UNIWERSYTET WARSZAWSKI

Wydział Biologii
Instytut Biologii Funkcjonalnej i Ekologii

Warszawa, 23 listopada 2022 r.

dr hab. Paweł Majewski
Zakład Fizjologii Zwierząt,
ul. Miecznikowa 1, 02-093 Warszawa
tel. 22 5541025, pm.majewski@uw.edu.pl

Recenzja rozprawy 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"

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Bogdana Lewczuka oraz promotorki pomocniczej Pani dr n. wet. Magdaleny Prusik w Katedrze Histologii i Embriologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego.

Cel pracy dotyczył określenia dobowych zmian aktywności enzymów biorących udział w biosyntezie melatoniny, zmian zawartości indoli szyszynkowych oraz wpływu barwy światła i jego intensywności na te parametry w szyszynkach indyka domowego. Badania skupione były na pozyskaniu szyszynek i eksperymentalnym pomiarze aktywności w homogenatach szyszynkowych czterech enzymów szlaków biosyntezy melatoniny: hydroksylazy tryptofanowej, dekarboksylazy aromatycznych aminokwasów, N-acetylotransferazy aryloalkiloaminowej oraz O-metylotransferazy N-acetylserotoniny. Wspomniane homogenaty posłużyły również do określenia okołodobowych zmian poziomu prekursora indoli szyszynkowych tryptofanu i jedenastu jego metabolitów, indoli, których synteza zależy głównie od poziomu aktywności wymienionych enzymów oraz dostępności dla nich kolejnych substratów. Prześledzono wspomniane powyżej parametry w dwunastu punktach doby u zwierząt w ośmiu punktach ich rozwoju postembrionalnego, poczynając od piskląt 2 dniowych, a kończąc na dorosłych indykach w wieku 45 tygodni. Dokładne opisanie wymienionych parametrów pozwoliło wybrać wiek ptaków, najbardziej odpowiedni do badań zmierzających do określenia wpływu światła o różnej barwie i intensywności na wspomniane parametry. Badania te wykonano na 21 dniowych indykach pobierając od nich szyszynki w sześciu punktach doby z aż dziewięciu grup eksperymentalnych różniących się oświetleniem nie licząc stosownych grup kontrolnych.

Elementy zegara biologicznego u różnych gatunków ptaków, takich jak szyszynka czy siatkówka oka, mają różny udział w biosyntezie melatoniny uwalnianej do krwioobiegu, a szyszynka u tej gromady kręgowców wykazuje różnice w budowie anatomicznej, histologicznej, dominacji produkcji

poszczególnych związków indolowych, czy regulacji uwalniania melatoniny, na co zwraca uwagę w rozprawie Doktorantka. Biorąc pod uwagę wymienione różnice oraz duży wkład badań prowadzonych na ptakach w wiedzę dotyczącą procesu regulacji biosyntezy melatoniny szyszynkowej oraz funkcjonowania zegara biologicznego, istnieje potrzeba ich kontynuacji, między innymi podczas rozwoju postembrionalnego przedstawicieli tej gromady kręgowców. Tematyka przedstawionej do oceny pracy doktorskiej doskonale wpisuje się we wspomniany kierunek badań i skupia się na interesującym problemie naukowym. W kontekście badań obecnie prowadzonych przez inne zespoły badawcze, na innych gatunkach zwierząt, przedstawiona do recenzji praca prezentuje naukowo bardzo wysoki poziom, podejmuje aktualne zagadnienia i znacznie rozszerza wiedzę dotyczącą postembrionalnych zmian aktywności enzymów szlaku biosyntezy melatoniny, poziomu indoli szyszynkowych i wpływu na nie światła monochromatycznego. Ważnym jest również to, że kolejne badania przeprowadzone w zespole prof. Bogdana Lewczuka, dają możliwości ponownej interpretacji danych już istniejących.

Rozprawa doktorska jest omówieniem dwóch publikacji, które są spójne tematycznie i zostały opublikowane w czasopiśmie z dziedziny nauk biologicznych tzn. *International Journal of Molecular Science*. Kopie tych artykułów zostały dołączone do rozprawy. Czasopismo to uważane jest przez środowisko naukowe za bardzo dobre, w punktacji Ministerstwa Edukacji i Nauki ma 100 punktów, a jego pięcioletni współczynnik przebicia *Impact Factor* wynosi 5,7. Publikacje w tym czasopiśmie świadczą o wysokim poziomie przeprowadzonych badań. Z oświadczeń współautorów tych publikacji wynika, że doktorantka w dużej mierze opracowała koncepcję opublikowanych badań, wykonała większość oznaczeń, analiz otrzymanych wyników oraz przygotowała publikacje, które były dyskutowane ze współautorką i podlegały korekcie ze strony promotora. Świadczy to o dużej dojrzałości naukowej doktorantki. W rozprawie poza omówieniem publikacji, przedstawiono streszczenie osiągnięcia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów oraz wspomniane oświadczenia współautorów artykułów. Omówienie publikacji zawiera według ogólnie przyjętego układu wstęp, przedstawienie głównego i szczegółowych celów badań, materiałów i metod, wyników, dyskusję, wnioski oraz piśmiennictwo. Należy zauważyć, że omówienie publikacji jest bardzo dokładne i zrozumiałe, choć opisanie bardzo dużej liczby wyników, porównywanie ich ze sobą, czy odnajdywanie zależności między nimi nie jest łatwe. Należy stwierdzić, że doktorantka doskonale poradziła sobie z tym niełatwym zadaniem. Nie mam więc w stosunku do formy przedstawienia rozprawy żadnych zastrzeżeń i nie znajduję poważniejszych niedoskonałości.

Dyplomantka wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z przeprowadzonymi badaniami, przedstawia między innymi: właściwości szyszynki ptaków i ssaków, wpływ wieku na poziom biosyntezy melatoniny u badanych pod tym względem gatunków ptaków oraz wpływ barwy światła na ich zachowanie , tempo wzrostu, aktywność lokomotoryczną, poziom stresu, odpowiedz odpornościową, parametry metaboliczne czy transkrypcję genów zegarowych. Spory udział w tym wprowadzeniu ma przedstawienie wiedzy dotyczącej budowy histologicznej i ultrastruktury szyszynki indyka, która zdaniem doktorantki jest już bardzo dobrze scharakteryzowana. Nie sposób się z tym nie zgodzić, gdyż

w dyskusji rozprawy duża część z tej wiedzy pomogła w określeniu zależności, które zaobserwowała w swoich badanych. W rozprawie scharakteryzowano szlak biosyntezy melatoniny oraz 5-hydroksy i 5 metoksyindoli w szyszynce, co jest niezbędne w zrozumieniu opisywanych zależności. W pracy odnaleźć można uzasadnienie podjęcia badań na szyszynkach indyków, wskazujące na to, że: niewiele przeprowadzonych badań na ptakach dotyczy zmian biosyntezy melatoniny związanych z wiekiem, a badania przeprowadzone na indykach obejmują jedynie krótkie okresy ich życia i nie charakteryzują zmian w metabolizmie indoli szyszynkowych po ich wylęgu. Z kolei, uzasadnieniem podjęcia zagadnień związanych z wpływem światła jest stwierdzenie, że z przeprowadzone dotychczas badań na ptakach wynika, że szyszynkę indyków charakteryzuje największy wpływ bezpośredniej fotorecepcji na sekrecję melatoniny, a barwa i intensywność światła w hodowli tych ptaków może być istotna z punktu widzenia zdrowotności i wydajności produkcji na fermach indyczych. Autorka zwraca również uwagę na to, że w dotychczasowych badaniach poziomu indoli szyszynkowych u kur, kaczek i gęsi nie określano wpływu wieku oraz intensywności i barwy światła na profil metaboliczny indoli szyszynkowych oraz aktywność enzymów biorących udział w biosyntezie melatoniny. Stwierdzenia te, w kontekście przedstawionych danych literaturowych i mojej wiedzy dotyczącej tych zagadnień, w pełni uzasadniają podjęcie badań przedstawionych w rozprawie.

W omówieniu publikacji stanowiących rozprawę doktorską zostały przybliżone dwa zastosowane układy eksperymentalne, ze zwróceniem szczegółowej uwagi na procedury analityczne, wykorzystane odczynniki i zastosowaną analizę statystyczną wyników. W podrozdziale tym znalazły się graficzne schematy doświadczeń i grup zwierząt poddanych działaniu różnych barw i intensywności światła. Zabieg ten znacznie ułatwia zrozumienie zastosowanych procedur badawczych. Należy stwierdzić, że analizy aktywności badanych enzymów poprzez pomiar indolowych produktów ich aktywności oraz poziomu indoli w homogenatach szyszynkowych wykonane zostały metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną. Według mojej wiedzy jest to najlepsza i najbardziej miarodajna z pośród dostępnych metod. Tak więc, poprawność i oryginalność metodyczną stawianego problemu badawczego oceniam wysoko, a układ doświadczalny, według mojej oceny, jest adekwatny do postawionych celów badawczych.

W wyniku przeprowadzenia doświadczeń Doktorantka otrzymała bardzo wiele interesujących danych. Do najcenniejszych zaliczam te, które zostały przeprowadzone w układzie zależnym od wieku zwierząt, czyli określenie aktywności wszystkich enzymów biorących udział w biosyntezie melatoniny, podczas całej doby i poziomu indoli w szyszynkach. Dzięki tym danym można wskazać podobieństwa jak i różnice dotyczące opisywanych parametrów u przebadanych pod tym względem innych gatunków ptaków. Niestety badania te trudno jest ze sobą zestawiać, gdyż podobne analizy wykonane zostały jedynie na 2 tygodniowych kurach i 14 tygodniowych kaczkach i gęsiach. Nie mniej jednak, można na tej podstawie przedstawić kilka ciekawych zależności, które podkreśla w swojej pracy Doktorantka. Na przykład, uzyskane dane wskazują na to, że różnice międzygatunkowe dobowych zmian poziomu indoli szyszynkowych są znacznie większe niż zmiany zachodzące podczas rozwoju osobniczego indyków. Z kolei, poziom tryptofanu pobieranego przez komórki szyszynki z krwi nie wykazuje dobowych różnic

u badanych pod tym względem ptaków, choć zmienia się zależnie od ich wieku. Nocny wzrost poziomu 5-hydroksytryptofanu, którego prekursorem jest tryptofan, u indyków jest niższy niż u kur, a jest zbliżony do występującego u kaczek i gęsi. Szyszynki gęsi i kaczek, charakteryzują się wysoką względną zawartością serotoniny, kolejnej aminy na szlaku biosyntezy melatoniny. Poziom serotoniny wykazuje również duży spadek w szyszynkach w drugiej części fazy ciemnej u indyków, gęsi i kaczek, podczas gdy u kur pojawił się w tym czasie jej wzrost. Różnice między najwyższym i najniższym poziomem N-acetyloserotoniny, bezpośredniego prekursora melatoniny i jej samej w ciągu doby są większe u indyków niż u kaczek i gęsi, ale mniejsze niż u kur. Z kolei, dobowe zmiany 5-hydroksy-5 metoksyindoli odpowiadają zmianom w poziomie ich prekursora serotoniny u wszystkich badanych gatunków. Istnieją jednak wyraźne różnice międzygatunkowe zmian dobowych zawartości końcowych metabolitów tych przemian. Wyniki uzyskane przez doktorantkę i dane literaturowe można analizować również pod względem procentowego udziału poszczególnych indoli, czy przedstawiania różnych współczynników. Zabiegi takie zostały wykonane przez doktorankę i przedstawione w dyskusji rozprawy. I tak, warto zwrócić uwagę na to, że najwyższy udział procentowy serotoniny występuje w szyszynce gęsi, niższy u kaczki i indyka a najniższy u kur. W pracy wykonano jednoczesny pomiar aktywności enzymów i zawartości indoli, który umożliwił analizę mechanizmów odpowiedzialnych za zmiany dobowe w metabolizmie tych związków. Autorka słusznie zwraca uwagę na to, że pomiary aktywności enzymów w homogenacie szyszynki może nie odzwierciedlać ich rzeczywistej aktywności w żywych komórkach. Wyraźne dobowe zmiany aktywności w szyszynce indyków wykazywały dwa enzymy pierwszy i przedostatni na szlaku biosyntezy melatoniny. Z przeprowadzonych badań wynika, że nocny wzrost aktywności pierwszego z nich dostarcza odpowiednią ilości substratu do intensywnej syntezy prekursora melatoniny podczas nocy, z kolei aktywność drugiego wykazuje bardzo duże wahania dobowe, które mają swoje odzwierciedlenie w zawartości prawie wszystkich metabolitów tryptofanu. Należy również zwrócić uwagę na to, że zmiany aktywności przedostatniego enzymu na szlaku biosyntezy melatoniny miały swoje bezpośrednie odzwierciedlenie w poziomach melatoniny i jej prekursora. Uzyskane, wyniki wskazują również na to, że aktywność ostatniego enzymu na szlaku biosyntezy melatoniny, zapewnia szybką konwersję jego substratu do melatoniny, a enzym ten nie ma lub ma bardzo słaby wpływ na syntezę tego hormonu. Wpływa on jednak limitująco na zależne od niego tworzenie 5-hydroksy- i 5 metoksyindoli. Badania dotyczące rodzaju i intensywności światła przeprowadzono na 21-dniowych indykach. Do najważniejszych obserwacji zaliczam to, że ogólnie światło monochromatyczne modyfikuje metabolizm indoli w szyszynce indyka. Ponadto, stwierdzono duży wpływ czerwonego światła na aktywność enzymów biorących udział w biosyntezie melatoniny, poza ostatnim z nich i dobowego poziomu serotoniny. Należy zwrócić uwagę również na występujące różnice w przebiegu dobowego rytmu aktywności przedostatniego enzymu na szlaku biosyntezy melatoniny i jej samej i tak różne warunki świetlne wpływają na spadek aktywności enzymu podczas fazy jasnej, najniższą jego aktywność w tej fazie, wzrost aktywności po rozpoczęciu fazy ciemnej oraz czas wystąpienia maksymalnej aktywności. Z analizy przedstawionego powyżej opisu, wynika również to, że światło czerwone znacząco wpływa na aktywność dwóch pierwszych enzymów na szlaku

biosyntezy melatoniny. Co ciekawe, czerwone światło nie ma wpływu na poziom pierwszego produktu przemian tego szlaku, a zjawisko to można wytłumaczyć szybką jego przemianą w kolejną aminę na tym szlaku. Wszystkie różnice zostały szczegółowo przedstawione w rozprawie, wraz ze stosownymi analizami i porównaniami. Mój opis przedstawia więc ich skromną część. W rozprawie doktorskiej oraz wchodzące w jej skład publikacjach, doktorantka w wybranym układzie eksperymentalnym z wieloma zmiennymi, dostarcza dużą liczbę interesujących wyników. Ponadto wykazała się bardzo dobrą znajomością literatury związanej z podejmowaną problematyką badawczą i dojrzale dyskutuje otrzymane wyniki z dostępnymi danymi literaturowymi. Z tego względu, przeprowadzone badania mają dużą wartość naukową.

Podsumowując, stwierdzam, że przeprowadzone przez doktorantkę badania znacząco wzbogacają wiedzę dotyczącą metabolizmu indoli szyszynkowych u ptaków. Wyczerpująco przedstawiają zmiany aktywności biosyntetycznej szyszynki u indyka domowego, w trakcie rozwoju postembrionalnego i to co wydaje mi się najważniejsze, wykazują że zmiany w metabolizmie indoli w szyszynce mają miejsce podczas wielu tygodni życia tych zwierząt. Potwierdzają również występowanie znacznych różnic pomiędzy szyszynkami różnych gatunków ptaków i uzmysławiają konieczność dalszego prowadzenia tego typu badań. Pragnę podkreślić, że lektura rozprawy była dla mnie bardzo interesująca, a w swojej recenzji nie byłem w stanie docenić w zwięzły sposób wszystkich ważnych wyników i wniosków z przeprowadzonych badań. Ciekaw jestem w jaki sposób Dyplomantka przedstawi otrzymane przez nią wyniki i płynące z nich wnioski, tak aby wskazać najistotniejsze z nich, w jak najbardziej atrakcyjnej formie. Uważam, że od tej formy zależeć będą rodzące się w trakcie prezentacji pytania i komentarze, zakładam, że również moje.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani 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 " spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce" (Dz.U. z 2021 r. poz/478 z pózn. Zm), składam więc na ręce przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego Pana prof. dr hab. Krzysztofa Wąsowicza wniosek o dopuszczenie Pani lek. wet. Kamili Martyniuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoką wartość poznawczą przeprowadzonych badań, które zostały opublikowane w uznanych czasopismach naukowych, wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego o wyróżnienie rozprawy.