Olsztyn, 20.09.2022 r.

Prof. dr hab. Bogdan Lewczuk
Katedra Histologii i Embriologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
UWM w Olsztynie

Opinia o pracy doktorskiej lek. wet. Kamili Martyniuk pt. „Metabolizm związków indolowych związanych z syntezą melatoniny w szyszynce indyka domowego w zależności od wieku ptaków oraz barwy i intensywności światła"

Pracę doktorską lek. wet. Kamili Martyniuk stanowi cykl dwóch artykułów oryginalnych opublikowanych w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* o aktualnym IF wynoszącym 6,2 i liczbie punktów MEiN równej 140:

- Martyniuk K.; Hanuszewska-Dominiak M., Lewczuk B. Metabolic profile of melatonin synthesis-related indoles changes during the post-embryonic development of the turkey pineal organ. International Journal of Molecular Sciences. 2022, 23, 10872; DOI:10.3390/ijms231810872 (IF 6.208).
- Martyniuk K.; Hanuszewska M.; Lewczuk B. Metabolism of melatonin synthesis-related indoles in the turkey pineal organ and its modification by monochromatic light. International Journal of Molecular Sciences. 2020, 21, 9750; DOI:10.3390/ijms21249750 (IF 4.556)

Lek. wet. Kamila Martyniuk odegrała wiodącą rolę w powstaniu obu publikacji, jako współtwórca koncepcji badań, główny wykonawca części eksperymentalnej oraz autor analizy i interpretacji wyników. Oba manuskrypty wraz z lustracjami zostały samodzielnie przygotowane przez Doktorantkę i po uwzględnieniu uwag współautorów przedłożone do oceny wydawniczej. Udział lek. wet. Kamili Martyniuk w w/w pracach wynosi odpowiednio 55 i 65 %

Celem badań było prześledzenie zmian zachodzących w zawartości indoli i aktywności enzymów biorących udział w syntezie MLT w szyszynce podczas rozwoju powylęgowego - od wyklucia piskląt do 45 tygodnia życia oraz poznanie wpływu światła monochromatycznego o różnej długości fali i intensywności na metabolizm tych związków.

Należy podkreślić, że przeprowadzone przez Doktorantkę doświadczenia na zwierzętach były bardzo pracochłonne i czasochłonne. Badania nad wpływem wieku na profil metaboliczny indoli w szyszynce obejmowały okres od 2 dnia do 45 tygodnia życia, w trakcie którego indyczki były utrzymywane w warunkach oświetlenia 12L:12D, ze światłem białym o natężeniu

20 lux podczas fazy jasnej, w zwierzętarni Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie. Szyszynki pobierano od zwierząt w wieku 2, 7, 14, 28 dni oraz 10, 20, 30 i 45 tygodni w odstępach 2-godzinnych (po 4 lub 5 w każdym punkcie czasowym) i zamrażano do badań biochemicznych. Z kolei, doświadczenie mające na celu określenie wpływu światła monochromatycznego o różnej barwie i intensywności metabolizm indoli szyszynki składało się z 3 części, wykonywanych jedna po drugiej i łącznie obejmowało 10 grup eksperymentalnych. Badania te przeprowadzono na indyczkach, które były odchowywane przez 3 tygodnie w warunkach cyklu 12L:12D w świetle białym podczas dnia, a następnie przebywały przez 7 dni w świetle zielonym, czerwonym i niebieski o natężeniu 16, 32 oraz 64 lux podczas dnia. Ptaki poddano eutanazji w odstępach 4 godzinnych.

W pracy po raz pierwszy oznaczono w tej samej szyszynce zawartość 11 indoli oraz aktywność wszystkich 4 enzymów szlaku syntezy melatoniny (MLT). Oznaczenia zawartości indoli w szyszynkach wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z rozdziałem w gradiencie stężeń z detekcją fluorescencyjną (HPLC). Aktywności enzymów szlaku syntezy MLT badano inkubując homogenat szyszynki z odpowiednimi substratami w warunkach optymalnych dla przebiegu reakcji i oznaczając wytworzony produkt metodą HPLC. Wyniki badań poddano dwuczynnikowej analizie wariancji z testem Duncana.

Praca po raz pierwszy charakteryzuje zmiany zachodzące w metabolizmie indoli w szyszynce podczas rozwoju post-embrionalnego. Uzyskane wyniki pozwoliły na wyróżnienie 4 etapów w rozwoju przemian metabolicznych indoli związanych z syntezą MLT w szyszynce indyka. Pierwszy etap, od wyklucia do wieku 2 tygodni, charakteryzował się spadkiem stężenia (wyrażonym w ilości substancji na zawartość białka w homogenacie szyszynki) 5-hydroksytryptofanu (5-HTRP) oraz wzrostem stężenia serotoniny (5-HT), MLT, kwasu 5-metoksyindolooctowego (5-MIAA) i 5-metoksytryptaminy (5-MTAM). W drugim etapie, około 28 dnia życia, stężenia N-acetyloserotoniny (NAS) i MLT osiągnęły maksimum. Synteza i degradacja 5-HT również były na najwyższym poziomie. Trzeci etap, około 10. tygodnia życia, charakteryzował się obniżonym poziomem 5-HT (o około 50%) i kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA) oraz wysokim poziomem 5-MTAM. Ostatni etap, obejmujący wiek od 20 do 45 tygodni, charakteryzował się dużym spadkiem syntezy, zawartości i degradacji 5-HT. Pomimo tych zmian nie było wyraźnych różnic w nocnych poziomach NAS i MLT między trzecim a czwartym etapem. Należy zaznaczyć, że całkowita zawartość MLT w szyszynce zwiększała się, z różną intensywności przez cały okres rozwoju. Uzyskane dane pokazują, że za tym prostym obrazem zmian w poziomie syntezy MLT, kryją się bardzo duże i złożone zmiany w metabolizmie indoli. Przeprowadzone badania wykazały

ponadto, że stężenia wszystkich pochodnych tryptofanu (TRP) wykazywały wahania dobowe aż do 45. tygodnia życia.

Badania dotyczące wpływu barwy i natężenia światła, oprócz znaczenia poznawczego, mają również aspekt praktyczny, bowiem liczne prace mówią o zależności pomiędzy barwą światła a wynikami produkcyjnymi i zdrowiem zwierząt na fermach drobiu. Doktorantka wykazała, że światło monochromatyczne istotnie modyfikuje metabolizm indoli w szyszynce indyka domowego, a jego wpływ był zależny od jego barwy i intensywności. Wydatne zmiany dotyczyły przebiegu dobowego rytmu aktywności AA-NAT i w konsekwencji syntezy MLT. Różnice w warunkach oświetlenia wpłynęły na: (i) spadek aktywności AA-NAT podczas fazy jasnej wraz najniższy odnotowany poziomem aktywności tego enzymu, (ii) wzrost aktywności AA-NAT po rozpoczęciu fazy ciemnej oraz (iii) czas wystąpienia piku aktywności i osiągniętą w tym punkcie czasowym wartość maksymalną. Spadek aktywności AA-NAT po rozpoczęciu fazy jasnej był znacznie większy u indyków utrzymywanych w świetle niebieskim w porównaniu ze światłem zielonym i czerwonym. Ponadto, hamujące działanie światła wzrastało wraz z intensywnością oświetlenia, niezależnie od barwy światła. Wzrost aktywności AA-NAT po rozpoczęciu fazy jasnej był wolniejszy u zwierząt eksponowanych na działanie światła niebieskiego niż u indyków utrzymywanych w oświetleniu czerwonym i zielonym o tych samym natężeniu. Nocny pik aktywności AA-NAT wystąpił o godzinie 02:00 u indyków utrzymywanych w świetle czerwonym i niebieskim o natężeniu 32 i 64 lux, a o godz. 06:00 u ptaków przebywających w świetle zielonym i niebieskim o natężeniu 16 lux. Najwyższą aktywność AA-NAT podczas nocy stwierdzono u indyków utrzymanych w świetle czerwonym. Światło czerwone znacząco wpłynęło na aktywność enzymów biorących udział w syntezie 5-HT, zwiększając aktywność TPH i AADC. Miało to swoje odzwierciedlenie w zawartości 5-HT, która podczas dnia i na początku nocy była około 2 razy wyższa u indyków utrzymywanych w czerwonym świetle niż w innych grupach zwierząt, jak również w zawartości 5-HIAA, 5-HTOL, 5-MIAA i 5-MTOL. Należy podkreślić, że dobowy rytm syntezy MLT występował we wszystkich grupach ptaków, nawet u zwierząt przebywających podczas dnia w świetle czerwonym o natężeniu 16 lux.

W mojej opinii praca doktorska lek. wet. Kamili Martyniuk jest przygotowana poprawnie, w oparciu o prawidłowo zaplanowane i przeprowadzone doświadczenia, a uzyskane dane istotne powiększają aktualny stan wiedzy o rozwoju szyszynki. Praca jest w pełni oryginalna i nie narusza praw osób trzecich.

prof. dr hab. Bogdan Lewczuk