Prof. dr hab. inż. Krzysztof Formicki, prof. zw.
Katedra Hydrobiologii, Ichtiologii i Biotechnologii Rozrodu
Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Recenzja
rozprawy doktorskiej
pani mgr inż. Magdaleny Fajkowskiej
pod tytułem
„Molekularne mechanizmy różnicowania gonad u jesiotrów pod wpływem fitoestrogenów"

Niniejsza opinia spisana została dla Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Promotor: prof. dr hab. Teresa Ostaszewska,
Samodzielny Zakład Ichtiologii i Biotechnologii w Akwakulturze
Instytut Nauk o Zwierzętach

Jesiotr rosyjski należy do najcenniejszych gospodarczo ryb ze względu na mięso bogate w wielonienasycone kwasy omega-3, a przede wszystkim ze względu na ikrę, z której produkuje się kawior. Ilość osobników tego gatunku w naturalnych warunkach w ostatnich dekadach drastycznie się zmniejszyła, dlatego też zaczęła się dynamicznie rozwijać akwakultura tych ryb. Z punktu widzenia ekonomii hodowli korzystne jest jak najwcześniejsze rozdzielenie samic i samców, co zmniejsza koszty produkcji. Problemem jest jednak brak widocznego zewnętrznego dymorfizmu płciowego, który nie pozwala na wczesne zidentyfikowanie samic i samców, a i wiedza dotycząca mechanizmu rozwoju i różnicowania płci u jesiotrów jest w znacznym stopniu ograniczona.

Proces różnicowania się gonad w jądra i jajniki zależy m.in. od czynników genetycznych, środowiskowych i behawioralnych. U jesiotra płeć jest najprawdopodobniej determinowana genetycznie, a w naturalnym środowisku rozkład płci – stosunek samic do samców jest równy. Koszt hodowli jesiotrów jest stosunkowo wysoki ze względu na konieczność stosowania pasz o wysokiej zawartości białka i z tego powodu coraz częściej drogie białkowe produkty pochodzenia zwierzęcego, są zastępowane komponentami roślinnymi, takimi jak soja i jej pochodne. Produkty te zawierają jednak duże ilości fitoestrogenów, działających podobnie do estrogenów mogących zaburzać funkcjonowanie układu endokrynowego u ryb. Związki te mogą zaburzać ekspresję genów i w następstwie powodować zaburzenia przebiegu procesu różnicowania oraz rozwoju płci. Jesiotry rosyjskie są szczególnie wrażliwe na działanie związków endogennie czynnych w okresie pierwszego roku życia po wykluciu, bowiem żeńskie komórki płciowe rozpoczynają proces mejozy około 200 dnia po wykluciu. Natomiast gonadach męskich różnicowanie rozpoczyna się około 440 dnia po wykluciu. Różnicowanie płci męskiej następuje dzięki czynnikom genetycznym i hormonalnym oraz dzięki blokowaniu aktywności genów odpowiedzialnych za rozwój płci żeńskiej. Z kolei różnicowanie się płci żeńskiej jest procesem zależnym od aktywacji żeńskiej kaskady genów oraz działania estrogenów. Z tego powodu trwają poszukiwania rozwiązań, które w sposób istotny poprawiłyby i zwiększyły rentowność hodowli jesiotrów.

Pani mgr inż. Magdalena Fajkowska wraz z Promotorem bardzo celnie wpisali się w bardzo potrzebny i mające duże znaczenie poznawcze i aplikacyjne, nurt badań, bowiem wpływ estrogenów na ekspresję genów i szlaków molekularnych u ryb, nie został do tej pory szczegółowo opisany. Na tej podstawie został sformułowany cel i zakres pracy. Założono, że fitoestrogeny podawane jesiotrom w paszy w okresie poprzedzającym cytologiczne różnicowanie komórek płciowych, mogą powodować zaburzenia

ekspresji genów związanych z rozwojem i różnicowaniem się płci. Zatem celem szczegółowym, było zbadanie wpływu paszy komercyjnej, zawierającej znaczne ilości fitoestrogenów izoflawonowych na profil ekspresji genów, związanych z rozwojem i różnicowaniem się płci w gonadach, mózgu, wątrobie i mięśniach u 180 dniowych jesiotrów. Zakres prac obejmował określenie poziom ekspresji genów *amh, ar,cyp19, dmrtl1,era,erβ, fox12, sox9, star oraz vtg.*

Celem drugim, wynikającym niejako z celu pierwszego, było określenie wpływu poszczególnych fitoestrogenów izoflawonowych, jak: genisteina, daidzeina i kumestrol, podawanych jako dodatki paszowe, na ekspresję genów związanych z rozwojem i różnicowaniem się płci jesiotrów rosyjskich. Odchów jesiotrów prowadzono do 356 dnia po wylęgu i analizowano ekspresję genów w gonadach, mózgu i wątrobie. Zakres prac obejmował określenie ekspresji genów wymienionych w celu pierwszym oraz genu *wasa.*

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Fajkowskiej, opiera się na trzech pracach opublikowanych w 2019, 2020 i 2021 r. Praca pierwsza pt. *Molecular mechanisms of sex differentiation in sturgeons*, opublikowana została w Reviews in Aquaculture (200 pkt, IF=7.772) i stanowi bardzo szczegółowy przegląd piśmiennictwa światowego w tym zakresie. Dwie kolejne prace pt. *Sex-related gene expression profiles in various tissues of juvenile Russian sturgeon (Acipenser guldenstaedtii)* oraz praca *pt. Effect of genistein, daidzein and coumstestrol on sex-related genes expression in Russian sturgeon (Acipenser guldenstaedtii)* zostały opublikowane w Aquaculture (2x 140 pkt, IF= 3.224). Łączny IF publikacji wynosi 14.220, a łączna liczba punktów według listy z 2019 roku MNiSW wynosi 480 punktów. Rozprawa doktorska przedstawiona do oceny, zawiera łącznie 126 stron, z czego 65 to tekst rozprawy opisujący wyniki zawarte w wymienionych wyżej pracach (wraz ze stroną tytułową, podziękowaniami, oświadczeniami promotora i autora pracy, streszczeniem w

języku polskim i angielskim, spisem treści oraz wykazem publikacji - razem 8 stron).

Tekst rozprawy opisujący wyniki badań, obejmuje Wstęp; Hipotezę badawczą; Cel i zakres pracy; Metodykę badań (w tym eksperymentalny odchów jesiotrów, pobieranie materiałów do badań, analizę histologiczną, analizę Real-time PCR oraz analizy statystyczne); Wyniki (w tym strukturę płci, ekspresje genów z eksperymentów pierwszego i drugiego oraz profile ekspresji genów związanych z różnicowaniem płci w badanych grupach); Podsumowanie; Wnioski oraz Bibliografię. Wymieniony powyżej tekst rozprawy jest streszczeniem opisanych w 3 pracach wyników, ich podsumowaniem, i powoduje, że rozprawa jest przejrzysta i łatwa w odbiorze, wzbogacona wykresami i stanowi niejako przewodnik po trzech opublikowanych w renomowanych periodykach pracach. Dalsze strony rozprawy doktorskiej, stanowią, kopie wymienionych powyżej trzech prac naukowych (od strony 67 do 113 strony) oraz oświadczenia współautorów określające udział każdego z nich w powstaniu tych prac.

Pokłosiem tych badań osadzonych w szerokim tle teoretycznym i metodycznym są ustalenia o dużym znaczeniu poznawczym i aplikacyjnym. Autorka ustaliła, że:

- fitoestrogeny wpływają na profil ekspresji genów związany z rozwojem i różnicowaniem się płci u jesiotrów, co może mieć negatywny wpływ na rozwój gonad,
- geny *dnrt1 i fox12* są kluczowymi genami dla rozwoju płci męskiej i żeńskiej u 180 i 365 dniowych jesiotrów, a ponadto gen *cyp19* odgrywa istotną rolę w dalszym etapie rozwoju płci żeńskiej,
- mózg jest głównym organem inicjującym różnicowanie płci u jesiotrów rosyjskich,

- żywienie jesiotrów paszą bogatą w fitoestrogeny wpływa na zmiany profilu ekspresji genów związanych z rozwojem i różnicowaniem się płci, zwłaszcza w tkance mózgowej już 180-dniowych jesiotrów, a badane fitoestrogeny mogą hamować molekularne szlaki ekspresji genów związanych z rozwojem płci w gonadach jesiotra,
- daidzeina, genisteina i kumestrol podobnie wpływały na zmianę ekspresji genów, związanych z rozwojem i różnicowaniem się płci u 365- dniowych jesiotrów,
- u 365-dniowych jesiotrów, szczególnie genisteina i kumestrol, najsilniej oddziaływały w tkance mózgowej, zmieniając profile ekspresji nadrzędnych genów, odpowiedzialnych za utrzymanie płci (takich jak *sox9* czy *fox12*),
- oraz że podawanie genisteiny i kumestrolu może powodować feminizację u osobników jesiotra rosyjskiego

  Ustalenia te oceniam wysoko z uwagi oryginalność tego istotnego, jak wspomniałem wcześniej, poznawczo i aplikacyjnie zagadnienia.

Nie znaczy to, że Doktorantka ustrzegła się przed pewnymi nieścisłościami, jakie przedłożona rozprawa zawiera, jak choćby numerowanie stron nie zawierających żadnego tekstu (2,4,6,8,10,12). Wskazanie tych nieścisłości wiąże się z obowiązkiem recenzenta i nie wpływa na moją ogólną wysoką ocenę rozprawy doktorskiej pani mgr Magdaleny Fajkowskiej. Biorąc pod uwagę:

- dobrze zaplanowane i poprawnie przeprowadzone, a nade wszystko oryginalne badania wnoszące nowe dane do nauki i praktyki i co ważne opublikowane w wiodących światowych periodykach naukowych o najwyższej punktacji według listy MNiSW
- prawidłowo dobrane i ocenione pod kątem wiarygodności oznaczeń nowoczesne i pracochłonne metody badawcze,

- dobrany przegląd piśmiennictwa przedmiotu należycie spożytkowany w napisanych pracach,

można stwierdzić, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska pani mgr Magdaleny Fajkowskiej w pełni odpowiada wymogom określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) stawianym rozprawom doktorskim i wnoszę wobec Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o przyjęcie i dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod rozwagę również opublikowanie wyników badań w najlepszych światowych periodykach naukowych wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej o wyróżnienie pracy.

Szczecin, 25.06.2021 rok.