Rzeszów, 20.11.2022

Prof. dr hab. Marek Koziorowski, dr h.c.
Instytut Biologii i Biotechnologii
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Rzeszowski

OCENA

rozprawy doktorskiej

lek. wet. Kamilli Martyniuk

pt. Metabolizm związków indolowych związanych z syntezą melatoniny w szyszynce indyka domowego w zależności od wieku ptaków oraz barwy i intensywności światła

Recenzja została wykonana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 30.09.2022 r.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska wykonana została w Katedrze Histologii i Embriologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod opieką naukową Promotora prof. dr. hab. Bogdana Lewczuka i Promotora pomocniczego dr Magdaleny Prusik.

Na rozprawę doktorską składają się dwie oryginalne prace, opublikowane w latach 2020 i 2022 w czasopismach z listy JCR, których łączny współczynnik oddziaływania Impact Factor wynosi 11,364. Poniżej wyszczególniono publikacje Doktorantki, wchodzące w skład dorobku naukowego przedłożonego w ramach ubiegania się o stopień doktora nauk weterynaryjnych:

1. 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),

2. Martyniuk K.; Hanuszewska-Dominiak M.; Lewczuk B. C**hanges in the metabolic profile of melatonin synthesis-related indoles during post-embryonic development of the turkey pineal organ.** International Journal of Molecular Sciences. 2022, 23, 10872; DOI:10.3390/ijms231810872 (IF 6.208).

Do oceny dołączony został manuskrypt napisany w języku polskim stanowiący kompendium uzyskanych wyników przedstawionych w pracach oryginalnych.

Indywidualny wkład Doktorantki w powstanie zaprezentowanych oryginalnych prac potwierdzony przez współautorów należy uznać za wystarczający do przedłożenia ich Dostojnej Radzie Naukowej w celu procedowania dalszego postępowania. Doktorantka uczestniczyła między innymi w planowaniu eksperymentów, pobieraniu materiału do badań, przeprowadzaniu analiz i opracowaniu wyników (oświadczenia PT Współautorów w załączeniu). W obu przedstawionych do oceny pracach wkład Doktorantki przekraczał 50 % (65 i 55% odpowiednio).

Tematyka załączonych publikacji dotyczy zagadnień związanych z charakterystyką profilu metabolicznego indoli szlaku syntezy melatoniny (MLT) u indyka domowego, prześledzeniem zmian w zawartości indoli i aktywności enzymów biorących udział w syntezie melatoniny podczas rozwoju powylęgowego - od wyklucia piskląt do 45. tygodnia życia oraz określeniem wpływu światła o różnej długości i intensywności fali na metabolizm tych związków.

Przedstawiony do oceny manuskrypt, bez załączonych kserokopii oryginalnych prac i oświadczeń współautorów liczy 66 stron. Zawiera następujące rozdziały: Streszczenie, Abstract, Wykaz skrótów, Omówienie publikacji stanowiących rozprawę doktorską, w skład którego wchodzą: Wstęp, Cel badań, Materiały i metody, Zwierzęta doświadczalne, Przebieg doświadczeń. Kolejnymi rozdziałami są: Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo oraz Artykuły wraz z oświadczeniami autorów. Manuskrypt napisany jest poprawnym językiem z zachowaniem wymagań przewidzianych dla opracowań naukowych.

Poza wartościami poznawczymi, gdzie Doktorantka wykonała „tytaniczną" pracę analizując w tym samym materiale biologiczną aktywność praktycznie wszystkich substratów i enzymów biorących udział w szlaku metabolicznym syntezy melatoniny. Wobec coraz większej ilości osób na świecie dotkniętych insomnią melatonina jest z wyboru stosowanym środkiem terapeutycznym. Wszystko to składa się na bardzo wysoką ocenę wyboru tematyki,

użytych nowoczesnych metod analitycznych i celowości badań. Należy wspomnieć, że Katedra Histologii i Embriologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Olsztynie zaliczana jest w Polsce i Europie do wiodących jednostek w zakresie badań nad biologią szyszynki, którą obecnie kieruje Pan Profesor Bogdan Lewczuk.

Oryginalne prace, w których zawarte są wyniki badań Doktorantki i współpracowników zostały opublikowane w czasopismach liczących się na arenie światowej nauki. Przed przyjęciem do druku poddane zostały wnikliwej analizie przez recenzentów, uznanych w świecie specjalistów w zakresie badań nad szyszynką. Dużą niezgrabnością byłoby ponowne ocenienie przez recenzenta opublikowanych prac w wysoko impaktowych czasopismach. Powołany na recenzenta pracy doktorskiej pozwolę sobie ocenić zaprezentowany autoreferat zgodnie z wymaganiami dla postępowań o uzyskanie stopnia doktora.

Na bazie wcześniej opublikowanych wyników i wiedzy własnej zaprezentowanej w szeroko opracowanym wstępie Doktorantka postawiła sobie za cel poznanie wpływu wieku indyków, barwy i intensywności światła na metabolizm indoli w szyszynce indyka poprzez:

1. Scharakteryzowanie profilu metabolicznego indoli szlaku syntezy melatoniny u indyka domowego oraz poznanie zmian w koncentracji indoli i aktywności enzymów szlaku syntezy melatoniny zachodzących w trakcie rozwoju osobniczego w różnych okresach życia, jak i określenia zmian dobowych w metabolizmie indoli w szyszynce w okresie od 2. dnia do 45. tygodnia życia oraz modyfikacji, jakim podlegają w tym czasie;
2. Określenie wpływu światła monochromatycznego czerwonego, niebieskiego i zielonego o różnych intensywnościach na zawartości związków indolowych oraz aktywności enzymów szlaku syntezy melatoniny;

W prezentowanych wynikach doświadczeń *in vivo* modelem badawczym były szyszynki samic indyka domowego linii Hybrid XL.

Znajomość fizjologii indyka domowego jest istotna ze względu na duże znaczenie tego gatunku w produkcji mięsa, jak i niezwykle istotne walory dietetyczne. Światło – zarówno jego barwa, jak i intensywność są istotnymi czynnikami poprzez oddziaływanie melatoniny, która determinuje zdrowotność oraz wydajność produkcyjną zarówno w zakresie przyrostu masy ciała, jak i nieśności u ptaków i wydajność produkcyjną w fermach indyczych. Melatonina ma istotny związek z oddziaływaniem światła na produktywność indyków oraz nieśność u ptaków. Dodatkowo w dostępnym piśmiennictwie nie ma zbyt wiele danych na temat syntezy melatoniny u indyków, które stają się coraz bardziej pożądanych produktem żywnościowym o dużej zawartości białka zwierzęcego. Doktorantka przebadała cały szlak syntezy melatoniny

w różnym wieku indyków przy różnej stymulacji świetlnej poddając analizie zawartość 11 indoli: tryptofanu (TRP), 5-hydroksytryptofanu (5-HTRP), serotoniny (5-HT), N-acetyloserotoniny (NAS), melatoniny (MLT), kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA), 5-hydroksytryptofolu (5-HTOL), kwasu 5-metoksyindolooctowego (5-MIAA), 5-metoksytryptofolu (5-MTOL), 5-metoksytryptaminy (5-MTAM), 5-metoksytryptofanu (5-MTRP) oraz aktywność czterech enzymów szlaku syntezy melatoniny - hydroksylazy tryptofanowej (TPH), dekarboksylazy aromatycznych aminokwasów (AADC), N-acetylotransferazy aryloalkyloaminowej (AA-NAT), O-metylotransferazy N-acetyloserotoniny (ASMT).

W nawiązaniu do założeń określonych w celu Doktorantka przeprowadziła badania, które miały potwierdzić lub zaprzeczyć słuszność prezentowanej hipotezy. W trakcie ich przeprowadzania Autorka zastosowała nowoczesną metodę analityczną - wysokosprawną chromatografię cieczowa (HPLC) z rozdziałem w gradiencie stężeń i detekcją fluorescencyjną dla oznaczenia zwartości indoli w szyszynce, oraz enzymów szlaku syntezy melatoniny. W zakresie oznaczania aktywności enzymów mierzono ilości produktu wytworzonego w trakcie inkubacji tkanek szyszynki w obecności substratów. Do badań użyto odczynników najwyższej jakości i czystości, co pozwoliło na osiągnięcie wiarygodnych wyników.

Użycie takich metod analitycznych, odpowiednio pobrany materiał badawczy przy jasno określonym w pełni zrealizowanym celu badań oraz dogłębna analiza uzyskanych wyników zaskutkowały przyjęciem prac do druku w wysoko impaktowych czasopismach.

Zależność pomiędzy wiekiem, a zawartością związków indolowych oraz aktywnością enzymów analizowano dwuczynnikową analizą wariancji z wiekiem ptaków i czasem pobrania narządów jako czynnikami. Również wpływ światła monochromatycznego na zawartość związków indolowych oraz aktywność enzymów szklaku syntezy melatoniny były analizowane za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji, w której czynnikami były warunki oświetlenia oraz czas pobrania próbek. Do analizy post-hoc w obu doświadczeniach Doktorantka wykorzystała test Duncana. Analizy przeprowadziła za pomocą programu *Statistica* 13.1 (StatSoft Polska). Za statystycznie istotne uznano różnice przy wartości poziomu istotności $P < 0,05$.

Uzyskane wyniki upoważniły Doktorantkę do przedstawienia następujących konkluzji: Profil metabolizmu indolu szyszynki u 4-tygodniowych indyków charakteryzuje się rytmami o wysokiej amplitudzie aktywności N-acetylotransferazy aryloalkyloaminowej AA-NAT oraz zawartością N-acetyloserotoniny (NAS) i melatoniny (MLT), równymi względnymi ilościami serotoniny (5-HT) i kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA), oraz wyższą zawartością

melatoniny (MLT) niż N-acetyloserotoniny (NAS). Profil ten jest istotnie różny od profilu metabolicznego u kurcząt, gęsi i kaczek, co potwierdza pogląd, że metabolizm indoli szyszynki wykazuje ważne cechy specyficzne dla gatunku.

Autorka stwierdza na podstawie uzyskanych wyników, iż można wyróżnić cztery fazy zmian zachodzących w szyszynce w okresie od wyklucia do osiągnięcia dojrzałości somatycznej i przez następne 15 tygodni (aż do 45 tygodnia życia). Pierwsza faza to okres od wyklucia do 14 dnia życia, w którym występują duże zmiany w koncentracji badanych związków, między innymi spadek koncentracji 5-hydroksytryptofanu (5-HTRP) przy wzroście koncentracji serotoniny (5-HT), melatoniny (MLT), kwasu 5-metoksyindolooctowego (5-MIAA) i 5-metoksytryptaminy (5-MTAM). Analiza aktywności enzymów szlaku syntezy melatoniny oraz zawartości indoli wskazuje, iż wzrost koncentracji serotoniny jest efektem zwiększonej syntezy tego związku, jak i zmniejszonej jej degradacji w procesie oksydatywnej deaminacji.

Analizując drugą fazę (indyki 28 dniowe) Doktorantka wykazała maksymalne stężenie aktywności enzymatycznej N-acetylotransferazy aryloalkyloaminowej (AA-NAT), N-acetyloserotoniny (NAS) oraz melatoniny (MLT) oznaczone w trakcie doświadczenia.

Badania w trzeciej fazie zmian przeprowadzono u indyków 10 tygodniowych. Zaobserwowano istotny spadek koncentracji serotoniny (5-HT) i kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA) w porównaniu do ptaków 28-dniowych. Koncentracja 5-metoksytryptaminy (5-MTAM) osiągnęła najwyższy poziom w całym doświadczeniu, podobnie jak aktywność O-metylotransferazy N-acetyloserotoniny (ASMT).

Po osiągnięciu aktywności somatycznej (faza czwarta) profil mataboliczny wykazał niewielkie zmiany. Zdaniem Autorki najbardziej charakterystyczną cechą tej fazy jest zmniejszona synteza, zawartość i rozkład serotoniny (5-HT) w porównaniu do poprzednich etapów. Spadek ten występował od 20 do 45 tygodnia życia.

Podsumowując, uzyskane wyniki istotnie wzbogacają wiedzę w zakresie nauk endokrynologicznych. Pozwalają na poznanie zmian całkowitej zawartości melatoniny w szyszynce. Zawartość melatoniny (MLT) podczas nocnego piku wzrasta wraz z wiekiem zwierząt aż do 45 tygodnia życia, najbardziej intensywnie pomiędzy 2 i 7 dniem oraz 2 i 10 tygodniem. Maksymalny poziom osiągnęła w 40 tygodniu, aczkolwiek ten wzrost nie był tak istotny. Zawartość serotoniny (5-HT) w szyszynkach wzrastała do 28 dnia, a następnie miała tendencję spadkową.

W kolejnym doświadczeniu Autorka przedstawiła wpływ światła monochromatycznego czerwonego (620 – 626 nm), niebieskiego (450 – 460 nm) i zielonego (520 – 530 nm) na

metabolizm związków indolowych związanych z syntezą melatoniny. Uzyskane wyniki wykazały dobowe zmiany zawartości indoli w szyszynce niezależnie od natężenia światła. Autorka sugeruje w dyskusji, że odbiór bodźców świetlnych w mechanizmach regulacji rytmów biologicznych, przy udziale światłoczułych barwników melanopsyny i pinopsyny jest efektem bardzo wysokiej ich wrażliwości na światło niebieskie. Obydwa barwniki światłoczułe wykazują bardzo niską wrażliwość na światło czerwone i w eksperymentach chronobiologicznych światło czerwone uważane jest za „światło nocy". Wyraźne zmiany w syntezie melatoniny w rytmie dobowym były efektem zmian dobowego rytmu aktywności N-acetylotransferazy aryloalkyloaminowej AA-NAT. Autorka wykazała, iż czerwone oświetlenie o natężeniu 16 luksów podczas fazy jasnej jest wystarczające do zachowania wysokiej amplitudy rytmu dobowego syntezy melatoniny (MLT) u indyków. Światło czerwone znacząco wpłynęło na aktywność enzymów biorących udział w syntezie serotoniny (5-HT), poprzez zwiększenie aktywności hydroksylazy tryptofanowej (TPH) i dekarboksylazy aromatycznych aminokwasów (AADC). Podsumowując Autorka sugeruje, iż światło monochromatyczne powodowało istotną zmianę metabolizmu indoli w szyszynce indyka domowego, w sposób zależny od barwy i intensywności.

Reasumując Autorka w autoreferacie, ja i w opublikowanych pracach po raz pierwszy zaprezentowała wyniki badań, w których na tym samym materiale biologicznym – szyszynka indyka – wykazała cykl zmian w zależności od wieku oraz wpływ światła monochromatycznego na szlak melatoninowy. Taki układ metodyki pozwala w jednoznaczny sposób stwierdzić interakcje pomiędzy poszczególnymi indolami i enzymami sterującymi syntezą melatoniny. Czyni to ten cykl doświadczeń niezwykle wartościowym i wiele wnoszącym do nauki nie tyko w zakresie podstawowym, ale i aplikacyjnym. Na szczególne uznanie zasługuje fakt, że pomimo określania współzależności pomiędzy 11 indolami i 4 enzymami uzyskane wyniki po analizie wariancji w treści przedstawione zostały w sposób niezwykle czytelny i zrozumiały.

Zdaniem recenzenta przedstawione do oceny opracowanie wraz z załączonymi oryginalnymi opublikowanymi pracami stanowią cenny wkład do światowej nauki i poznania mechanizmów włączonych w szeroko pojętą regulację syntezy melatoniny w różnym wieku indyków i różnych warunkach oświetlenia.

W ocenianym opracowaniu oraz załączonych pracach Doktorantka wykazała się bardzo dobrym opanowaniem szeroko pojętego warsztatu badawczego, zrozumieniem rozpatrywanych problemów i znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Na

szczególne podkreślenie zasługuje moim zdaniem doskonały wybór tematyki, będący kontynuacją szeroko pojętej problematyki badawczej macierzystej jednostki, w szczególności Pana Profesora Promotora oraz wcześniejszych Kierowników Katedry Pana Profesora Zygmunta Wyrzykowskiego oraz Pani Profesor Barbary Przybylskiej-Gornowicz, znajomość światowego piśmiennictwa, która umożliwiła szeroką dyskusję w odniesieniu do wybranych zagadnień badawczych. Już dzisiaj można mówić o powstaniu szkoły badań nad szyszynką w Katedrze. Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można przypuszczać, że Doktorantka posiada ważne w pracy badawczej cechy, takie jak pracowitość, solidność i dociekliwość.

Poza bardzo wysoką oceną zaprezentowanych prac i autoreferatu recenzent pragnie zwrócić uwagę, że w języku polskim jednostką natężenia światła jest 1 luks (lx) i jednostka ta podlega odmianie według zasad deklinacji polskiej (2 luksy).

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny 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** w opinii recenzenta spełnia wszystkie wymagania – określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2021 r. poz. 478 ze zm.) – stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie mając na uwadze wysoki poziom naukowy zaprezentowanych badań i ich twórczy charakter, co również uznali recenzenci kwalifikujący prace do druku w czasopismach o światowym zasięgu, pragnę przedłożyć Wysokiej Radzie w pełni uzasadniony moim zdaniem wniosek o wyróżnienie pracy.