

Poznań dnia 20.11.2025 r.

PROTOKÓŁ

z publicznej obrony pracy doktorskiej mgr inż. Pauliny Lipińskiej-Kranc

Dnia 20.11.2025, o godz. 9:00, na posiedzeniu Rady Naukowej Dyscypliny *Nauki Biologiczne* Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu odbyła się publiczna obrona pracy doktorskiej mgr inż. Pauliny Lipińskiej-Kranc pt.: „*Metabolizm energetyczny w oocytach i zarodkach przedimplantacyjnych bydła*”.

Posiedzenie zostało zorganizowane w formie stacjonarnej w Sali Collegium Rungego, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. W skład Komisji Doktorskiej wchodził:

Prof. dr hab. Izabela Szczerbal - przewodnicząca Komisji Doktorskiej

Prof. dr hab. Joanna Śliwowska

Prof. dr hab. Tomasz Szkudelski

Prof. UPP dr hab. Marek Skrzypski

Prof. UPP dr hab. Janusz Kłoskowski – nieobecny usprawiedliwiony

W posiedzeniu uczestniczyli Recenzenci rozprawy doktorskiej w osobach:

- Prof. dr hab. Monika Kaczmarek, Zespół Programowania Płodności i Rozwoju, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie,

- dr hab. Małgorzata Grzesiak, prof. UJ, Zakład Endokrynologii, Katedra Fizjologii Zwierząt, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Na posiedzeniu obecni byli członkowie Rady Naukowej Dyscypliny *Nauki Biologiczne*:

Prof. dr hab. Iwona Morkunas

Prof. dr hab. Izabela Szczerbal

Prof. dr hab. Tomasz Szkudelski

Prof. dr hab. Joanna Śliwowska

Prof. UPP dr hab. Łukasz Myczko

Prof. UPP dr hab. Marek Skrzypski

Dr hab. Weronika Banaszak-Cibicka

Prof. dr hab. Piotr Tryjanowski – nieobecny usprawiedliwiony

Prof. UPP dr hab. Wojciech Juzwa – nieobecny usprawiedliwiony

Prof. UPP dr hab. Janusz Kłoskowski – nieobecny usprawiedliwiony

Dr Emilia Grzęda – nieobecna

Obecna była Promotor rozprawy - prof. UPP dr hab. Ewelina Warzych- Plejer.

Posiedzenie protokołowała sekretarz - mgr inż. Marcelina Osyra.

Posiedzenie otworzyła Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny – prof. dr hab. Joanna Śliwowska. Poinformowała o przedmiocie obrad, powitała wszystkich uczestników publicznej obrony oraz omówiła przebieg posiedzenia. Następnie przekazała głos Przewodniczącej Komisji Doktorskiej prof. dr hab. Izabeli Szczerbal.

Przewodnicząca Komisji Doktorskiej przedstawiła dotychczasowy przebieg postępowania po czym o zabranie głosu poprosiła Panią Promotor prof. UPP dr hab. Ewelinę Warzych- Plejer która przedstawiła życiorys i profil naukowy Doktorantki.

Po zakończeniu wystąpienia Pani Promotor głos oddano Doktorantce, która przedstawiła główne założenia i wyniki pracy doktorskiej. Doktorantka zaprezentowała wyniki swojej pracy doktorskiej przy wykorzystaniu programu Power Point.

Po zakończeniu prezentacji głos zabrała Przewodnicząca Komisji Doktorskiej prof. dr hab. Izabela Szczerbal, dziękując Recenzentkom za wnikliwe recenzje i prosząc o ich przedstawienie. Przewodnicząca zaznaczyła też o możliwości skrócenia przedstawianych recenzji przez obecne recenzentki, z uwagi na wcześniejsze zapoznanie się z ich pełną treścią przez wszystkich członków Komisji Doktorskiej i Rady Dyscypliny. W pierwszej kolejności głos zabrała dr hab. Małgorzata Grzesiak, prof. UJ, następnie prof. dr hab. Monika Kaczmarek. Pełną wersję recenzji nieobecnej dr hab. Anny Ajduk, prof. UW, Wydział Biologii, Instytut Biologii Rozwoju i Nauk Biomedycznych, Zakład Embriologii odczytała Przewodnicząca Komisji Doktorskiej prof. dr hab. Izabela Szczerbal.

Recenzentki przedstawiły recenzje pracy i zgodnie stwierdziły, że rozprawa spełnia wszystkie kryteria określone w Ustawie o stopniach i tytułach naukowych. Przewodnicząca podziękowała Recenzentkom i poprosiła Doktorantkę o ustosunkowanie się do uwag oraz pytań zawartych w recenzjach.

Doktorantka na wstępie podziękowała za recenzje oraz uwagi i w pierwszej kolejności udzieliła zbiorczo odpowiedzi na pytania, których treść pojawiła się w recenzjach więcej niż jednokrotnie. Doktorantka wykorzystwała program Power Point do przygotowania slajdów ilustrujących treść wypowiedzi:

PYTANIA I UWAGI RECENZENTÓW:

Pytanie 1: *Dwie panie recenzent wskazały na zbyt ogólny tytuł pracy doktorskiej.*

Doktorantka zgodziła się z recenzentkami. Ogólny tytuł pracy wytłumaczyła faktem wymogów Szkoły Doktorskiej narzucającej sformułowanie tematu już na 1 roku studiów doktoranckich. Tematyka badawcza została już wtedy co prawda określona, jednak na tamtym etapie badań nie było jeszcze jasne, dokąd doprowadzą otrzymane wyniki i jakie kwestie badawcze okażą się najistotniejsze.

Pytanie 2: *Dwa pytania dotyczące wybranej przez Doktorantkę metody izolacji follikulosomów.*

Na wstępie Doktorantka wspomniała o dwóch najpowszechniej wykorzystywanych metodach izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jakimi są ultrawierowanie w gradiencie stężeń oraz jedno-etapowa chromatografia. Metodą zastosowaną w badaniach Doktorantki było ultrawierowanie w gradiencie stężeń. Decyzja o wyborze metody została podjęta na podstawie publikacji van Deun i wsp. (2014), którzy wykazali, że ta metoda daje najczystsze frakcje pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, charakteryzujące się największą zawartością pęcherzyków, najwyższym poziomem białek markerowych a także brakiem białek zanieczyszczających. Ponadto Doktorantka przytoczyła pracę Asadi i wsp. (2021), w której porównano techniki izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych autorzy wykazali wyższy odsetek blastocyst oraz lepszą ich jakość (większa liczba komórek i niższy poziom apoptozy) w doświadczeniu, w którym pożywkę do dojrzewania oocytów suplementowano follikulosomami uzyskanymi metodą ultrawierowania, Praca ta powstała w grupie prof. Ann van Soom, gdzie Doktorantka realizowała część badań podczas stażu, co również miało wpływ na wybraną metodę izolacji.

W dalszej kolejności Doktorantka odniosła się do pytań i uwag prof. dr hab. Moniki Kaczmarek:

PYTANIA I UWAGI RECENZENTA:

Pytanie 1: *Jak odróżniłaby Pani obecność follikulosomów w przestrzeniach trans-zonalnych od ich rzeczywistego, kierunkowego transportu do oocytu? Jaki pojedynczy eksperyment byłby tu najbardziej rozstrzygający?*

Doktorantka wyjaśniła, że w przeprowadzonym doświadczeniu dotyczącym poboru follikulosomów podczas dojrzewania oocytów *in vitro* wykazano ich obecność w komórkach pęcherzykowych, przestrzeniach trans-zonalnych, przestrzeni okołozółtkowej oraz w ooplazmie oocytu.

Zaznaczając, że zdjęcia z poboru follikulosomów są statyczne, natomiast wnioski o transferze z pożywki do ooplazmy oocytu oparto na podobnych badaniach Macaulay i wsp. (2016), którzy wykazali aktywny transfer RNA z komórek wieńca promienistego do oocytu poprzez połączenia trans-zonalne (TZPs). W celu udokumentowania rzeczywistego przemieszczania się RNA w kierunku oocytu, autorzy publikacji zastosowali barwienie całkowitego RNA w kompleksach oocyt-cumulus przyżyciowo oraz obrazowanie konfokalne. Zarejestrowano serię nagrań. Zaobserwowano, że część RNA poruszała się bardzo szybko, inne natomiast znacznie wolniej, ale pomimo zmiennej prędkości i kierunku ruchu, większość ziaren przemieszczała się wzdłuż TZPs w kierunku oocytu, co potwierdzało istnienie ukierunkowanego transferu. Doktorantka zakończyła wypowiedź stwierdzeniem, że aby jednoznacznie potwierdzić aktywny transport follikulosomów z komórek wieńca promienistego do ooplazmy oocytu, należałoby przeprowadzić eksperyment przyżyciowy z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej, analogiczny do układu doświadczalnego opisanego przez Macaulay i współpracowników (2016).

Pytanie 2: *Co, Pani zdaniem, utrudnia interpretację wyników dotyczących acylokarnityn w blastocystach i jak można to metodycznie rozwiązać?*

Na wstępie Doktorantka wyjaśniła rolę Acylokarnityn będących intermediami w procesie β -oksydacji kwasów tłuszczowych, odgrywających tym samym kluczową rolę w metabolizmie energetycznym komórek i zarodków. Ponadto związki te wykazują zdolność neutralizowania reaktywnych form tlenu (ROS). W badaniach lipidomicznych poziomy różnych gatunków acylokarnityn są uznawane za potencjalne markery jakości komórek i zarodków, szczególnie w kontekście ich wykrywania w medium po hodowli *in vitro*. W badaniach przeprowadzonych przez Doktorantkę wykazano, że blastocysty pochodzące z systemu z inhibicją metabolizmu glukozy charakteryzowały się obniżonym poziomem acylokarnityn. W połączeniu z wysokim odsetkiem wylęgania się blastocyst w tej grupie, zasugerowano prawdopodobnie niższy poziom reaktywnych form tlenu w blastocystach. Aby jednak zweryfikować tę hipotezę, należałoby porównać uzyskane wyniki z blastocystami kontrolnymi suplementowanymi follikulosomami. Niestety, nie było to możliwe z powodu utraty próbek w trakcie analiz. Doktorantka wspomniała też o możliwości wykonania analizy poziomu reaktywnych form tlenu w blastocystach.

Pytanie 3: *Jak można przetestować hipotezę o udziale szlaku kwasu arachidonowego i eikozanoidów w poprawie wylęgania blastocyst po suplementacji follikulosomami?*

Doktorantka zaproponowała, że ciekawym podejściem byłoby przeprowadzenie eksperymentu, w którym suplementuje się kompleksy oocyt-cumulus podczas dojrzewania follikulosomami i inhibitorami metabolicznym/ lub w tylko follikulosomami, a jednocześnie wprowadzając inhibitory szlaku syntezy kwasu arachidonowego już w procesie hodowli zarodków. Na poparcie tezy Doktorantka przytoczyła badania z 2006 roku przeprowadzone doświadczenie, którego częścią była inhibicja enzymów kluczowych dla metabolizmu kwasu arachidonowego, podczas pierwszych 3 dni hodowli

zarodków bydłych *in vitro*. Wykazano, że inhibicja negatywnie wpłynęła na parametry efektywności hodowli. Można by w ten sposób sprawdzić, czy pobrane podczas dojrzewania *in vitro* follikulosomy rekompensowałyby braki spowodowane zastosowaniem inhibitorów.

Pytanie 4: *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?*

Według Doktorantki obserwowane różnice międzygatunkowe w profilach lipidowych zarodków bydła i świń wynikają z kombinacji wszystkich wymienionych przez recenzentkę czynników, prawdopodobnie stanowiąc wynik adaptacji ewolucyjnej do specyficznych wymagań reprodukcyjnych każdego gatunku. Bydło jako gatunek o długim okresie ciąży (280–285 dni) i przeważnie monozygotyczny, rozwinęło strategię opartą na efektywnym wykorzystaniu glukozy i stabilnym rozwoju zarodkowym. Świnie, charakteryzujące się krótszą ciążą (114–116 dni) i dużymi miotami (10–14 prosiąt), wykształciły strategię intensywnego magazynowania energii w formie lipidów.

Doktorantka zwróciła uwagę na interesującą w kontekście porównania międzygatunkowego obserwację, dokonaną w ramach pracy doktorskiej, jaką okazała się analiza rozmiaru kropli lipidowych w zarodkach świni. Na wszystkich etapach rozwoju średnica kropli lipidowych w zarodkach świni pozostawała istotnie większa niż w zarodkach bydła. Krople lipidowe stanowią wysoce dynamiczne organella komórkowe, zdolne do fuzji oraz redystrybucji w odpowiedzi na zmieniające się potrzeby metaboliczne komórki. Ponieważ z mniejszych kropli możliwe jest efektywniejsze uwalnianie kwasów tłuszczowych, utrzymywanie dużych kropli lipidowych mogłoby teoretycznie stanowić niekorzystne rozwiązanie metaboliczne. Jednak obserwowana dynamika tych struktur w trakcie rozwoju zarodkowego wskazuje, że niezależnie od dominującego w danym stadium procesu – intensywnej mobilizacji lub magazynowania lipidów – krople lipidowe w zarodkach świni zachowują konsekwentnie duże rozmiary, co stanowi bardzo charakterystyczną cechę gatunkowo specyficzną.

W dalszej kolejności Doktorantka odniosła się do pytań i uwag dr hab. Anny Ajduk, prof.
UW:

PYTANIA I UWAGI RECENZENTA:

Pytanie 1: *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?*

Doktorantka odpowiedziała, że średnia masa jednego follikulosomu nie jest znana, natomiast stężenie zostało zmierzone za pomocą urządzenia Nanodrop w 3 powtórzeniach, z ustawieniami na pomiar poziomu białka przy długości fali 280 nm.

Pytanie 2: *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?*

Doktorantka odpowiedziała, że takie badania nie były przeprowadzane, przyznając jednocześnie zasadność przeprowadzenia oceny liczby komórek w węźle zarodkowym i trofektodermie, jak również ogólnej oceny morfologicznej blastocyst (np. wg Gardnera). Te dodatkowe analizy pozwoliłyby pogłębić temat wyższej jakości blastocyst otrzymanej w grupach suplementowanych. Z perspektywy czasu i doświadczeń, Doktorantka na pewno włączyłaby ten aspekt do wykonywanych doświadczeń.

Pytanie 3: *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.*

Doktorantka odpowiedziała, że komórki pęcherzykowe z internalizowanymi/lub nie follikulosomami były liczone pod mikroskopem konfokalnym z włączonym kanałem światła widzialnego, dzięki czemu możliwe było określenie granic między komórkami.

Pytanie 4: *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?*

Doktorantka odpowiedziała, że aby zminimalizować zmienność pomiędzy poszczególnymi doświadczeniami, przy każdym powtórzeniu utrzymywano identyczne parametry ustawień oprogramowania mikroskopu konfokalnego, jak również dzięki stosunkowo krótkiemu czasowi analizy moc lasera pozostawała na tym samym poziomie. Dodatkowo do wszystkich barwień w ramach danego doświadczenia wykorzystywano to samo źródło barwnika BODIPY tj. pochodzące z jednego początkowego rozcieńczenia, a analizy preparatów przeprowadzano w krótkim czasie po barwieniu

(zazwyczaj następnego dnia). Ponadto doktorantka powołała się na wyniki badań nad samym barwnikiem Bodipy, przeprowadzone przez Hinkeldey i wsp. wskazujące na jego wysoką fotostabilność. Na koniec Doktorantka zaznaczyła jednak, że pomimo tych środków ostrożności nie było możliwe całkowite wyeliminowanie potencjalnych źródeł błędu.

Pytanie 5: *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?*

Doktorantka przedstawiła kompletną liczbę przeanalizowanych oocytów i zarodków za pomocą slajdu programu Power Point, dodając, że zwiększona liczba obserwacji w grupie kontrolnej wynika między innymi z przeprowadzonych doświadczeń we wcześniejszych etapach badań promotorki. Doktorantka wyjaśniła też, że w grupach z suplementacją EVs była ograniczona ilość dostępnych prób follikulosomów. Podkreśliła też, że uzyskano istotne statystycznie różnice, co wskazuje na stabilność efektu i jego duże znaczenie biologiczne.

Pytanie 6: *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?*

Doktorantka odpowiedziała, że trudno jest jednoznacznie odpowiedzieć na to pytanie. W hipotetycznej sytuacji, gdyby nie posiadała zdjęć z doświadczenia z poboru follikulosomów, gdzie wprost widać je w ooplazmie oocytu, skłoniłaby się do wersji, że to właśnie wzbogacone w follikulosomy komórki pęcherzykowe są w lepszej kondycji i wywierają pozytywny wpływ na oocyt. Za taką hipotezę dodatkowo świadczyć by mogły uzyskane wyniki z analiz kropli lipidowych, jasno wykazujące, że większość obserwowanych zmian obserwowana była w komórkach pęcherzykowych a nie samym oocycie. Dodatkowo, przemawia za tym też wyższy pobór follikulosomów przez komórki pęcherzykowe z systemów inhibicji. Natomiast fakt, że w toku doświadczenia wykazano obecność follikulosomów w oocycie otwiera dodatkowy tor dyskusji. Z drugiej strony, pomimo follikulosomów widocznych w oocycie, nie da się z całą pewnością stwierdzić, że to bezpośrednio za ich sprawą widać zmiany w oocycie, ponieważ istnieją teorie mówiące o tym, że to komórka, do której wnikają pęcherzyki zewnątrzkomórkowe „decyduje”, czy ich zawartość zostanie uwolniona, czy wyrzucona poza komórkę. Podsumowując, Doktorantka dodała, że jest to ciekawa, jeśli nie kluczowa kwestia, na którą wprost nie zna odpowiedzi.

Pytanie 7: *Czy wiadomo, jak wygląda profil lipidowy w kontrolnej blastocyste? 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?

Doktorantka odpowiedziała, że istotnie, w wyjściowym układzie doświadczalnym było zaplanowane porównanie blastocyst kontrolnej i kontrolnej suplementowanej oraz dwa porównania blastocyst z systemów z inhibitorami. Co więcej, takie doświadczenie zostało przeprowadzone i blastocysty z każdej z grup zostały wysłane do laboratorium w Stanach Zjednoczonych, z którym zespół badawczy Doktorantki posiadał współpracę. Niestety w biegu analizy spektrometrycznej z powodu uszkodzenia części kapilar większa część prób kontrolnych oraz część prób kontroli suplementowanej została utracona. W związku z tym, że w takim typie analizy wszystkie próby muszą być analizowane bezpośrednio po sobie, niemożliwe było dostanie i przebadanie w późniejszym czasie tylko prób kontrolnych blastocyst. Oznaczałoby to wykonywanie całego doświadczenia od nowa, by móc uzyskać wiarygodne wyniki. Laboratorium przeprowadzające analizy zapewniło jednak, że pozostałe próby – czyli z systemów z inhibitorami zostały przeprowadzone prawidłowo. Z tego też powodu w pracy nie ma porównania blastocyst kontrolnych.

Pytanie 8: *Czy analiza lipidów jest obecnie w jakiegokolwiek formie testowana jako wskaźnik jakości zarodków nie tylko u zwierząt gospodarskich, ale np. u ludzi? W jaki sposób można by nieinwazyjnie badać np. liczbę kropli lipidowych w zarodkach (dobry marker jakości to taki, którego pomiar nie uszkadza trwale zarodka)?*

Doktorantka odpowiedziała, że badania dotyczące kropli lipidowych oraz ogólnie zawartości lipidów w ludzkich oocytach i zarodkach są wciąż ograniczone. Prawdopodobnie wynika to nie tylko z uwarunkowań etycznych, lecz także z bardzo niskiej zawartości kropli lipidowych w tych komórkach, co znacząco utrudnia ich detekcję i analizę. Następnie Doktorantka przytacza wyniki badań zespołu prof. Ptak opublikowane w 2024 roku w których badano ludzkie oocyty w stadium GV z wykorzystaniem techniki CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy), pozwalającej na analizę zmian w kroplach lipidowych oraz w profilu lipidowym oocytów. W przeprowadzonych badaniach wykazano różnice w parametrach kropli lipidowych pomiędzy oocytami pobranymi od kobiet w różnym wieku.

Technika CARS ma charakter nieinwazyjny, dzięki czemu umożliwia analizę struktur komórkowych w warunkach przyżyciowych, bez powodowania uszkodzeń badanych komórek. Zdaniem Doktorantki, metoda ta w przyszłości może stanowić obiecujące narzędzie do nieinwazyjnej analizy zarodków, umożliwiając wykorzystanie kropli lipidowych jako markera jakości.

Pytanie 9: *Czy są jakieś prace dotyczące follikulosomów u człowieka, pokazujące, że mogą one służyć jako marker jakości oocytów czy też polepszać warunki hodowli/dojrzewania oocytów? Jeśli takie*

prace istnieją, to jakie wartości charakteryzujące krople lipidowe (czy szerzej profil lipidowy oocytu/zarodka) lub follikulosomy odpowiadają zarodkom o wysokiej jakości, a jakie tym o niskiej?

Doktorantka odpowiedziała, że w literaturze dotyczącej rozrodu człowieka w tematyce pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przeważają prace dotyczące tzw. cross-talku pomiędzy blastocystą a m.in. komórkami endometrium za pośrednictwem właśnie pęcherzyków. Natomiast pominięcie dojrzewania oocytów i wpływu follikulosomów na ten proces w badaniach nad człowiekiem może mieć podstawy w tym, że w zachodnim nurcie embriologii klinicznej nie przeprowadza się rutynowo dojrzewania oocytów *in vitro*. Temat ten został podniesiony w ostatnich latach praktyki klinicznej w krajach azjatyckich, tak więc zdaniem Doktorantki jest kwestią czasu, kiedy prace o tej tematyce zaczną się też pojawiać na materiale ludzkim. Istnieje także praca opublikowana w 2024 roku przez grupę z Chin, która badała follikulosomy pobrane od zdrowych kobiet i od kobiet obciążonych zespołem policystycznych jajników (PCOS). Badacze wskazali konkretne mikroRNA w follikulosomach u pacjentek z PCOS, które pośredniczyło w apoptozie komórek ziarnistych poprzez oddziaływanie na dehydrogenazę mleczanową i hamowanie glikolizy. Doktorantka podsumowała wypowiedź stwierdzeniem, że odkrycia tego typu mogą posłużyć jako biomarkery diagnostyki, w tym przypadku PCOS.

W dalszej kolejności Doktorantka odniosła się do pytań i uwag dr hab. Małgorzaty Grzesiak, prof. UJ:

PYTANIA I UWAGI RECENZENTA:

Pytanie 1: *Czy przed izolacją pęcherzyków zewnątrzkomórkowych rozcieńczyła Pani próbki płynu pęcherzykowego?*

Doktorantka odpowiedziała, że przed izolacją pęcherzyków zewnątrzkomórkowych „pełny” płyn pęcherzykowy był wirowany, aby wstępnie go oczyścić. Nie był w dalszym postępowaniu rozcieńczany.

Pytanie 2: *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.*

Doktorantka wyjaśniła, że jajniki bydła i świń, wykorzystane w doświadczeniach pochodziły z uboju komercyjnego, w związku z czym nie posiadała pełnej informacji na temat rasy zwierząt. Natomiast w kwestii dojrzałości płciowej - doświadczeniu na świniach wszystkie oocyty pochodziły od samic dojrzałych płciowo, a w przypadku bydła było to około 80%.

Pytanie 3: *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.*

Doktorantka wyjaśniła, że grupy kontrolne nie zostały przygotowane z dodatkiem nośnika, w którym rozpuszczane były inhibitory. Zastosowano 0,1% DMSO jedynie do przygotowania roztworów inhibitorów, zgodnie z rutynową procedurą stosowaną w laboratorium. Doktorantka wskazała, że w pracy Madeja i wsp. (2015) oceniono wpływ DMSO na jakość zarodków oraz profil ekspresji genów i nie stwierdzono istotnych różnic między warunkami hodowli z DMSO i bez DMSO. Odwołała się również do publikacji Rivolta et al. (2020), w której wykazano, że niskie stężenia DMSO stosowane podczas dojrzewania oocytów *in vitro* nie wywierają szkodliwego działania na komórki zarodków.

Pytanie 4: *W swoich badaniach wykorzystala Pani dodatek pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w stężeniu 6,5 ug/mL. Proszę o wyjaśnienie czym kierowała się Pani przy wyborze dawki i w jakim stopniu mogła ona mieć wpływ na uzyskane wyniki.*

Doktorantka wyjaśniła, że wybór stężenia pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wynoszącego 6,5 ug/mL wynikał ze współpracy z zespołem prof. Ann van Soom. Wskazała, że pracujący w tym zespole dr Nima Azari przeprowadził optymalizację dawek suplementacyjnych i wykazał, iż zastosowane stężenie zapewnia najwyższą skuteczność. Doktorantka dodała, że wyniki tych badań, opublikowane w październiku bieżącego roku, jednoznacznie wskazują, iż w indywidualnych hodowlach zarodkowych dawka 6,5 ug/mL zwiększała odsetek blastocyst w 8. dniu hodowli, jak również całkowitą liczbę komórek w blastocystach oraz liczbę komórek w węzle zarodkowym.

Pytanie 5: *Czy może Pani wskazać ograniczenia lub największe wyzwania podczas prowadzenia swoich badań?*

Doktorantka odpowiedziała, że największymi ograniczeniami i wyzwaniami w trakcie prowadzenia badań były przede wszystkim ograniczone możliwości pozyskania środków finansowych na dodatkowe cele badawcze, ponieważ finansowanie pochodziło głównie ze źródeł wydziału i katedry. Wskazała również na utratę części prób w wyniku błędu aparatury, co skutkowało brakiem potencjalnie istotnych danych. Doktorantka podkreśliła także, że praca z follikulosomami wymagała wcześniejszej optymalizacji oraz wiązała się z utrudnionym dostępem do specjalistycznego sprzętu znajdującego się na innej uczelni, a dodatkowo materiał badawczy – follikulosomy – musiał być izolowany w Belgii. Zaznaczyła ponadto, że rozpoczęcie doktoratu w 2020 roku, w szczytowym okresie pandemii COVID-19, znacząco utrudniło dostęp zarówno do materiału pozyskiwanego z rzeźni, jak i do laboratorium.

Pytanie 5: *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?*

Doktorantka odpowiedziała, że na podstawie uzyskanych wyników kierunek przyszłych badań powinien koncentrować się przede wszystkim na identyfikacji mikroRNA przenoszonych przez

follikulosomy, ponieważ pęcherzyki zewnątrzkomórkowe w znacznym stopniu transportują właśnie te bioelementy, a dotychczasowe publikacje wskazują, iż konkretne mikroRNA mogą modulować m.in. rozwój blastocyst. Podkreśliła, że wykrycie cząsteczek odpowiedzialnych za pozytywne efekty w hodowlach zarodków ma duży potencjał aplikacyjny, zwłaszcza jako przyszłe suplementy do żywek stosowanych w leczeniu niepłodności.

Doktorantka zaproponowała dwutorowy plan dalszych badań. Po pierwsze, przewiduje izolację i charakterystykę mikroRNA pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pozyskiwanych z medium po dojrzewaniu kompleksów oocyt-cumulus zarówno w grupach z inhibitorami, jak i kontrolnej, a także z medium hodowlanego w dniu 8, kiedy rozwijają się blastocysty. Zamierza porównać te profile, w tym również analizować pęcherzyki pochodzące z hodowli o najniższej efektywności rozwoju blastocyst. Po drugie, planuje pogłębioną analizę samych blastocyst obejmującą ocenę morfologiczną według Gardnera, analizę liczby komórek w węźle zarodkowym i trofektodermie, ocenę apoptozy, a także wykonanie biopsji trofektodermy oraz węzła zarodkowego i osobną analizę lipidomiczną oraz transkryptomoczną (RNA-seq) obu linii komórkowych. Doktorantka podkreśliła, że tak zaplanowane, wielopoziomowe badania pozwoliłyby odpowiedzieć na pytania, które nie mogły zostać rozstrzygnięte w dotychczasowym układzie doświadczalnym.

Następnie głos zabrała Przewodnicząca Komisji Doktorskiej prof. dr hab. Izabela Szczerbal zwracając się do Pań Recenzentek z pytaniem czy są one usatysfakcjonowane odpowiedziami uzyskanymi od Doktorantki. O głos poprosiła prof. dr hab. Monika Kaczmarek, odpowiadając, że istotnie jest ona usatysfakcjonowana wypowiedziami Doktorantki, jedynie chciałaby poprosić o uzupełnienie jednej kwestii pytania zbiorczego dotyczącego metody izolacji follikulosomów, która nie znalazła wcześniej odpowiedzi – tzn. jakie markery jakości pęcherzyków zdaniem Doktorantki należałoby wprowadzić do rutyny laboratoryjnej? Recenzentka wspomniała o danych literaturowych jak i nowych wytycznych mówiących o zastosowaniu markerów negatywnych dla follikulosomów, które nie zostały zawarte w pracy. Podsumowując, z perspektywy czasu, czy Doktorantka uważa czy oprócz markerów pozytywnych które badała (białek szoku cieplnego itd.) warto wprowadzić do rutyny laboratoryjnej także markery negatywne?

Doktorantka odpowiedziała, że swoją analizę follikulosomów prowadziła w 2023 r., a nowe wytyczne dotyczące follikulosomów wprowadzono rok później. Dlatego charakterystyka tych struktur była przeprowadzona wg. starszych wytycznych. Nowe wytyczne zmieniły m.in. podział follikulosomów czy też podział markerów pozytywnych na klasy, wprowadzając ogólnie bardziej szczegółowe kryteria. Według Doktorantki, im szersza byłaby charakterystyka follikulosomów, tzn. obejmująca każdy marker, który jest w stanie scharakteryzować te struktury, tym lepsze byłoby wnioskowanie w pracy i głębsza wiedza na temat materiału, którego dotyczy analiza.

Prof. Kaczmarek podziękowała Doktorantce za odpowiedź i poprosiła jeszcze o doprecyzowanie odpowiedzi na pytanie prof. dr hab. Anny Ajduk dotyczącej dawki 6,5 ug/mL follikulosomów. Recenzentka zaznaczyła, że poziom białka w follikulosomach może się różnić i z tego względu nie do końca jest to dobry sposób oceny ich koncentracji. W doświadczeniach zespołu badawczego Recenzentki określano procentowy skład tego co podaje się w medium. Czy opierając się na publikacjach przytoczonych przez Doktorantkę w odpowiedziach na pytanie prof. Ajduk uważa ona, że jakaś standaryzacja koncentracji białka próby podanej potem do pożywek do dojrzewania *in vitro* jest lepszym rozwiązaniem niż te spotykane w literaturze, czy ma inne poglądy na ten temat?

Doktorantka odpowiedziała, że jest to trudne pytanie ze względu różne sposoby przeliczania koncentracji follikulosomów spotykanych w literaturze - w niektórych było to stężenie białka w innych przeliczanie koncentracji w NTA (Nanoparticle Tracking Analysis. Doktorantka wspomniała też, że poświęciły wraz z Promotorką dużo uwagi kwestii dawek suplementacyjnych, napotykając spore problemy w danych literaturowych, gdzie nie opisano w odpowiedni sposób co dokładnie i w jakich dawkach było suplementowane. W związku z czym nawiązano współpracę z grupą badawczą prof. Ann Van Soom, zajmującą się analizą follikulosomów jako jednym z głównych zadań badawczych. Grupa ta zaproponowała swoje rozwiązanie - suplementowanie białkiem, co było też poparte opublikowanymi już badaniami opartymi na tym systemie. Doktorantka dodała na koniec, że dziedzina badań nad follikulosomami rozwija się dynamicznie, i wciąż z dużą częstotliwością pojawiają się nowe doniesienia na ich temat, a próbowanie różnych metod suplementowania jest kluczem do odpowiedzi na zadane pytanie. Doktorantka wraz Promotorką opierały się na doświadczeniach innych naukowców, którzy wystandaryzowali metodę suplementowania białkiem, jednak nie ma absolutnej pewności że metoda ta jest najlepszą dostępną.

Następnie głos zabrała druga z obecnych Recenzentek - dr hab. Małgorzata Grzesiak, prof. UJ prosząc o podanie w jakim zakresie stężeń przebiegała optymalizacja suplementacji follikulosomami przeprowadzona przez zespół belgijski? Do jakiego najwyższego stężenia?

Doktorantka wyświetliła slajd programu Power Point z wymaganymi informacjami, odpowiadając, że zastosowana ostatecznie dawka 6,5 ug była najniższą testowaną dawką. najwyższą dawką było 25 ug/ml, a pośrednią 12 ug/ml. Co ciekawe ta najniższa dawka dała najlepsze efekty a najslabsze dawka pośrednia.

Prof. Grzesiak dopytała dodatkowo czy parametrem mówiącym o skuteczności dawki follikulosomów był odsetek otrzymywanych blastocyst? Doktorantka odpowiedziała, że owszem, wraz z oceną ich jakości mierzonej na podstawie komórek całej blastocysty oraz wężła zarodkowego.

Po zakończeniu przez Doktorantkę odpowiadania na pytania Recenzentek Przewodnicząca Komisji Doktorskiej ogłosiła przystąpienie do publicznej dyskusji nad rozprawą doktorską, zachęcając do zadawania pytań członków Komisji Doktorskiej jak i wszystkich obecnych na sali.

Prof. UPP dr hab. Piotr Pawlak:

Pytanie 1: *W Pani układzie eksperymentalnym dodanie do pożywki folikulosomów wyklucza inny sposób ich transportu do oocytu niż przez komórki pęcherzykowe. Czy widziałaby Pani scenariusz, gdzie podajemy znakowane follikulosomy w określonym stężeniu do oocytu metodą ICSI, i sprawdzamy w jaki sposób oocyt postępuje z tak otrzymaną strukturą: czy wykorzystuje cargo zawarte w follikulosomie, czy może poprzez przeładowanie, bądź też inne mechanizmy przez kanały trans-zonalne w osłonce przejrzystej zwraca je do komórek pęcherzykowych?*

Doktorantka odpowiedziała, że nie znalazła informacji w literaturze na temat układów doświadczalnych, gdzie wprowadzono by follikulosomy bezpośrednio do oocytu u żadnego z gatunków. Zdaniem Doktorantki ciekawym podejściem byłoby wprowadzenie do oocytu follikulosomów już wybarwionych, aby sprawdzić, czy mogą one trafić z powrotem do komórek pęcherzykowych. Do tej pory niewiele wiadomo o tym jak różne typy komórek postępują z pobranymi follikulosomami w swoim wnętrzu, aczkolwiek istnieją teorie na ten temat o czym wspomniała już Pani Recenzent. W przytoczonym wcześniej badaniu śledzącym losy RNA przekazywanego z komórek pęcherzykowych do wnętrza oocytu obserwowano ich cofanie się, także tu mógłby istnieć podobny mechanizm. Problemem technicznym byłaby niemożność przyżyciowego wybarwienia follikulosomów na terenie komórek. Należałoby je wyizolować, wybarwić i dopiero wprowadzić do oocytu. Doktorantka podsumowała wypowiedz stwierdzeniem, że istnieje duże pole do dyskusji i badań w powyższym temacie.

Pytanie 2: *Poziom lipidów utrzymywał się na stałym poziomie w bydlęcych zarodkach partenogenetycznych, natomiast w zarodkach uzyskiwanych z IVF spadał w okolicach aktywacji genomu zarodka. Czy może to wynikać z obecności lub braku genomu ojcowskiego? Jakie inne mechanizmy regulujące gospodarkę lipidową mogłyby tu działać (wynikające z biparentalności genomu)?*

Doktorantka odpowiedziała na pytanie przytaczając dwie hipotezy postawione w przebiegu badań. Pierwsza hipoteza mówi o tym, że przypadku zarodków uzyskanych przy użyciu gamety męskiej istnieją 2 genomy które muszą zostać zmetylowane, co wymaga dużych nakładów energetycznych - stąd taka duża utylizacja lipidów której nie zaobserwowano w zarodkach partenogenetycznych, gdzie taka podwójna zmiana metylacji nie miała miejsca. Druga hipoteza mówi o rozregulowanym metabolizmie lipidów w zarodkach partenogenetycznych, co wpływa na zmiany w jego przebiegu w stosunku do zarodków uzyskanych z użyciem gamety męskiej.

Prof. dr hab. n. med. Beata Banaszewska: *Czy Doktorantka widzi jakiś potencjał w metodzie IVM, aby poprawić płodność pacjentek z PCOS (Zespołem Policystycznych Jajników)?*

Doktorantka odpowiedziała, że istnieje potencjał by właśnie za pomocą follikulosomów przywrócić IVM pacjentkom z PCOS u których stymulacja hormonalna jest trudna, często prowadząc

do hiperstymulacji. Należałoby najpierw scharakteryzować mikroRNA z follikulosomów i znaleźć takie które mają potencjał mogący rekompensować braki komórek pacjentek z PCOS. Następnie zastosować suplementacje follikulosomami z odpowiednio wybranymi mikroRNA.

Prof. dr hab. Marek Świtoński:

Pytanie 1: *Czy zarodki partenogenetyczne są dobrym modelem dla Pani badań biorąc pod uwagę kwestie braku wiedzy o poziomie ploidalności takich zarodków i odmiennym profilu metylacji DNA wynikającym z jednorodzielskiego (matczyngo) piętnowania genomowego?*

Doktorantka odpowiedziała, że istotnie istnieją badania, gdzie zastosowanie modelu partenogenetycznego ma uzasadnienie. Sporo się mówi o tym modelu w kontekście np. klonowania, natomiast faktycznie w rozrodzie może stanowić on problem. W badaniach Doktorantki zastosowano model partenogenetyczny u bydła, w układzie umożliwiającym porównanie go z zarodkami uzyskanymi z zapłodnienia z użyciem gamety męskiej. Natomiast w przypadku świni często stosuje się aktywację partenogenetyczną ze względu na bardzo wysoki, sięgający 80% stopień polispermii przy zapłodnieniu *in vitro*. Zdaniem Doktorantki, istotnie bardziej wiarygodne wyniki uzyskano by z użyciem jedynie zarodków uzyskanych z zapłodnienia z użyciem gamety męskiej, natomiast w przypadku badań Doktorantki i modelu świńskiego nie było to możliwe. Aby w pełni ocenić prawidłowość i przydatność modelu partenogenetycznego należałoby przeprowadzić badania transkryptomyczne i lipidomiczne dla każdego stadium zarodkowego i porównać z zarodkami uzyskanymi w wyniku zapłodnienia. To by pozwoliło wnioskować o zasadności zastosowania modelu partenogenetycznego w badaniach nad rozrodem.

Pytanie 2: *Czy tempo rozwoju bydłych zarodków partenogenetycznych było takie samo jak tempo rozwoju zarodków uzyskanych w wyniku zapłodnienia *in vitro*? W rozumieniu liczby komórek i osiągniętych stadiów rozwojowych.*

Doktorantka odpowiedziała, że całe doświadczenie zostało zaplanowane tak, by kolejne stadia zarodkowe były pobierane w tym samym czasie po zapłodnieniu. I dla bydłych zarodków partenogenetycznych i niepartenogenetycznych to były takie same czasy - także rozwój tych dwóch typów zarodków przebiegał pod tym względem tak samo.

Doktorantka przytoczyła także nieopublikowane dane ze swoich badań, gdzie dokonywała liczenia komórek w zarodkach parteno- i niepartenogenetycznych. Zarodki partenogenetyczne posiadały tam mniejszą ogólną liczbę komórek w przeliczeniu na zarodek niż niepartenogenetyczne. Analiza ta dotyczyła stadium moruli, wczesnych blastocyst i blastocyst. Zmniejszona liczba komórek w zarodkach partenogenetycznych jest uznanym parametrem wskazującym na ich obniżoną jakość.

Prof. dr hab. Joanna Śliwowska: *Jak widzi Pani zastosowanie wyników swoich badań uzyskanych w modelach świńskim i bydłym w praktyce klinicznej u ludzi?*

Zdaniem Doktorantki follikulosomy stanowią odpowiedź na wiele bolączek współczesnej embriologii klinicznej. Oprócz miRNA struktury te zawierają fragmenty lipidów (tzw. lipid rafts), różnorodne białka i enzymy. Stworzenie pełnej charakterystyki zawartości follikulosomów miałyby zastosowanie na każdym etapie w embriologii klinicznej, począwszy od pobrania oocytów od pacjentek. Suplementacja tych oocytów osłabionych samą procedurą pobierania, bądź też naturalnie słabszej jakości, wybranymi białkami czy miRNA pochodzącymi z follikulosomów mogłyby podnieść liczbę komórek rozrodczych przydatnych w procedurach *in vitro* uzyskiwanych od pacjentek.

Doktorantka wspomniała też badania dotyczące pozytywnego wpływu obecności follikulosomów w plazmie nasienia na jego jakość. Rodzi to możliwość suplementacji nasienia pobudzającymi czynnikami zawartymi w follikulosomach poprawiającymi jego jakość. Mógłby to wpłynąć na zwiększenie częstości zastosowania metody zapłodnienia *in vitro* klasycznego kosztem metody ICSI, co wpłynęłoby z kolei na usprawnienie pracy w laboratorium embriologicznym.

Prof. dr hab. Izabela Szczerbal: *Jakie są różnice w charakterystyce follikulosomów w kontekście dawcy i jego wieku?*

Według Doktorantki, patrząc na badania embriologiczne nad mitochondriami, czy też suplementowaniem płynem pęcherzykowym starszych i młodszych samic za każdym razem widać, że w kontekście rozrodu materiał pozyskany z młodszych, zdrowych samic daje pozytywne efekty nawet jeśli podamy jego elementy do komórek lub zarodków osobników starszych. Tak więc suplementować powinno się follikulosomy pochodzące od młodych i zdrowych osobników. W badaniach doktorantki wykonywanych w Belgii, pobierano płyn pęcherzykowy pochodzący głównie od krów rasy Belgian Blue (rasa mięsna), u których nie obserwuje się zaburzeń energetycznych, jak ma to miejsce w przypadku krów mlecznych rasy Holsztyńsko-Fryzyskiej, na których Doktorantka prowadziła badania w Polsce. Tak więc follikulosomy wyizolowane przez doktorantkę w Belgii mogą potencjalnie być lepszej jakości niż gdyby przeprowadzić takie samo doświadczenie w Polsce, na follikulosomach pochodzących od krów z zaburzeniami metabolicznymi - właśnie ze względu na cały stan metaboliczny organizmu.

Prof. dr hab. Joanna Nowacka-Woszek: *Czy wiadomo jaki jest profil mikroRNA w follikulosomach charakterystycznych dla pęcherzyków jajnikowych? I czy istnieją badania wskazujące że te mikroRNA można by wiązać z profilem ekspresji genów kodujących białka i jak to korelować w kontekście jakości oocytu.*

Odpowiadając, Doktorantka przytoczyła badania, w których analizowano całą listę mikroRNA które udało się wykryć metodami takimi jak RNAseq. Następnie wytypowane mikroRNA dodawano np. do pożywek do hodowli zarodków czy dojrzewania oocytów i na podstawie wyników tej suplementacji wnioskowano o funkcji danego mikroRNA. Do tej pory wyizolowano i scharakteryzowano kilka cząsteczek mikroRNA o konkretnej funkcji, np. podwyższające odsetek

wylętych blastocyst po dodaniu do medium hodowlanego, czy też mikroRNA specyficzne dla blastocyst słabej jakości. Podsumowując, Doktorantka podkreśliła bardzo skąpe dane literaturowe dostępne dla poruszanej kwestii.

Po udzieleniu odpowiedzi przez Doktorantkę, Przewodnicząca Komisji Doktorskiej zapytała kolejno osoby zadające pytania, czy są usatysfakcjonowani odpowiedziami. Po uzyskaniu twierdzącej odpowiedzi, poinformowała o zakończeniu jawnej części obrony i oddała głos Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny, która zarządziła przerwę w posiedzeniu Rady. W części niejawnej obrad Komisji Doktorskiej uczestniczyli członkowie Komisji Doktorskiej oraz Recenzentki i Sekretarz Komisji. Przewodnicząca Komisji Doktorskiej poprosiła członków Komisji i Recenzentów o wyrażenie krótkiej opinii na temat prezentacji Doktorantki i przebiegu obrony. Głos zabrali kolejno:

Dr hab. Małgorzata Grzesiak, prof. UJ: Oceniała prezentację przygotowaną przez Doktorantkę jako czytelną, klarowną, opowiedzianą spokojnie. Odpowiedzi na zadane pytania były wyczerpujące, a z wypowiedzi Doktorantki widać było doświadczenie kliniczne.

Prof. dr hab. Monika Kaczmarek: Bardzo wysoko oceniła prezentację Doktorantki, która zarówno w sposobie prezentacji jak i odpowiedziach na pytania reprezentowała wysoki poziom.

Prof. dr hab. Joanna Śliwowska: Wysoko oceniła prezentację, zwracając uwagę na jej klarowność i syntetyczność. Wysoko oceniła także sposób wypowiedzi Doktorantki, który świadczył o odczytaniu.

Prof. dr hab. Tomasz Szkudelski: Wysoko ocenił cały przebieg obrony, doceniając dobre przygotowanie merytoryczne Doktorantki.

Prof. UPP dr hab. Marek Skrzypski: Wysoko ocenił wszystkie części obrony.

Prof. dr hab. Izabela Szczerbal: Wysoko oceniła prezentację wygłoszoną przez Doktorantkę oraz pochwaliła znakomite merytorycznie odpowiedzi Doktorantki na zadane pytania.

Po zakończeniu dyskusji, Przewodnicząca Komisji Doktorskiej zarządziła 3 tajne głosowania w których zgodnie z zasadami przyjętymi przez Radę Naukową Dyscypliny *Nauki Biologiczne* udział wzięli członkowie Komisji oraz Recenzenci:

1) *nad podjęciem uchwały o przyjęciu publicznej obrony pracy doktorskiej mgr inż. Pauliny Lipińskiej-Kranc*

w głosowaniu wzięło udział 6 osób

Wynik głosowania: 6 – tak, 0 – nie, 0 – wstrzymujących się.

2) *nad podjęciem uchwały o wystąpieniu przez Komisję Doktorską do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o nadanie mgr inż. Paulinie Lipińskiej-Kranc stopnia naukowego doktora w dziedzinie Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, dyscyplinie Nauki biologiczne*

w głosowaniu wzięło udział 6 osób

Wynik głosowania: 6 – tak, 0 – nie, 0 – wstrzymujących się

3) *nad podjęciem uchwały o wystąpieniu przez Komisję Doktorską do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o wyróżnieniu pracy doktorskiej mgr inż. Pauliny Lipińskiej-Kranc*

w głosowaniu wzięło udział 6 osób

Wynik głosowania: 6 – tak, 0 – nie, 0 – wstrzymujących się

Przewodnicząca Komisji Doktorskiej podsumowała wyniki głosowania. Komisja Doktorska powołana do przeprowadzenia postępowania w sprawie nadania mgr inż. Paulinie Lipińskiej-Kranc stopnia naukowego doktora, poparła przyjęcie obrony rozprawy doktorskiej, wnioski do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki biologiczne o nadanie stopnia doktora oraz wnioski o wyróżnienie pracy doktorskiej. Przewodniczący Komisji Doktorskiej zamknęła niejawną część posiedzenia.

Następnie Przewodnicząca wznowiła posiedzenie Rady i przedstawiła opinię Komisji Doktorskiej. W tej części posiedzenia uczestniczyli członkowie Rady Naukowej Dyscypliny Nauki biologiczne, Komisja Doktorska, Recenzenci, Promotor oraz Sekretarz. Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny zwróciła się do zebranych z pytaniem, czy chcieliby wyrazić swoją opinię.

Następnie Przewodnicząca zarządziła dwa tajne głosowania:

1) *w sprawie nadania mgr inż. Paulinie Lipińskiej-Kranc stopnia naukowego doktora w dziedzinie Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, dyscyplinie Nauki biologiczne.*

w głosowaniu wzięło udział 6 osób

Wynik głosowania: 6 – tak, 0 – nie, 0 – wstrzymujących się

2) *w sprawie wyróżnienia pracy doktorskiej mgr inż. Pauliny Lipińskiej-Kranc*

w głosowaniu wzięło udział 6 osób

Wynik głosowania: 6 – tak, 0 – nie, 0 – wstrzymujących się

Rada Naukowa Dyscypliny Nauki Biologiczne podjęła decyzję o nadaniu mgr inż. Paulinie Lipińskiej-Kranc stopnia naukowego doktora w dziedzinie Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, dyscyplinie Nauki biologiczne.

Na zakończenie prof. dr hab. Joanna Śliwowska - Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny *Nauki biologiczne* złożyła gratulacje Doktorantce, następnie oddała jej głos. Doktorantka złożyła podziękowania wszystkim osobom, które pomogły jej w osiągnięciu kolejnego etapu rozwoju naukowego.

M. Osyra

.....
Sekretarz
mgr inż. Marcelina Osyra

Izabela Szczerbal

.....
Przewodnicząca Komisji Doktorskiej
prof. dr hab. Izabela Szczerbal