Olsztyn, 24 czerwca 2021 r.

prof. dr hab. inż. Krystyna Demska-Zakęś
Katedra Ichtiologii i Akwakultury
Wydział Bioinżynierii Zwierząt
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
e-mail: krysiadz@uwm.edu.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Fajkowskiej

pt. „Molekularne mechanizmy różnicowania gonad u jesiotrów pod wpływem fitoestrogenów"

wykonanej w Instytucie Nauk o Zwierzętach
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Recenzję wykonano w związku z uchwałą Rady Wydziału Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie Pismo Dyrektora Instytutu Nauk o Zwierzętach dr hab. Marcina Gołębiewskiego, prof. SGGW, z dnia 31.05.2021 r. (sygn. INZ-51/2021, WNZ.510.6.2018)

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Fajkowskiej pt. „Molekularne mechanizmy różnicowania gonad u jesiotrów pod wpływem fitoestrogenów" została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Teresy Ostaszewskiej (promotora pracy) oraz dr Małgorzaty Rzepkowskiej (promotora pomocniczego), i doskonale wpisuje się w nurt badań realizowanych w Samodzielnym Zakładzie Ichtiologii i Biotechnologii w Akwakulturze. Bezsprzecznie cechuje ją przymiot *stricte* poznawczy, ale i utylitarny. Recenzowana praca znakomicie porządkuje i poszerza wiedzę nt. molekularnych mechanizmów różnicowania płci jesiotrów oraz podejmuje próbę wyjaśnienia wpływu fitoestrogenów na przebieg dyferencjacji gonad u jesiotra rosyjskiego. Uzyskane wyniki mogą mieć istotne znaczenie dla rozwoju akwakultury tego gatunku. Zauważalny w ostatnich latach trend do ograniczania udziału mączki rybnej w paszach i zastępowania jej m.in. komponentami roślinnymi skutkuje zwiększeniem ilości np. fitoestrogenów. Te biologicznie czynne związki, oddziałując agonistycznie lub antagonistycznie względem hormonów steroidowych, mogą powodować zaburzenia ekspresji genów i szlaków metabolicznych. W konsekwencji, zwłaszcza u gatunków ryb, u których dyferencjacja płci zachodzi późno i/lub trwa długo (np. u jesiotra rosyjskiego), ksenobiotyki endokrynnie czynne (EDC), w tym fitoestrogeny zawarte w diecie

mogą zakłócać przebieg różnicowania oraz rozwoju płci gonadowej. Zależnie od zakresu i skali tych zmian może to prowadzić do obniżenia wartości użytkowej ryb i zmniejszenia potencjału rozrodczego odchowanego stada. Stąd prowadzenie badań nad rozwojem i funkcjonowaniem układu rozrodczego ryb oraz wpływem związków potencjalnie endokrynnie czynnych jest nie tylko zasadne, ale i niezwykle ważne.

Rozprawę doktorską Pani mgr inż. Magdaleny Fajkowskiej stanowi spójny tematycznie cykl trzech publikacji opatrzonych wspólnym tytułem „Molekularne mechanizmy różnicowania gonad u jesiotrów pod wpływem fitoestrogenów". W skład cyklu wchodzą następujące publikacje:

I. Praca przeglądowa:
   1. Fajkowska M., Ostaszewska T., Rzepkowska M. 2020 - Molecular mechanisms of sex differentiation in sturgeons - Reviews in Aquaculture 12(2): 1003-1027 (liczba punktów wg wykazu MNiSW = 200; IF_{2019} = 7,772);

II. Prace oryginalne:
   1. Fajkowska M., Głowacka D. K., Adamek-Urbańska D., Ostaszewska T., Krajnik K. A., Rzepkowska M. 2019 - Sex-related gene expression profiles in various tissues of juvenile Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) - Aquaculture 500: 532-539 (liczba punktów wg wykazu MNiSW = 140; IF_{2019} = 3,224);
   2. Fajkowska M., Adamek-Urbańska D., Ostaszewska T., Szczepkowski M., Rzepkowska M. 2021 - Effect of genistein, daidzein and coumestrol on sex-related genes expression in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) - Aquaculture 530: 735872 (liczba punktów wg wykazu MNiSW = 140; IF_{2019} = 3,224).

Wymienione powyżej prace ukazały się w latach 2019 - 2021 w renomowanych czasopismach naukowych uwzględnionych w bazie *Journal Citation Report*. Ich sumaryczny wskaźnik wpływu (*Impact Factor*) wynosi 14,22, a całkowita liczba punktów przedmiotowych publikacji, wg *Wykazu czasopism* Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) z 2019 r., wynosi 480 pkt. Wszystkie publikacje mają charakter wieloautorski: praca I.1 (3 autorów), praca II.1 (6 autorów), praca II.2 (5 autorów). Doktorantka we wszystkich pracach jest pierwszym autorem, a także autorem korespondującym. Świadectwem bardzo istotnego wkładu Kandydatki w finalne powstanie omawianych publikacji jest Jej udział procentowy, który można oszacować na 69% (praca I.1), 65% (praca II.1) i 66% (praca II.2). We wszystkich opracowaniach Doktorantka pełniła rolę przypisywaną autorowi wiodącemu (*senior author*). Jej indywidualny wkład, biorąc pod uwagę oświadczenia współautorów o udziale

w publikacjach, polegał bowiem na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu dokumentacji badań, zbieraniu piśmiennictwa i przygotowywaniu manuskryptów.

Opracowanie zawierające ww. cykl publikacji liczy 125 stron i obejmuje m.in. rozdziały wprowadzające, tj.: *Podziękowania*, *Oświadczenia promotora i autora rozprawy doktorskiej*, *Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską*, *Streszczenie* w języku polskim i angielskim, *Finansowanie* oraz załączniki, tj. kserokopie trzech publikacji składających się na rzeczoną rozprawę doktorską i oświadczenia wszystkich współautorów pracy, w których wyszczególniono udział procentowy i charakter udziału danej osoby w powstanie ostatecznej wersji publikacji naukowej. Zasadniczą część manuskryptu (61 stron) stanowi kompilacyjne podsumowanie publikacji wchodzących w skład rozprawy, składające się z rozdziałów: *Wstęp*, *Hipoteza badawcza, cel i zakres pracy*, *Metodyka badań*, *Wyniki*, *Podsumowanie*, *Wnioski i stwierdzenia*, *Bibliografia.* Układ ten jest logiczny, a język rozprawy jasny i komunikatywny.

We *Wstępie* Doktorantka przedstawiła podstawowe informacje nt. biologii jesiotra rosyjskiego, statusu i znaczenia ryb jesiotrowatych. Znacznie więcej uwagi poświęciła na charakterystykę fitoestrogenów i zagadnienia związane z mechanizmami różnicowania płci, zwłaszcza ryb jesiotrowatych. Ta problematyka została szczegółowo opisana w pracy I.1, wchodzącej w skład rozprawy i dowodzi bardzo dobrej znajomości badanego tematu.

Cele badań sformułowane w oparciu o postawioną hipotezę obejmowały:

- ustalenie wpływu paszy komercyjnej, zawierającej fitoestrogeny izoflawonowe, na profil ekspresji genów związanych z rozwojem i różnicowaniem się płci w gonadach, mózgach, wątrobach i mięśniach młodocianych osobników jesiotra rosyjskiego (praca II.1);
- określenie wpływu wybranych fitoestrogenów izoflawonowych, tj. genisteiny, daidzeiny oraz kumestrolu, podawanych jako dodatki paszowe, na ekspresję genów związanych z rozwojem i różnicowaniem płci jesiotra rosyjskiego (praca II.2).

Pani mgr inż. Magdalena Fajkowska w celu realizacji ww. założeń przeprowadziła dwa eksperymenty, w których analizowała ekspresję genów związanych z rozwojem płci samczej (*dmrt1*, *sox9*, *amh*, *ar*), samiczej (*foxl2*, *cyp19*, *erα*, *erβ*, *vtg*) oraz ekspresję genów wpływających na rozwój obu płci (*star* i *vasa*). W eksperymencie I próby tkanek do badań (gonady, mózg, wątroba oraz mięśnie) pobrano po 180 dniach podchowu (180 dni po wykluciu (dpw)) z użyciem paszy komercyjnej zawierającej fitoestrogeny. Eksperyment II trwał dłużej, do 365 dpw, a ryby żywione były paszą komponowaną bez i z dodatkiem fitoestrogenów

sojowych, tj. genisteiny i daidzeiny oraz kumestrolu przez 265 dni. Ekspresję badanych genów analizowano w gonadach, mózgu i wątrobie jesiotra rosyjskiego.

Uzyskane przez Autorkę wyniki badań zostały przedstawione poprawnie i przejrzyście. Opisane w treści rozdziału oraz przedstawione w tabelach i na wykresach stanowią dobrą dokumentację przeprowadzonych badań i upoważniają do wnioskowania. Przeprowadzone przez Panią mgr inż. Magdalenę Fajkowską eksperymenty oraz analizy histologiczne, genetyczne i statystyczne zaowocowały oryginalnymi, bardzo ciekawymi wynikami i to zarówno w kontekście poznawczym, jak i aplikacyjnym. Za szczególnie wartościowe uważam:

- udokumentowanie, że fitoestrogeny wpływają na profil ekspresji genów związanych z rozwojem i różnicowaniem się płci u jesiotra rosyjskiego, co może prowadzić do feminizacji;
- wykazanie, iż mózg jest głównym organem inicjującym różnicowanie płci u jesiotra rosyjskiego, a ekspozycja na fitoestrogeny wpływa na zmiany profilu ekspresji badanych genów, zwłaszcza w tkance mózgowej;
- ustalenie, że analizowane fitoestrogeny, tj. daidzeina, genisteina i kumestrol w podobny sposób wpływają na poziom ekspresji badanych genów w gonadach, natomiast ich oddziaływanie na tkankę mózgową i wątrobę jest różne. W tkance mózgowej najsilniej oddziaływały genisteina i kumestrol, zmieniając profile ekspresji genów takich jak *sox9* czy *foxl2*, co potencjalnie może wpływać na zaburzenia molekularnych kaskad aktywacji genów i inwersję płci. W wątrobie natomiast najsilniej zaznaczył się wpływ daidzeiny, która istotnie wpływała na ekspresję genów, głównie *erα*, *erβ* i *ar*, czego konsekwencją może być destabilizacja molekularnych kaskad aktywacji genów estrogeno- i androgenozależnych;
- wykazanie, że żywienie jesiotra rosyjskiego paszą zawierającą mieszaninę fitoestrogenów, daidzeinę, genisteinę lub kumestrol powoduje wzrost ekspresji w tkance mózgowej i wątrobie genu *vtg*, który jest markerem narażenia na związki estrogennie czynne.

Według mojej oceny istotnym *novum* badawczym o dużej wartości poznawczej i aplikacyjnej jest wykazanie wpływu kumestrolu na molekularne mechanizmy różnicowania gonad jesiotra rosyjskiego.

Reasumując należy stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa mieści się w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie zootechnika i rybactwo, i w tym zakresie dokumentuje kompetencje naukowe mgr inż. Magdaleny Fajkowskiej. Spójny tematycznie cykl publikacji

stanowiący rozprawę jest oryginalnym opracowaniem dotyczącym molekularnych mechanizmów różnicowania gonad u jesiotra rosyjskiego pod wpływem fitoestrogenów. Badania zostały wykonane metodycznie poprawnie, z użyciem nowoczesnych metod i technik badawczych, a Doktorantka przy ich wykonywaniu i opracowywaniu wyników wykazała się odpowiednią wiedzą merytoryczną oraz umiejętnością samodzielnego ich planowania i prowadzenia. Oceniana rozprawa spełnia więc wymogi art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym..., który stanowi, że rozprawa doktorska powinna „*wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej...*", „*stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego...*" oraz wykazywać „*umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej*".

Niezależnie od faktu, iż prace stanowiące rozprawę doktorską były recenzowane i opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych szczegółowa ich analiza, jak również analiza przedstawionego opracowania ujawniła drobne niedociągnięcia, również o charakterze polemicznym, które z obowiązku recenzenta zmuszona jestem przedstawić w formie uwag krytycznych. Moim zdaniem trochę niefortunnie został sformułowany tytuł rozprawy. Obiektem prezentowanych badań był wyłącznie jesiotr rosyjski, dlatego fakt ten powinien być odnotowany w tytule rozprawy. Pewien niedosyt budzi opis eksperymentalnych podchowów jesiotra rosyjskiego (zarówno w publikacjach, jak i opracowaniu), zwłaszcza w odniesieniu do zastosowanej diety. W eksperymencie I „*ryby żywione były paszą komercyjną (Aller Aqua, Christiansfeld, Dania) przeznaczoną dla jesiotrów*". Producent oferuje różne pasze dla jesiotrów, zwłaszcza o masie ciała powyżej 10 g (np. Ivory Ex, Performa, Bronzi) różniące się nieco składem biochemicznym i komponentowym, dlatego warto byłoby podać jakie pasze zastosowano. Jest to istotne ponieważ w opracowaniu występują stwierdzenia o zastosowaniu pasz o wysokim udziale fitoestrogenów, podczas gdy udział ten, jak podano w publikacji II.1, był różny i wynosił od 1,44 do 50 mg g^{-1} paszy. W eksperymencie II zastosowano pasze komponowane wyprodukowane przez firmę Sparos Lda (Olhão, Portugalia). W kontekście stwierdzonych zaburzeń w różnicowaniu płci jesiotrów z grupy kontrolnej nasuwa się pytanie czy zastosowane pasze „bazowe" rzeczywiście były pozbawione fitoestrogenów. Czy przeprowadzono analizy składu użytych pasz? Jaki był ich skład komponentowy? Biorąc pod uwagę wysoką zawartość genisteiny w paszach komercyjnych rekomendowanych do żywienia ryb jesiotrowatych, czy rozważono przeprowadzenie eksperymentu z użyciem pasz „bazowych" (pozbawionych fitoestrogenów) suplementowanych tym izoflawonem w dawkach jakie występują w paszach komercyjnych?

Ponadto, w moim odczuciu trochę niefortunnie przygotowano rozdział *Wnioski i stwierdzenia*. Warto byłoby wyodrębnić wnioski i oddzielnie podać stwierdzenia.

Przedstawione uwagi nie umniejszają wartości recenzowanej rozprawy i nie mają wpływu na jej jednoznacznie pozytywną i wysoką ocenę. Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Fajkowskiej bezsprzecznie jest dziełem oryginalnym. Składający się nań cykl trzech publikacji jest spójny tematycznie. Uzyskane wyniki badań stanowią istotny wkład w rozwój dyscypliny wiedzy zootechnika i rybactwo. Analiza przesłanej dokumentacji jednoznacznie wskazuje, że Doktorantka we wszystkich trzech publikacjach, składających się na rozprawę doktorską, pełniła funkcję lidera zespołu sygnującego te prace. Dowodzi to, że posiada Ona, jakże istotne dla pracownika nauki umiejętności planowania i realizacji ambitnych zamierzeń naukowych.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Fajkowskiej spełnia wymogi określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.), w zw. z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.). W związku z tym przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wniosek o dopuszczenie rozprawy Pani mgr inż. Magdaleny Fajkowskiej do publicznej obrony.

Demska-Zakęś

prof. dr hab. inż. Krystyna Demska-Zakęś