Olsztyn, 24 sierpnia 2021 roku
Prof. dr hab. Izabela Wocławek-Potocka,
Zakład Biologii Gamet i Zarodka
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk
ul. Tuwima 10,
10-747 Olsztyn
tel.: 089 5393155,
i.woclawek-potocka@pan.olsztyn.pl

Recenzja aktywności naukowej i osiągnięcia naukowego

pt.

Molekularne komponenty potencjału rozwojowego oocytów i partenogenetycznych zarodków świni in vitro

Pana dr Piotra Pawlaka, w postępowaniu o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Recenzję wykonano na podstawie wymagań określonych w art. 219 ust.1 pkt 2 i 3, ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz 85 z późn. zm.)

Pan dr Piotr Pawlak przedłożył do oceny dokumentację obejmującą:

1. Wniosek o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie zootechnika i rybactwo,
2. Kopię odpisu dyplomu uzyskania stopnia naukowego doktora,
3. Autoreferat w języku polskim,
4. Kopie publikacji stanowiących osiągnięcie habilitacyjne, wraz z oświadczeniami współautorów,
5. Wykaz osiągnięć naukowych,
6. Kopie odbytych staży naukowych, posiadanych certyfikatów oraz nagród,
7. Kwestionariusz osobowy.

Wykształcenie i przebieg pracy zawodowej Habilitanta

Pan dr Piotr Pawlak studia na Wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Kierunku Biotechnologia rozpoczął w 2002 roku i ukończył obroną pracy magisterskiej w 2007 roku. W 2007 roku pan dr Pawlak rozpoczął studia doktoranckie na Wydziale Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Studia doktoranckie pan dr Pawlak zakończył w 2012 roku obroną pracy doktorskiej pt.:"Dojrzałość płciowa loszek a jakość oocytów", wykonanej pod kierunkiem pani prof. Doroty Cieślak. Od 2014 roku Habilitant zatrudniony jest na stanowisku Adiunkta w katedrze Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Ocena merytoryczna osiągnięć o których mowa w art. 219 ust.1 pkt 2 i 3 Ustawy

Jako podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego, Habilitant wykazał osiągnięcie naukowe stanowiące cykl oryginalnych prac twórczych ujętych pod wspólnym tytułem: "*Molekularne komponenty potencjału rozwojowego oocytów i partenogenetycznych zarodków świni in vitro*".

W skład osiągnięcia naukowego wchodzą 4 oryginalne prace twórcze o łącznym współczynniku oddziaływania 15,59 i sumarycznej liczbie punktów MNiSW równej 410. W trzech pracach dr Pawlak jest pierwszym i korespondencyjnym autorem a w jednej ostatnim i korespondencyjnym. Współautorzy prac, w złożonych oświadczeniach zgodnie potwierdzili wiodącą i pierwszoplanową rolę Habilitanta w przygotowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu doświadczeń a także zdobyciu finansowania.

Habilitant w przedłożonym do oceny osiągnięciu naukowym podjął się zbadania i identyfikacji molekularnych komponentów potencjału rozwojowego oocytów i partenogenetycznych zarodków świni in vitro. Dotychczasowy stan wiedzy oraz uzasadnienie podjęcia badań w wyżej wspomnianym zakresie Habilitant szczegółowo przedstawił w dostarczonym do oceny autoreferacie. Wybrany przez Habilitanta problem badawczy wydaje się szczególnie istotny z uwagi na fakt, że dotyczy najmniej dotychczas zbadanego aspektu dojrzewania cytoplazmatycznego komórki jajowej, jak również próby identyfikacji czynników z bezpośredniego środowiska wzrostu oocytu. Dodatkowo, trafność wyboru świni domowej jako modelu do badania rozwoju przedimplantacyjnego zarodków ludzkich, zasługuje również na uznanie.

Hipoteza badawcza, która została sformułowana przez pana dr Pawlaka zakładała zatem istnienie wpływu środowiska pęcherzyka jajnikowego na prawidłowy przebieg

dojrzewania cytoplazmatycznego oocytu oraz identyfikację istotnych czynników środowiskowych oddziałujących pomiędzy somatycznymi komórkami pęcherzyka jajnikowego a komórka jajową. W celu weryfikacji postawionej hipotezy badawczej, pan dr Pawlak sformułował następujące zadania badawcze:

1. Ocena wpływu dojrzałości płciowej samicy na wybrane parametry charakteryzujące oocyty, partenogenetyczne zarodki, komórki pęcherzykowe i płyn pęcherzykowy.
2. Określenie wpływu warunków dojrzewania kompleksów oocyt – kumulus na jakość oocytów i zarodków in vitro.
3. Identyfikacja komponentów molekularnych i komórkowych opisujących jakość oocytów i partenogenetycznych zarodków hodowanych in vitro.
4. Ocena przydatności wybranych parametrów opisujących komórki pęcherzykowe oraz płyn pęcherzykowy jako markerów potencjału rozwojowego oocytów in vitro.
5. Analiza regulacji metabolizmu lipidów na poziomie transkryptomu oraz określenie wpływu środowiska hodowlanego na jego profil.

Z przedstawionych w pracy pt.: „Mitochondria and mitochondrial DNA in porcine oocytes and cumulus cells- a search for developmental competence marker", wyników badań jasno wynika, że dojrzałość płciowa loszek nie wpływa na liczbę kopii mtDNA i rozmieszczenie mitochondriów w oocytach, korelacja liczby kopii mtDNA w oocytach i komórkach pęcherzykowych może posłużyć jako marker potencjału rozwojowego oocytów i zarodków, opisane korelacje wskazują na różnice jakościowe komórek pęcherzykowych niedojrzałych i dojrzałych płciowo loszek, jak również że podczas dojrzewania in vitro kompleksów oocyt-kumulus dochodzi do replikacji mtDNA w oocytach a nie w komórkach pęcherzykowych. Dodatkowo, autor osiągnięcia naukowego wskazuje na konieczność rozszerzenia analiz korelacji liczby kopii mtDNA w kumulusie i w oocycie na klasy morfologiczne kompleksów oocyt-kumulus, co bezpośrednio pozwoli zweryfikować na dużej liczbie oocytów zasadność użycia tej analizy w kontekście oceny potencjału rozwojowego.

Głównym celem kolejnej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego było zbadanie czy obniżony potencjał rozwojowy oocytów loszek niedojrzałych płciowo może wynikać z niekorzystnego profilu kwasów tłuszczowych z ich płynu pęcherzykowego. W pracy pt.: „The consequences of porcine IVM medium supplementation with follicular fluid become reflected in embryo quality, yield, and gene expression patterns", Habilitant udowodnił, że płyn pęcherzykowy od loszek niedojrzałych i dojrzałych płciowo różnią się istotnie stężeniem kwasów tłuszczowych, jakkolwiek obserwowano jedynie wpływ

suplementowania pożywki do dojrzewania oocytów płynem pęcherzykowym jedynie na zarodki a nie na oocyty i w większej mierze pochodzące od niedojrzałych niż dojrzałych loszek. Dodatkowo, oocyty i zarodki od dojrzałych płciowo samic wykazywały zbliżony, stabilny potencjał rozwojowy niezależnie od warunków dojrzewania, jakkolwiek proces dojrzewania in vitro COCs świni powinien odbywać się w stabilnych i powtarzalnych warunkach ze względu na rutynowe zastosowanie dodatku płynu pęcherzykowego, o stosunkowo zmiennym profilu kwasów tłuszczowych, do medium. W mojej ocenie w tym aspekcie badań habilitant włożył bardzo istotny wkład w rozwój badań w pewnym już stopniu aplikacyjnych. Trudno było się natomiast spodziewać opisywanego przez pana dr Pawlaka niskiego poziomu apoptozy w partenogenetycznych zarodkach świni.

Praca pt.: „Fatty acid induced lypolysis influence embryo development, gene expression, and lipid droplet formation in the porcine cumulus cells" stanowi kontynuację badań nad rolą suplementacji pożywki do dojrzewania oocytów oraz do hodowli zarodków świni in vitro wybranymi kwasami tłuszczowymi. W pracy tej wykazano, że suplementacja pożywki do dojrzewania oocytów in vitro bardziej wpływa na metabolizm lipidów w komórkach pęcherzykowych niż w oocytach, przy czym dodatek kwasu stearynowego i oleinowego powodował odkładanie lipidów w kroplach lipidowych w tych komórkach oraz znacznie stymulował poziom ekspresji mRNA genów zaangażowanych w metabolizm lipidów w tych komórkach. Wykazano również, że dodatek kwasu oleinowego podnosił efektywność hodowli partenogenetycznych zarodków in vitro. Podsumowując autor pisze, że odpowiedź COC na warunki środowiskowe wymaga współpracy komórek pęcherzykowych i oocytu.

Ostatnia, wchodząca w skład osiągnięcia naukowego praca naukowa pt.: „Lipid stores and lipid metabolism associated gene expression in porcine and bovine parthenogenetic embryos revealed by fluorescent stainig and RNA-seq" jest dopełnieniem wcześniejszych badań, przeprowadzonych z wykorzystaniem najnowocześniejszych technik biologii molekularnej, na dwóch modelach wyhodowanych in vitro przedimplantacyjnych zarodków bydła i świni, pod kątem porównania ekspresji genów dwóch wybranych ścieżek: „krople lipidowe" oraz „magazynowanie lipidów". W przeprowadzonych badaniach wykazano istotne różnice charakterystyki kropli lipidowych oraz różny poziom ekspresji genów pomiędzy zarodkami bydła i świni, co z punktu widzenia odmiennej specyfiki hodowli zarodków tych dwóch gatunków zwierząt, wydaje się oczywiste. W zarodkach świńskich, w przeciwieństwie do bydlęcych, nie wykazano różnic w regulacji metabolizmu lipidów pomiędzy komórkami węzła zarodkowego i trofektodermy. Na

szczególne podkreślenie zasługuje wytypowanie genów o specyficznej dla danego gatunku ekspresji w stadium blastocysty. Wskazano, dodatkowo na różnice gatunkowe w przebiegu różnych procesów fizjologicznych pomiędzy zarodkami bydła i świni – te np. w sposobie pozyskiwaniu energii z glukozy, czy metabolizmie cholesterolu.

W mojej opinii, powyższy cykl prac stanowiący osiągnięcie naukowe spełnia wymagania ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym zarówno pod względem formalnym jak i merytorycznym, wnosząc jednocześnie znaczący wkład w rozwój Zootechniki i Rybactwa jako dyscypliny naukowej. Przedłożone przez Habilitanta prace, ich konsekwentne po sobie następstwo logiczne wynikające z przeprowadzonych kolejno badań nie tylko umożliwiły znaczące poszerzenie wiedzy o przeimplantacyjnym rozwoju zarodków świni in vitro ale także posiadają dużą przydatność dla doskonalenia technik wspomaganego rozrodu zwierząt i człowieka, wykorzystując świnię jako zwierze modelowe.

Ocena całokształtu dorobku i istotnej aktywności naukowej

Na szczególne podkreślenie zasługuje ocena ponadprzeciętnej aktywności Habilitanta w aspekcie współpracy naukowej w kraju i za granicą. Pan dr Pawlak prowadzi efektywne, prowadzące w większości przypadków do publikacji wspólnych prac naukowych, badania z siedmioma krajowymi ośrodkami naukowymi oraz z czterema zagnaicznymi. O dojrzałości naukowej Habilitanta świadczy umiejętność samodzielnego nawiązywania współpracy naukowej podczas międzynarodowych konferencji.

W aspekcie oceny osiągnięć dydaktycznych Habilitanta, prowadzi On, w ramach pensum dydaktycznego, zajęcia dydaktyczne ze studentami z trzech wydziałów uniwersyteckich w pełnym wymarze godzin, także w języku angielskim.

Pan dr Piotr Pawlak był recenzentem 13 prac dyplomowych, opiekunem 2 prac licencjackich, 14 inżynierskich i 7 magisterskich, a nawet promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim, co świadczy o ponadprzeciętnej aktywności w kształceniu młodych kadr naukowych.

Od blisko pięciu lat pan dr Pawlak zaangażowany jest bardzo aktywnie w bardzo różne aktywności popularyzujące naukę, prowadząc zajęcia dla studentów wyższych uczelni, doktorantów a także dla młodzieży. Jest to bardzo ważny i potrzebny rodzaj aktywności, choć często niedoceniany. Społeczne zaangażowanie Habilitanta w życie Uczelni której jest pracownikiem, w postaci pracy na rzecz wielu Komisji i Zespołów, również zasługuje na uznanie.

Całokształt dorobku naukowego pana dr Piotra Pawlaka obejmuje współautorstwo 35 oryginalnych prac naukowych, dwóch artykułów przeglądowych oraz jednego popularnonaukowego. W mojej ocenie dorobek naukowy Habilitanta jest spójny, wyważony i uczciwie wypracowany, czego dowodem jest uzyskanie przez dr Pawlaka wielu prestizowych nagród i wyróżnień.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Oceniając wyróżniające osiągnięcie naukowe, istotną aktywność naukową oraz dokonania organizacyjno- dydaktyczne, pana dr Piotra Pawlaka, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że spełniają one wymogi awansu naukowego do uzyskania stopnia naukowego doktora habilitowanego określone w Ustawie o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki i zwracam się do szanownych członków Komisji Habilitacyjnej, powołanej przez Radę Naukową Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Wydziału Madycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, o podjęcie stosownej uchwały w sprawie nadania panu dr Piotrowi Pawlakowi stopnia naukowego Doktora Habilitowanego.

Ponadto, z uwagi na znaczący dorobek i wysoką aktywność naukową, znacząco przekraczającą osiągnięcia naukowe zwyczajowo wymagane w procedurze nadania tytułu Doktora Habilitowanego, zwracam się z wnioskiem do szanownych członków Komisji Habilitacyjnej o wyróżnienie Habilitanta stosowną nagrodą.

Izabela Wocławek Potocka

.....

Z poważaniem

Olsztyn, 24 sierpnia 2021 r. **prof. dr hab. n. wet. Izabela Wocławek-Potocka**