zoptymalizować technikę ich izolacji i oczyszczenia. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki, oprócz wartości czysto poznawczej, mogą też znaleźć zastosowanie w medycynie reprodukcyjnej i weterynarii, przyczyniając się do optymalizacji protokołów hodowli oocytów i zarodków *in vitro*.

1) Ocena rozdziału Wstęp

Oceniając tę część pracy opieram się na polskojęzycznym Wstępie będącym dodatkiem do publikacji. Jest on napisany ciekawie i klarownie i stanowi rozszerzoną wersję wstępów zawartych w artykułach składających się na rozprawę. Przedstawione są w nim w zasadzie wszystkie informacje potrzebne czytelnikowi do zrozumienia dalszych części pracy. Zagadnienia takie jak rozwój pęcherzyków jajnikowych, dojrzewanie oocyta czy komunikacja międzykomórkowa w obrębie pęcherzyka zostały jednak potraktowane trochę zbyt pobieżnie (brakuje mi np. podkreślenia dwukierunkowości komunikacji w obrębie pęcherzyka – to nie tylko komórki pęcherzykowe wydzielają substancje regulujące rozwój oocyta, ale i oocyt wydziela czynniki wpływające na komórki pęcherzykowe). Brakuje mi też bardziej szczegółowej charakterystyki zawartości molekularnej follikulosomów.

Inne drobne uwagi:

- s. 26 – czas pierwszego podziału zarodkowego to nie jest proces determinujący jakość zarodka, a jedynie marker tej jakości, odzwierciedlający efektywność i prawidłowość procesów wewnątrzkomórkowych zachodzących w zygocie.
- s. 28 – sama aktywacja partenogenetyczna nie prowadzi do powstania diploidalnej zygoty. W tym celu trzeba jeszcze zahamować II podział mejotyczny, np. depolimeryzując przejściowo filamenty aktynowe.
- s. 28 – nie jest dla mnie jasne, jakich gatunków dotyczy opis zdolności rozwojowych zarodków partenogenetycznych przedstawiony w ostatnim paragrafie na tej stronie.

2) Ocena rozdziału Hipoteza i cele pracy

W tej części pracy Doktorantka formułuje hipotezy badawcze:

- follikulosomy są kluczowym regulatorem metabolizmu energetycznego oocytów, a następnie powstałych z nich zarodków,
- metabolizm lipidowy w zarodku zmienia się w czasie rozwoju przedimplantacyjnego.

Oprócz hipotez Doktorantka podaje też szczegółowe cele badawcze, które odpowiadają zaplanowanym przez nią doświadczeniom. Zarówno hipotezy, jak i cele szczegółowe pracy, Doktorantka sformułowała w sposób poprawny.

3) Ocena rozdziału Materiały i metody

Oceniając tę część pracy opieram się przede wszystkim na odpowiednich fragmentach artykułów wchodzących w skład publikacji, gdyż to w nich znajduje się pełny opis metodyki (w polskojęzycznym dodatku jest on uproszczony i nie zawiera wszystkich informacji). Materiały i metody zostały w publikacjach opisane bardzo dokładnie, w sposób pozwalający na powtórzenie doświadczeń. Zwraca uwagę szeroka i dobrze dobrana gama technik zastosowanych w badaniach. Doktorantka samodzielnie stosowała większość z nich, wykazując się przede wszystkim ekspertyzą w zakresie technik embriologicznych – izolowała z jajników kompleksy oocyt-komórki pęcherzykowe (COCs) i płyn pęcherzykowy (a z niego follikulosomy), przeprowadzała dojrzewanie oocytów in vitro, zapłodnienie in vitro i aktywację partenogenetyczną, hodowała zarodki i oceniała ich stadia rozwojowe, wykonywała barwienia i wizualizację follikulosomów w COCs oraz kropli lipidowych w COCs i zarodkach, analizowała poziom ekspresji genów techniką real-time qPCR i przeprowadziła analizę statystyczną. Charakterystyka follikulosomów technikami Nanoparticle

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 212, faks: 22 55 41 210
e-mail: a.ajduk@uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

Tracking Analysis, Western Blotting i transmisyjnej mikroskopii elektronowej, znakowanie fluorescencyjne follikulosomów oraz profilowanie lipidowe blastocyst zostało wykonane przez jej współpracowników.

Inne uwagi:

- Doświadczenie, w którym liczono % komórek pęcherzykowych zawierających follikulosomy (Fig. 3, Lipińska i wsp., 2025) – jak Doktorantka wizualizowała granice między komórkami? Na rycinie przedstawiającej wyniki z tego doświadczenia widoczne jest tylko barwienie follikulosomów, a granice między komórkami pęcherzykowymi są niewidoczne, co uniemożliwia policzenie komórek pozytywnych i negatywnych pod względem obecności follikulosomów.
- Czy, a jeśli tak to w jaki sposób, standaryzowane były pomiary intensywności fluorescencji barwnika Bodipy stosowanego do oznaczenia zawartości lipidów w komórkach pęcherzykowych, oocytach i zarodkach pomiędzy poszczególnymi powtórzeniami doświadczenia? Sygnał uzyskiwany w takich barwieniach fluorescencyjnych jest często dość zmienny. Jak wyglądała ta zmienność w doświadczeniach przeprowadzonych przez Doktorantkę, zarówno w pracy Lipińska i wsp., 2025, jak i Lipińska i wsp., 2023?
- W jaki sposób określono stężenie roztworu follikulosomów stosowanych w doświadczeniach w pracy Lipińska i wsp., 2025? Stężenie jest podane w ug/ml, czy znana jest średnia masa jednego follikulosomu?
- W schematach przedstawiających układy eksperymentalne w polskojęzycznym opracowaniu brakuje objaśnień zastosowanych skrótów.

4) Ocena rozdziału Wyniki

Oceniając tę część pracy opieram się przede wszystkim na odpowiednich fragmentach artykułów wchodzących w skład publikacji, gdyż to w nich znajduje się pełny opis wyników (w polskojęzycznym dodatku jest on uproszczony i nie zawiera wszystkich informacji). Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są niewątpliwie oryginalnym i ważnym wkładem w rozwój reprezentowanej przez nią dyscypliny. Dane zostały poprawnie i szczegółowo przedstawione i zanalizowane, co daje im dużą naukową wiarygodność. Szczególnie interesujący jest artykuł Lipińska i wsp., 2025 dotyczący follikulosomów, gdyż oprócz opisu tych struktur i ich lokalizacji w COCs, dostarcza on także informacji dotyczących mechanizmu ich działania na komórki oraz roli w przeciwdziałaniu

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 212, faks: 22 55 41 210
e-mail: a.ajduk@uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

stresowi metabolicznemu. Praca Lipińska i wsp., 2023 ma bardziej opisowy charakter, choć także dostarcza informacji, które mogą być cenne dla badaczy zajmujących się zarodkami zwierząt gospodarskich.

Doktorantka wykazała, że:

praca Lipińska et al., 2025

- follikulosomy są transportowane do oocytów poprzez komórki pęcherzykowe i wypustki transzonalne,
- follikulosomy są intensywniej pobierane przez komórki pęcherzykowe w warunkach stresu energetycznego i mogą wówczas łagodzić jego skutki – wspomagają dojrzewanie meiotyczne oocytów i wzmacniają ich potencjał rozwojowy a także zmieniają profil lipidowy uzyskanych z oocytów blastocyst,
- suplementacja pożywki follikulosomami zmienia charakterystykę kropli lipidowych w COCs i ekspresję genów związanych z metabolizmem energetycznym (zmiany są bardziej widoczne w komórkach pęcherzykowych niż w oocytach)

praca Lipińska et al., 2023

- charakterystyka kropli lipidowych w zarodkach (ich liczba, wielkość, zawartość lipidów itp.) zmienia się w czasie rozwoju przedimplantacyjnego,
- charakterystyka kropli lipidowych zależy od gatunku (krowa vs. świnia), jak i od sposobu aktywacji rozwoju zarodkowego (zapłodnienie vs. partenogeneza),
- ok. połowa lipidów w blastocystcie zlokalizowana jest w obrębie węzła zarodkowego.

Uwagi szczegółowe:

- Fig. 4, praca Lipińska i wsp., 2025 – Doktorantka podaje tu tylko liczbę powtórzeń doświadczenia dla danej grupy eksperymentalnej, ale ile oocytów, a następnie zarodków, było zanalizowanych w każdej grupie?
- Fig. 4, praca Lipińska i wsp. 2025 – Czy Doktorantka przyglądała się bliżej jakości blastocyst w tym doświadczeniu (poza określeniem % wyklutych blastocyst)? Np. czy sprawdzała liczbę komórek (całkowitą, w węźle zarodkowym i trofektodermie), czy choćby ogólną morfologię blastocyst? Czy jest w stanie powiedzieć coś więcej na temat wpływu suplementacji follikulosomami na jakość uzyskanych zarodków?

- Ciekawi mnie, czy wyraźny wpływ follikulosomów na jakość i potencjał rozwojowy oocytów dojrzewanych *in vitro* w warunkach stresu metabolicznego wynika z bezpośredniego oddziaływania zawartości follikulosomów na oocyt, czy też z wpływu follikulosomów na komórki pęcherzykowe, które poprzez polepszoną dzięki follikulosomom kondycję tworzą lepsze środowisko rozwoju dla oocytu, co pośrednio pozytywnie wpływa na jego jakość. Czy Doktorantka ma jakieś przemyślenia na ten temat?
- Czy wiadomo, jak wygląda profil lipidowy w kontrolnej blastocystyce? W pracy Lipińska i wsp., 2025 Doktorantka analizowała jedynie blastocysty, które rozwinęły się z oocytów dojrzewanych w warunkach stresu metabolicznego. Ciekawi mnie, czy suplementacja follikulosomami w czasie dojrzewania oocytów spowodowała, że profil lipidowy uzyskanych następnie blastocyst był bardziej zbliżony do normalnego, kontrolnego profilu?
- Wykresy 7 i 8 w opracowaniu polskojęzycznym, pokazujące nieopublikowane dane na temat liczby komórek w zarodkach oraz średniej zawartości lipidów na blastomer są podpisane na odwrot.

5) Ocena rozdziałów Dyskusja i Podsumowanie

Oceniając tę część pracy, opieram się na rozdziałach wchodzących w skład polskojęzycznego opracowania. Stanowią one rozszerzoną wersję dyskusji zawartej w publikacjach. Rozdziały te są napisane klarownie i poruszają wszystkie wątki pojawiające się w uzyskanych przez Doktorantkę wynikach. Doktorantka odnosi się do aktualnej literatury i zgrabnie tłumaczy oraz umieszcza w szerszym kontekście naukowym poszczególne części swoich rezultatów.

W Dyskusji brakuje mi jednak bardziej ewolucyjnego spojrzenia na kwestię kropli lipidowych w oocytach i zarodkach. Dlaczego jedne gatunki zwierząt (np. świnie) mają ich tak dużo, a inne (np. myszy) bardzo mało? Myślę, że warto by tu przywołać publikację z grupy prof. Grażyny Ptak (Arena et al., 2021; doi: 10.1073/pnas.2018362118) na temat związku między zawartością kropli lipidowych w oocytach a zdolnością zarodków do diapauzy.

Sądzę też, że warto by pogłębić rozważania nad wykorzystaniem wyników uzyskanych przez Doktorantkę w optymalizacji wspomaganych technik rozrodu (zwłaszcza, że Doktorantka pracuje obecnie w klinice leczenia niepłodności). Czy analiza lipidów jest obecnie w jakiegokolwiek formie testowana jako wskaźnik jakości zarodków nie tylko u zwierząt gospodarskich, ale np. u ludzi? W

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 212, faks: 22 55 41 210
e-mail: a.ajduk@uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

jaki sposób można by nieinwazyjnie badać np. liczbę kropli lipidowych w zarodkach (dobry marker jakości to taki, którego pomiar nie uszkadza trwale zarodka)? Czy są jakieś prace dotyczące follikulosomów u człowieka, pokazujące, że mogą one służyć jako marker jakości oocytów czy też polepszać warunki hodowli/dojrzwania oocytów? Jeśli takie prace istnieją, to jakie wartości charakteryzujące krople lipidowe (czy szerzej profil lipidowy oocyta/zarodka) lub follikulosomy odpowiadają zarodkom o wysokiej jakości, a jakie tym o niskiej?

Podsumowanie

Praca doktorska mgr inż. Pauliny Lipińskiej-Kranc dotyczy bardzo ciekawych i aktualnych zagadnień związanych z rolą pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (follikulosomów) w funkcjonowaniu pęcherzyka jajnikowego, a w szczególności w dojrzewaniu oocytów, nabywaniu przez nie potencjału rozwojowego i regulacji ich gospodarki energetycznej, oraz z metabolizmem lipidowym w zarodkach przedimplantacyjnych. Doktorantka wykonała swoje badania na oocytach i zarodkach krowy i świni. Wybór tych gatunków jest uzasadniony zarówno ich znaczeniem w rolnictwie, jak i faktem, że są coraz częściej stosowanym modelem rozwoju zarodkowego człowieka. Nie mam wątpliwości, że praca mgr inż. Lipińskiej-Kranc może się przyczynić do rozwoju technik wspomaganego rozrodu stosowanych u zwierząt i ludzi.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są ważne, nowe i naukowo wiarygodne. Merytoryczna strona pracy jest bardzo dobra. Moje uwagi i komentarze dotyczyły w większości drobnych uchybień czy braków lub wynikały po prostu z mojej ciekawości i chęci „podrażnienia” tematu. Doktorantka pokazała też – czy to przygotowując publikacje, czy też polskie opracowanie – że potrafi prawidłowo przeanalizować, zinterpretować i opisać dane doświadczalne.

Na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że Doktorantka posiada umiejętność samodzielnego planowania, wykonania i opracowania rezultatów swojej pracy naukowej. Jej praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. **Rozprawa doktorska spełnia zatem warunki określone w art. 187 Ustawy dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.).** W związku z powyższym przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu wnioski o dopuszczenie mgr inż. Pauliny Lipińskiej-Kranc do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na zakres przeprowadzonych badań, ich naukową wartość (omówioną we wcześniejszych częściach

recenzji), mnogość wykorzystanych technik i fakt, że wyniki zostały już opublikowane w uznanych zagranicznych czasopismach, a zatem weszły w światowy obieg nauki, **wnoszę o nagrodzenie niniejszej rozprawy stosownym wyróżnieniem.**

Ac Ajduk

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 212, faks: 22 55 41 210
e-mail: a.ajduk@uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

