

Kraków, 11 września 2025 r.

dr hab. Małgorzata Grzesiak, prof. UJ
Zakład Endokrynologii
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii
Uniwersytet Jagielloński



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
mgr inż. Pauliny Lipińskiej-Kranc
pt. "Metabolizm energetyczny w oocytach i zarodkach
przedimplantacyjnych bydła"

Wydział Biologii

Recenzja została wykonana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny *Nauki biologiczne* Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, zgodnie z zasadami przedstawionymi w zawartej umowie.

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Podstawowe dane o Kandydatce

Zakład Endokrynologii

Pani mgr inż. Paulina Lipińska-Kranc uzyskała tytuł magistra w dniu 02.07.2020 r. w Katedrze Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Nie ubiegała się dotychczas o tytuł doktora. Aktualnie jest zatrudniona na stanowisku młodszego embriologa w Centrum Ginekologii, Położnictwa i Leczenia Niepłodności Klinika Pastelova, gdzie pracuje od lutego 2023 r.

Informacje o ocenianej rozprawie doktorskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Pauliny Lipińskiej-Kranc, zatytułowana *"Metabolizm energetyczny w oocytach i zarodkach przedimplantacyjnych bydła"*, została wykonana w Pracowni Biotechnologii Rozrodu Katedry Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem Pani promotora dr hab. Eweliny Warzych-Plejer, prof. UPP. Pracę doktorską przygotowano w oparciu o dwie oryginalne publikacje naukowe o bardzo spójnej tematyce, które ukazały w się w renomowanych, recenzowanych czasopismach z listy *Journal Citation Reports: Biology of Reproduction* (IF_{5-letni} 3.7) oraz *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (IF_{5-letni} 5.2). Czasopisma te znajdują się również w wykazie czasopism naukowych Ministerstwa Edukacji i Nauki z przyznanymi punktami odpowiednio 200 i 100. Publikacje są współautorskie (3-5 autorów) i w obu pracach Doktorantka jest pierwszą autorką. Do każdej publikacji dołączone zostały oświadczenia współautorów, z których wynika, że wkład mgr Pauliny Lipińskiej-Kranc w prowadzenie badań oraz przygotowanie

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel./fax: +48 12 664 50 98

analiz laboratoryjnych, przeprowadzenie analizy statystycznej danych, opracowanie i wizualizację otrzymanych wyników oraz ich interpretację, a także udział w przygotowaniu manuskryptów obu publikacji. Na uwagę zasługuje aktywność Doktorantki w pozyskiwaniu środków na realizację badań (*Zadania badawcze dla Młodych Naukowców 2021 i 2022*) oraz odbycie zagranicznego stażu naukowego w Ghent University (*Erasmus+*), co dowodzi Jej zaangażowaniu w pracę naukową. **Po zapoznaniu się z przedłożonymi materiałami stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim w rozumieniu zapisu art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.**

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Celem pracy była ocena metabolizmu energetycznego w oocytach oraz zarodkach przedimplantacyjnych byłą, ze szczególnym uwzględnieniem roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z płynu pęcherzykowego (tzw. follikulosomów) w regulacji dojrzewania oocytów *in vitro* i rozwoju zarodków byłą w warunkach stresu metabolicznego. Praca podejmuje bardzo ważny aspekt biologii rozrodu, gdyż zapewnienie odpowiedniego środowiska dla dojrzewania oocytów jest kluczowe i możliwe dzięki odtworzeniu prawidłowych interakcji występujących wewnątrz pęcherzyka jajnikowego. Zatem pozytywnie oceniam wybór tematyki pracy doktorskiej, która ma znaczenie zarówno dla doskonalenia metod wspomaganego rozrodu (IVF, IVP), jak i dla hodowli zwierząt gospodarskich, a także potencjalnych aplikacji translacyjnych w medycynie reprodukcyjnej człowieka.

Rozprawa została przygotowana zgodnie z wymogami formalnymi, a jej układ jest przejrzysty i logiczny. Przedstawione do analizy opracowanie polskojęzyczne obejmuje 95 stron, które zawierają kolejno: informacje o opublikowanych oryginalnych pracach stanowiących podstawę doktoratu, informacje o źródłach finansowania badań, wykaz stosowanych skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, hipotezę i cele pracy, opis materiałów i metod, omówienie uzyskanych wyników, dyskusję, podsumowanie i wnioski, bibliografię oraz spis figur i tabel. Do opracowania dołączono oświadczenia autora i promotora rozprawy doktorskiej, materiały dodatkowe do prac, stosowne oświadczenia współautorów oraz kopię publikacji nr 2. Brak kopii publikacji nr 1 został uzupełniony w wersji elektronicznej rozprawy doktorskiej, zatem Recenzent miał do niej swobodny dostęp.

Wstęp, liczący 18 stron, stanowi wprowadzenie do zagadnień poruszanych w rozprawie doktorskiej i opisuje: pęcherzyk jajnikowy jako środowisko wzrostu i dojrzewania oocyta, pęcherzyki zewnątrzkomórkowe oraz podstawowe ścieżki metabolizmu energetycznego, w tym w pęcherzyku jajnikowym i podczas rozwoju zarodkowego. Ta część rozprawy została przygotowana starannie pod względem merytorycznym i edytorskim, została wzbogacona czterema samodzielnie przygotowanymi figurami i prowadzi do

hipotezy badawczej, wyjaśniając cele szczegółowe realizowanych badań. Niektóre fragmenty wstępu są zbyt rozbudowane i mogłyby zostać przedstawione bardziej syntetycznie. Doktorantka mogła się również pokusić o silniejsze zaakcentowanie potencjalnego zastosowania follikulosomów w rutynowych procedurach zapłodnienia *in vitro*. Mam jeszcze drobną uwagę dotyczącą nomenklatury, którą posługuje się Doktorantka; w całym opracowaniu używa ona określenia „komórki pęcherzykowe” w odniesieniu do komórek ziarnistych. Nie jest to do końca precyzyjne sformułowanie, gdyż pęcherzyk jajnikowy budują różne typy komórek i dobrze byłoby używać konkretnej nazwy odnoszącej się do konkretnych komórek.

Następny rozdział obejmuje hipotezę badawczą i cele pracy. Doktorantka podjęła się weryfikacji hipotezy badawczej zakładającej, że follikulosomy mają wpływ na metabolizm energetyczny zarówno oocytów, jak i powstałych po zapłodnieniu zarodków w warunkach ograniczenia dostępu do glukozy i lipidów. Ponadto koncepcja pracy zakłada, że metabolizm lipidowy ulega zmianie na przestrzeni rozwoju przeimplantacyjnego zarodka, co wiąże się ze zmianą w zapotrzebowaniu na różne źródła energii. Adekwatnie do założeń pracy, Doktorantka jasno sformułowała 5 głównych celów badawczych, służących weryfikacji postawionych hipotez: 1) Kompleksowa analiza follikulosomów bydlęcych oraz określenie wpływu suplementacji follikulosomami na oocyty i uzyskiwane po zapłodnieniu i hodowli *in vitro* blastocysty; 2) Zbadanie wpływu suplementacji follikulosomami na kompleksy oocyt-cumulus podczas dojrzewania *in vitro* w niekorzystnym środowisku z inhibitorami metabolizmu energetycznego; 3) Charakterystyka parametrów lipidowych podczas rozwoju zarodków bydlęcych w stadiach przedimplantacyjnych; 4) Określenie wpływu gamety męskiej na ilościowe i jakościowe parametry kropli lipidowych zarodków bydlęcych (zapłodnienia *in vitro* vs. partenogeneza); oraz 5) Charakterystyka różnic międzygatunkowych (świnia vs. bydło) parametrów kropli lipidowych podczas rozwoju zarodków w stadiach przedimplantacyjnych.

W rozdziale Materiały i metody, Doktorantka w dwóch podrozdziałach opisuje materiał badawczy, czyli pozyskane poubojowo jajniki bydlęce, z których aspirowane były kompleksy oocyt-cumulus oraz płyn pęcherzykowy, a także wykorzystane metody badawcze. Ten rozdział został przygotowany bardzo rzetelnie. Opis przeprowadzonych doświadczeń oraz zastosowanych technik badawczych został napisany z należytą skrupulatnością, a zamieszczenie schematów układów doświadczalnych umożliwia ich dokładne prześledzenie. Zastosowane metody badawcze są nowoczesne i zostały dobrane prawidłowo, umożliwiając weryfikację hipotezy badawczej i osiągnięcie zdefiniowanych przez Doktorantkę celów badawczych. Analizy wymagały od Doktorantki ogromnego nakładu pracy, dlatego opanowanie tak szerokiego wachlarza technik badawczych, tj. hodowle i zapłodnienie *in vitro* oocytów, hodowla *in vitro* zarodków, barwienie kropli lipidowych i analiza, parametrów lipidowych, real time PCR, profilowanie lipidowe blastocyst, izolacja follikulosomów, ich barwienie i analiza poboru przez komórki za

pomocą mikroskopii konfokalnej, analizy bioinformatyczne i testy statystyczne, zasługują w mojej ocenie na duże uznanie.

Kolejny rozdział to opis Wyników przygotowany na bazie przeprowadzonych dwóch eksperymentów. Jest on tożsamy z opisem wyników zamieszczonym w dwóch opublikowanych pracach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. W pierwszym eksperymencie Doktorantka scharakteryzowała rozmiar, koncentrację i morfologię wyizolowanych z bydłęcego płynu pęcherzykowego follikulosomów. Następnie wykazała ich zwiększone pobieranie przez komórki ziarniste kompleksu oocyt-cumulus w warunkach stresu metabolicznego, czyli po zastosowaniu inhibitorów metabolizmu glukozy oraz lipidów. Sugeruje to potencjalną rolę tych nanostruktur we wspieraniu mechanizmów przeciwdziałających niekorzystnym czynnikom środowiskowym, tj. stres. Co istotne, suplementacja pożywki follikulosomami w tych warunkach wpłynęła pozytywnie na dojrzewanie jądrowe oocyta i wylęganie blastocyst, a także na parametry kropli lipidowych w komórkach ziarnistych, co korelowało z poziomem transkryptów genów związanych z metabolizmem energetycznym tj. *GLUT1*, *ACACA*, *PPARA* i *PLIN2*, czy jakością oocytów (*GDF9*). Bardzo interesujące wyniki, jakie przedstawiła Doktorantka, odnoszą się do wspierającego wpływu suplementacji follikulosomami podczas dojrzewania *in vitro* oocytów w warunkach zaburzonego metabolizmu na profil lipidowy pochodzących z nich blastocyst. Przedstawione wyniki, opublikowane w prestiżowym dla dziedziny biologii rozrodu czasopiśmie *Biology of Reproduction*, są bez wątpienia nowatorskie i mają ogromny potencjał aplikacyjny. Wyniki badań uzyskane podczas realizacji drugiego eksperymentu zostały przedstawione w pracy, która ukazała się w czasopiśmie *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Doktorantka opisała w niej charakterystyczne wzorce parametrów kropli lipidowych na kolejnych etapach rozwoju zarodka przedimplantacyjnego, wskazując na największe zużycie lipidów w zarodkach 8-16-komórkowych, podczas aktywacji genomu zarodkowego u bydła. Wykazała także istotne różnice zarówno gatunkowo-specyficzne (między zarodkami bydła a świni), obejmujące m.in. wielkość i liczbę kropli lipidowych, jak i różnice zależne od pochodzenia genomowego. Wyniki te mogą mieć znaczenie w dalszej ocenie kompetencji rozwojowej zarodków. W mojej opinii wszystkie zadania badawcze zostały prawidłowo i rzetelnie zrealizowane, a postawiona hipoteza poprawnie zweryfikowana.

Ostatnią część opracowania polskojęzycznego stanowią 13-stronicowy rozdział Dyskusja, a następnie rozdział Podsumowanie i wnioski, które zostały sformułowane w sposób jasny i logiczny, a ich krótkie omówienie nadaje pracom wspólny charakter. W związku z tym, w/w prace stanowią koncepcyjnie spójny cykl artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych. **Podsumowując powyższe stwierdzam, że realizacja celu naukowego postawionego w dysertacji Pani mgr inż. Pauliny Lipińskiej-Kranc istotnie prowadzi do poszerzenia dotychczasowego stanu wiedzy oraz stanowi przyczynek do rozwiązywania oryginalnego problemu**

badawczego, polegającego na ocenie skuteczności wykorzystania follikulosomów do poprawy warunków dojrzewania oocytów *in vitro* oraz rozwoju zarodków bydła w warunkach zaburzonego metabolizmu energetycznego, spełniając tym samym wymóg ustawy stawiany pracom doktorskim.

W podsumowaniu stwierdzam, że Doktorantka wykazała się umiejętnościami planowania i prowadzenia badań naukowych, potrafi rozwiązać sformułowany problem naukowy, czego dowodem są krytyczne dyskusje prowadzone w przedłożonych publikacjach. Ponadto Doktorantka wykazała się bardzo dobrym przygotowaniem teoretycznym w zakresie podjętej tematyki badawczej, doskonałym warsztatem laboratoryjnym obejmującym metody pobierania oocytów bydlęcych i ich zapłodnienia *in vitro*, izolacji i charakterystyki pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, biologii molekularnej, barwienia komórkowe i analizy mikroskopowe oraz analizę lipidomiczną i bioinformatyczną. **Wskazuje to na spełnienie ustawowych kryteriów jakimi powinien charakteryzować się kandydat do stopnia doktora.**

W ocenianej rozprawie trudno jest wskazać słabe strony, ponieważ prace naukowe opublikowano w prestiżowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym i wysokich wskaźnikach bibliometrycznych, i z pewnością zostały one rzetelnie ocenione przez szerokie grono recenzentów oraz edytorów redakcji obu czasopism. Prace napisane są zrozumiale, z jasno sprecyzowanymi celami i prawidłowo przeprowadzoną dyskusją. Dokumentacja wyników w postaci tabel oraz figur jest jasna, czytelna i nie budzi zastrzeżeń. W mojej opinii cała rozprawa doktorska jest przemyślanym, konsekwentnie realizowanym pomysłem badawczym o dużej wartości poznawczej.

Pytania i komentarze do pracy

Niemniej jednak podczas analizy prac i opracowania polskojęzycznego rozprawy nasunęło mi się kilka pytań/uwag, którymi chciałabym się podzielić:

1. Uważam, że tytuł rozprawy doktorskiej jest zbyt ogólny i warto byłoby w nim ująć badane przez Doktorantkę pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Ten aspekt badań jest ich ogromnym walorem i szkoda, że został pominięty w tytule.
2. Istnieje wiele metod izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Dlaczego wybrała Pani tą konkretną i jakie ma ona zalety?
3. Czy przed izolacją pęcherzyków zewnątrzkomórkowych rozcieńczała Pani próbki płynu pęcherzykowego?
4. Czy grupy kontrolne bez dodatku inhibitorów glukozy i lipidów zostały przygotowane z dodatkiem nośnika, w którym rozpuszczano inhibitory? Jeśli nie, to proszę o wyjaśnienie tej kwestii.
5. W swoich badaniach wykorzystała Pani dodatek pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w stężeniu 6,5 µg/mL. Proszę o wyjaśnienie czym

kierowała się Pani przy wyborze dawki i w jakim stopniu mogła ona mieć wpływ na uzyskane wyniki.

6. W opisie eksperymentu nr 2, ani w publikacji nr 2, nie znalazłam informacji na temat rasy zwierząt (bydła i świń), od których był pobierany materiał badawczy, a także informacji czy były to zwierzęta niedojrzałe czy dojrzałe płciowo. Proszę o ich uzupełnienie.

7. Czy może Pani wskazać ograniczenia lub największe wyzwania podczas prowadzenia swoich badań?

8. W podsumowaniu swojej pracy napisała Pani, że kierunkiem przyszłych badań powinno być „zidentyfikowanie konkretnych bioelementów wewnątrz follikulosomów, które wspierają kompetencję oocytów i zarodków, a także tych, które mogą świadczyć o ich obniżonej jakości”. Czy mogłaby Pani zaproponować plan takich badań, opierając się na uzyskanych wynikach?

Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Pauliny Lipińskiej-Kranc jest wartościowym, oryginalnym dziełem naukowym zawierającym nowatorskie wyniki, które poszerzają wiedzę z zakresu biologii rozrodu zwierząt, a w szczególności wpływu follikulosomów na metabolizm energetyczny w oocytach i zarodkach przedimplantacyjnych bydła. Autorka wykazała się doskonałymi umiejętnościami w planowaniu i prowadzeniu badań, wnioskowaniu w oparciu o uzyskane wyniki oraz dużą wiedzą merytoryczną i wspaniałym przygotowaniem warsztatowym. Opublikowane prace, a także opracowanie polskojęzyczne, będące podstawą rozprawy doktorskiej, zostały bardzo dobrze przemyślane, rzetelnie zrealizowane i starannie przygotowane. Na uwagę i pochwałę zasługuje ogrom metod badawczych oraz kompleksowe podejście do rozwiązania problemu badawczego. Zawarte w niniejszej recenzji pytania czy komentarze nie umniejszają wartości merytorycznej ocenionej bardzo wysoko pracy doktorskiej, lecz są zachętą do naukowej dyskusji i dalszego rozwoju.

Wniosek końcowy

Reasumując stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Pauliny Lipińskiej-Kranc pt. *„Metabolizm energetyczny w oocytach i zarodkach przedimplantacyjnych bydła”* w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim i spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.) stawianym kandydatom ubiegającym się o uzyskanie stopnia naukowego doktora. **W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Pauliny Lipińskiej-Kranc do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.**

Mając na uwadze wysoką wartość naukową dysertacji, światowy poziom i szeroki zakres przeprowadzonych analiz, nowoczesny warsztat metodyczny, nowatorskie wyniki i ich publikację w postaci dwóch oryginalnych prac w prestiżowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, a także zaangażowanie i pracowitość Doktorantki oraz bardzo rzetelne przygotowanie przedłożonego do recenzji opracowania, wnoszę o wyróżnienie dysertacji.

Z wyrazami szacunku,



dr hab. Malgorzata Grzesiak, prof. UJ