Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Katedra Histologii i Embriologii

PRACA DOKTORSKA

lek. wet. Kamila Martyniuk

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

Promotor:
prof. dr hab. Bogdan Lewczuk

Promotor pomocniczy:
dr Magdalena Prusik

Olsztyn, 2022

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania
Promotorowi mojej pracy,
Prof. dr hab. Bogdanowi Lewczukowi
za opiekę naukową, nieocenione wsparcie
oraz wyrozumiałość.

Serdecznie dziękuję
Promotorowi pomocniczemu,
Dr Magdalenie Prusik
za pomoc, cenne wskazówki
oraz życzliwość.

Pragnę również wyrazić wdzięczność
Pracownikom
Katedry Histologii i Embriologii
za okazane wsparcie i wszelką pomoc.

Pracę doktorską stanowi cykl dwóch artykułów oryginalnych:

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).

Koszty publikacji i częściowo badań sfinansowano w ramach programu Ministra Edukacji i Nauki pod nazwą „Regionalna Inicjatywa Doskonałości” w latach 2019-2023, nr projektu 010/RID/2018/19, kwota finansowania 12 000 000 złotych.

SPIS TREŚCI

1. Streszczenie 6

2. Abstract 8

3. Wykaz skrótów.....10

4. Omówienie publikacji stanowiących rozprawę doktorską 11

4.1. Wstęp 11

4.2. Cel badań 15

4.3. Materiały i metody.....16

4.3.1. Zwierzęta doświadczalne 16

4.3.2. Przebieg doświadczeń 16

4.3.2.1. Doświadczenie 1 - Wpływ wieku na metabolizm związków indolowych związanych z syntezą melatoniny 16

4.3.2.2. Doświadczenie 2 - Wpływ barwy i intensywności światła monochromatycznego na metabolizm związków indolowych związanych z syntezą melatoniny.....17

4.3.3. Procedury analityczne 18

4.3.3.1. Odczynniki chemiczne 18

4.3.3.2. Przygotowanie próbek do oznaczeń 19

4.3.3.3. Oznaczenie zawartości indoli metodą HPLC z rozdziałem w gradiencie i detekcją fluorescencyjną 19

4.3.3.4. Oznaczenie aktywności enzymów biorących udział w przemianie indoli 20

4.3.3.4.1. Hydroksylaza tryptofanowa 20

4.3.3.4.2. Dekarboksylaza aromatycznych aminokwasów 21

4.3.3.4.3. N-acetylotransferaza aryloalkyloaminowa 21

4.3.3.4.4. O-metylotransferaza N-acetyloserotoniny 22

4.3.3.5. Oznaczanie zawartości białka 22

4.3.4. Analiza statystyczna 22

4.4. Wyniki 23

4.4.1. Doświadczenie 1- Wpływ wieku na metabolizm związków indolowych związanych z syntezą melatoniny 23

4.4.1.1. Aktywność enzymów szlaku syntezy melatoniny 23

4.4.1.2. Stężenia związków indolowych 26

4.4.2. Doświadczenie 2 - Wpływ barwy i intensywności światła monochromatycznego na metabolizm związków indolowych związanych z syntezą melatoniny 34

4.4.2.1. Aktywność enzymów szlaku syntezy melatoniny 34

4.4.2.2. Stężenia związków indolowych 36

4.5. Dyskusja 43

4.6. Wnioski 57

4.7. Piśmiennictwo 58

5. Artykuły wraz z oświadczeniami autorów 66

1. Streszczenie

Szyszynki ptaków domowych wykazują duże zróżnicowanie, nie tylko w budowie anatomicznej i histologicznej, ale także w profilach zawartości indoli i mechanizmach odpowiedzialnych za regulację sekrecji melatoniny (MLT). Szyszynka indyka jest bardzo dobrym modelem w badaniach chronobiologicznych ze względu na największy wpływ światła odbieranego bezpośrednio na sekrecję MLT spośród wszystkich badanych ptaków domowych, sprawnie funkcjonujący endogenny generator rytmu oraz dużą amplitudę dobowych zmian wydzielania MLT. Badania nad szyszynką indyka mają również aspekt utylitarny, ze względu na znaczenie gospodarcze tego gatunku oraz istotną rolę, jaką odrywa światło w jego fizjologii.

Celem badań było scharakteryzowanie profilu metabolicznego indoli szlaku syntezy MLT u indyka domowego, prześledzenie zmian w zawartości indoli i aktywności enzymów biorących udział w syntezie MLT podczas rozwoju powylęgowego - od wyklucia piskląt do 45. tygodnia życia oraz określenie wpływu światła o różnej długości fali i intensywności na metabolizm tych związków.

Badania nad wpływem wieku na profil metaboliczny indoli w szyszynce przeprowadzono na indyczkach odchowywanych od 2. dnia do 45. tygodnia życia w warunkach oświetlenia 12 L:12 D, ze światłem białym o natężeniu 20 lux podczas fazy jasnej cyklu dobowego. Szyszynki pobierano od zwierząt w wieku 2, 7, 14, 28 dni oraz 10, 20, 30 i 45 tygodni w odstępach 2-godzinnych przez jedną dobę i zamrażano do badań biochemicznych. Doświadczenie określające wpływ światła monochromatycznego o różnej barwie i intensywności przeprowadzono na indyczkach 4-tygodniowych przebywających przez 7 dni podczas fazy jasnej cyklu 12 L:12 D w świetle zielonym, czerwonym i niebieskim o natężeniu 16, 32 oraz 64 lux. Ptaki poddawano eutanazji w odstępach 4-godzinnych przez jedną dobę. Oznaczenia zawartości indoli w szyszynkach wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z rozdziałem w gradiencie stężeń i 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.

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, charakterystycznym dla ptaków w wieku 28 dni, stężenia N-acetyloserotoniny (NAS) i MLT osiągnęły maksimum. Synteza i degradacja 5-HT również były na najwyższym poziomie. Trzeci etap, opisany w badaniach ptaków 10-tygodniowych, cechował 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. Stężenia wszystkich pochodnych tryptofanu wykazywały wahania dobowe aż do 45. tygodnia życia.

Światło monochromatyczne istotnie modyfikowało metabolizm indoli w szyszynce indyka domowego, a jego wpływ był zależny od barwy i intensywności. Wydatne zmiany dotyczyły przebiegu dobowego rytmu aktywności N-acetylotransferazy aryloalkyloaminowej (AA-NAT) i w konsekwencji syntezy MLT. Różnice w warunkach oświetlenia wpłynęły na: (i) spadek aktywności AA-NAT podczas fazy jasnej, (ii) wzrost aktywności AA-NAT po rozpoczęciu fazy ciemnej oraz (iii) czas wystąpienia nocnego 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 o natężeniu 16 lux w porównaniu ze światłem zielonym i czerwonym o tym samym natężeniu. Ponadto, hamujące działanie światła wzrastało wraz z intensywnością oświetlenia, niezależnie od barwy światła. Wzrost aktywności AA-NAT po rozpoczęciu fazy ciemnej cyklu był wolniejszy u zwierząt eksponowanych podczas dnia na działanie światła o natężeniu 16 lux niż 32 i 64 lux. 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. Światło czerwone znacząco wpłynęło na aktywność enzymów biorących udział w syntezie 5-HT, zwiększając aktywność hydroksylazy tryptofanowej i dekarboksylazy aromatycznych aminokwasów. 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.

2. Abstract

The avian pineal organs are highly variable in anatomical and histological structure, profiles of indoles content and mechanisms involved in regulation of MLT secretion. The turkey pineal organ is an attractive model for chronobiological research due to the strongest impact of direct photoreception on MLT secretion among all studied domesticated birds, well-working endogenous oscillator and high amplitude of MLT secretion rhythm. The studies on the pineal organ of turkeys are also important from a utilitarian point of view, because of significance of this species as meet-producing animal and role of light in its physiology.

The aim of the study was to characterize the metabolic profile of MLT synthesis-related indoles in domestic turkey, to analyse changes in the content of indoles and the activity of enzymes involved in MLT synthesis during postembryonic development from hatching to age of 45 weeks and to determine the effect of monochromatic light of different wavelength and intensity on the indole metabolism.

Studies on the effect of age on the metabolic profile of indoles in the pineal gland were conducted on turkeys reared from day 2 to 45 weeks of age in 12L:12D lighting conditions, with white light of 20 lux during the light phase. Pineal glands were taken from animals aged 2, 7, 14, 28 days and 10, 20, 30 and 45 weeks at intervals of 2 hours and frozen for biochemical tests. The experiment on the effect of monochromatic light of different colours and intensities was carried out on 4-week-old turkeys kept for 7 days under monochromatic green, red and blue light with intensity of 16, 32 or 64 lux during the photophase of 12L:12D cycle. The birds were euthanized at intervals of 4 hours. The indole content was measured in the pineal glands by high-performance liquid chromatography with gradient separation and fluorescence detection (HPLC). The activity of MLT synthesis pathway enzymes was determined by incubating pineal homogenate with appropriate substrates under optimal conditions for reaction velocity and determining the reactions products by HPLC. The results of the study were subjected to a two-factor analysis of variance with the Duncan test.

The results obtained in the posthatching period allowed to distinguish 4 stages of indole metabolism development in the turkey pineal gland. The first stage, from hatching to the age of 2 weeks, was characterized by a decrease in the 5-hydroxytryptophan (5-HTRP) concentration and an increase in the concentrations of

serotonin (5-HT), MLT, 5-methoxyindoleacetic acid (5-MIAA) and 5-methoxytryptamine (5-MTAM). During the second stage, around the age of 1 month, the concentrations of N-acetylserotonin (NAS) and MLT reached a maximum. The synthesis and degradation of 5-HT were also the highest. The third stage, around the age of 10 weeks, was characterized by decreased levels of 5-HT (approximately 50%) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) and a high level of 5-MTAM. The last stage, covering the age from 20 to 45 weeks, was characterized by a large decrease in the synthesis, content, and degradation of 5-HT. Despite these changes, there were no prominent differences in the nocturnal levels of NAS and MLT between the third and fourth stages. The concentrations of all tryptophan derivatives showed daily fluctuations until the age of 45 weeks.

The monochromatic light significantly modified the pineal indole metabolism in turkeys and its effects were dependent on the color and intensity of the light. The prominent changes occurred in the course of daily rhythm of arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT) activity and, consequently, in MLT synthesis. The differences in light conditions affected: (i) the decline in AA-NAT activity after the photophase onset and the level of enzyme activity at the nadir, (ii) the increase in AA-NAT activity after the scotophase onset, and (iii) the time of the peak occurrence and the activity level at the peak. The decline in AA-NAT activity after the photophase onset was significantly higher in turkeys kept under blue light than under green and red light. Moreover, the inhibitory effect of light increased with the illumination intensity, independent of the light color. The increase in enzyme activity after the photophase onset was slower in animals kept under monochromatic light intensity of 16 lx than in those kept under light intensities of 32 and 64 lx. The peak of AA-NAT activity occurred at 02.00 in turkeys kept under red light and blue light with intensity of 32 and 64 lx, but at 06.00 in birds kept under green light and 16 lx blue light. The red light significantly affected the performance of 5-HT synthesis, increasing the activities of tryptophan hydroxylase and aromatic amino acid decarboxylase. This effect was prominently reflected in the 5-HT content, which during the photophase and early scotophase was approximately 2 folds higher in turkeys kept under red light than in other groups, and in the 5-HIAA, 5-hydroxytryptophol, 5-MIAA, and 5-methoxytryptophol levels. The red light influenced the course of daily rhythm of 5-MTAM, increasing the level of this amine in the second part of the night.

3. Wykaz skrótów

5-HIAA - kwas 5-hydroksyindolooctowy

5-HT - serotonina

5-HTRP - 5-hydroksytryptofan

5-HTOL - 5-hydroksytryptofol

5-HTRP - 5-hydroksytryptofan

5-MIAA - kwas 5-metoksyindolooctowy

5-MTAM - 5-metoksytryptamina

5-MTOL - 5-metoksytryptofol

5-MTRP - 5-metoksytryptofan

AADC - dekarboksylaza aromatycznych aminokwasów

AA-NAT - N-acetylotransferaza aryloalkyloaminowa

ALDH - dehydrogenaza aldehydowa

AR - reduktaza aldehydowa

ASMT - O-metylotransferaza N-acetylserotoniny

HPLC - wysokosprawna chromatografia cieczowa

MAO - oksydaza monoaminowa

MLT - melatonina

NAS - N-acetyloserotonina

TPH - hydroksylaza tryptofanowa

TRP - tryptofan

BL - grupa ptaków utrzymywanych w świetle niebieskim o natężeniu 16 lux

BM - grupa ptaków utrzymywanych w świetle niebieskim o natężeniu 32 lux

BH - grupa ptaków utrzymywanych w świetle niebieskim o natężeniu 64 lux

GL - grupa ptaków utrzymywanych w świetle zielonym o natężeniu 16 lux

GM - grupa ptaków utrzymywanych w świetle zielonym o natężeniu 32 lux

GH - grupa ptaków utrzymywanych w świetle zielonym o natężeniu 64 lux

RL - grupa ptaków utrzymywanych w świetle czerwonym o natężeniu 16 lux

RM - grupa ptaków utrzymywanych w świetle czerwonym o natężeniu 32 lux

RH - grupa ptaków utrzymywanych w świetle czerwonym o natężeniu 64 lux

W- grupa ptaków utrzymywanych w świetle białym o natężeniu 16 lux

4. Omówienie publikacji stanowiących rozprawę doktorską

4.1. Wstęp

Przebieg licznych procesów fizjologicznych u ptaków jest ściśle skorelowany z następującymi po sobie fazami dnia oraz nocy. Szyszynka i jej główny hormon - melatonina (MLT) - odgrywają istotną rolę w kontroli wielu z nich [Gwinner i in., 1997]. Regulacja sekrecji MLT w szyszynce ptaków jest wyjątkowo złożona. Narząd ten posiada zdolność do bezpośredniego odbioru bodźców świetlnych przez względnie cienkie kości czaszki. Pinealocyty ptaków są światłoczułe dzięki obecności dwóch fotopigmentów: pinopsyny [Okano i in., 1997; Petrusewicz-Kosińska i in. 2019b] i melanopsyny [Panda i in., 2002]. Pinopsyna jest specyficzna dla szyszynki i kontroluje dobowy cykl syntezy MLT [Petrusewicz-Kosińska i in. 2019b; Okano i in., 1994; Okano i Fukada, 1997]. Z kolei, melanopsyna występuje zarówno w szyszynce, jak i siatkówce oka [Holthues i in., 2005] oraz uczestniczy w regulacji rytmu aktywności wielu struktur organizmu, w tym jądra nadskrzyżowaniowego (SCN) [Torii i in., 2007]. Aksony komórek zwojowych siatkówki zawierających melanopsynę budują szlak siatkówkowo-podwzgórzowy i tworzą połączenia synaptyczne z neuronami SCN, które pełni rolę wewnętrznego generatora rytmu dobowego [Gooley i in., 2001; Hannibal, 2002]. Multisynaptyczny szlak nerwowy łączy SCN z szyszynką u ssaków oraz u ptaków [Cassone i in., 1990; Jia i in., 2009].

Szyszynka ssaków dojrzewa po urodzeniu [Reiter, 1988], a rytm dobowy sekrecji MLT rozwija się w okresie poporodowym, zarówno u ludzi jak i gryzoni [Attanasio i in., 1986; Sato i in., 1989; Laakso i in., 1996]. U ludzi nocne poziomy MLT w osoczu krwi są najwyższe między 3. a 5. rokiem życia, następnie maleją do okresu dojrzewania płciowego i utrzymują się na stosunkowo stabilnym poziomie do wieku 35-40 lat [Waldhauser i in., 1998; Zawilska i in., 2009]. W późniejszym okresie życia dochodzi do stopniowego spadku stężenia MLT, a najniższy poziom notowany jest po 60. roku życia. Podobny schemat zmian poziomu MLT we krwi w ciągu życia charakteryzuje gryzonie [Reiter, 1980; Pang i Tang, 1983; Pang i in., 1984; Tang i Pang, 1988]. U szczurów stężenie MLT w surowicy wykazuje wzrost tuż po urodzeniu, po nim występuje okres wysokiego poziomu między 10. a 30. dniem życia, a następnie redukcja wraz z wiekiem [Pang i in., 1984]. W przeciwieństwie do stężenia we krwi, zawartość MLT w szyszynce szczurów wzrasta aż do osiągnięcia dorosłości [Pang i in., 1984]. Podobnie jak u ludzi, związany ze starzeniem spadek poziomu MLT, zarówno w

szyszynce jak i we krwi, jest bardzo wyraźny u gryzoni [Reiter, 1980; Pang i Tang, 1983; Pang i in., 1984; Tang i Pang, 1988].

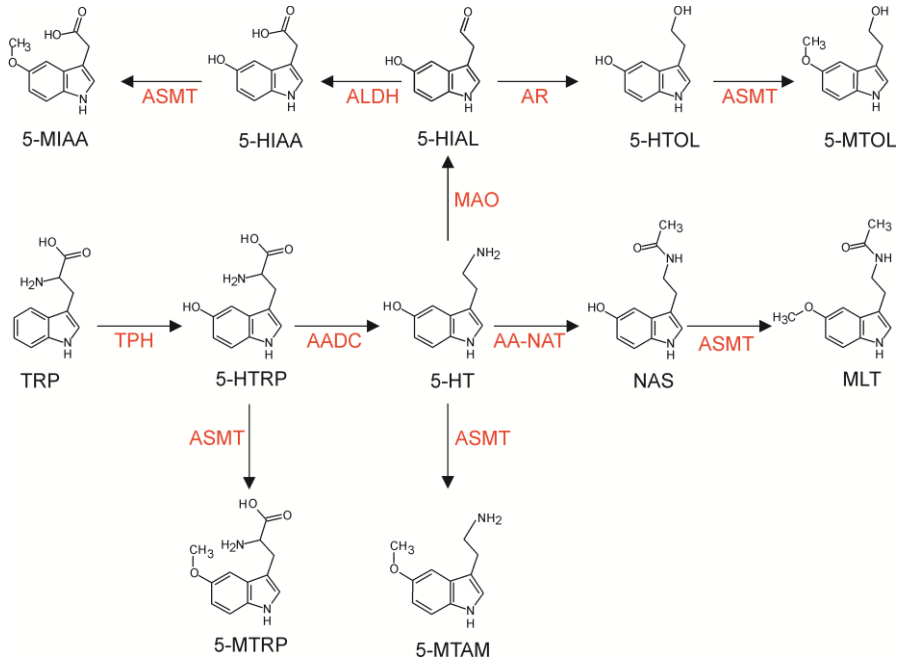
Niewiele badań dotyczyło zmian wydzielania MLT związanych z wiekiem u ptaków. U kury dobowy rytm syntezy MLT był obserwowany już w okresie życia embrionalnego [Zeman i Herichová, 2011]. Stężenie MLT w osoczu kurcząt wzrastało od 19. dnia życia embrionalnego do 3. dnia po wykluciu i utrzymywało się na wyrównanym poziomie do 21. dnia życia [Herichová i in., 2001] lub też zwiększało się do 14. dnia życia [Jin i in., 2011]. U brojlerów zaobserwowano zależny od wieku wzrost poziomu MLT w osoczu od wyklucia do 42. dnia życia, jednak tempo tego wzrostu zmieniało się wraz z wiekiem [Guo i in., 2015]. Rytmiczna synteza MLT rozpoczyna się w okresie życia embrionalnego również u gęsi domowej [Hanuszewska i in., 2019]. Istotnie obniżony poziomu MLT w osoczu odnotowano u starszych cukrówek w porównaniu do stężeń obserwowanych u ptaków dorosłych i młodych [Paredes i in., 2006]. Dotychczasowe badania dotyczące stężenia MLT we krwi indyków obejmowały jedynie krótkie okresy życia ptaków, bez uwzględnienia ewentualnych zmian w metabolizmie indoli na różnych etapach rozwoju powylęgowego [Zawilska i in., 2006 a, b; Prusik i Lewczuk, 2020].

Barwa światła ma ogromny wpływ na organizm ptaków. Czerwone światło zmniejsza dziobanie, agresję i kanibalizm oraz znacząco oddziałuje na nieśność u drobiu [Huber-Eicher i in., 2013; El Halawani, 2009; Hassan i in., 2013]. Zielone światło zwiększa tempo wzrostu brojlerów w początkowym okresie odchowu, a niebieskie stymuluje wzrost starszych ptaków [Halevy i in., 1998; Rozenboim i in., 1999a, b; Olanrewaju i in., 2015]. Ponadto niebieskie światło zmniejsza aktywność lokomotoryczną [Rodenboog, 2001] i redukuje poziom stresu u brojlerów [Xie i in., 2008]. Jednoczesne użycie zielonego i niebieskiego światła łączy zalety obu tych długości fali [Rozenboim i in., 2004]. Wpływa korzystnie na masę ciała brojlerów poprzez poprawę wykorzystania paszy w porównaniu z białym światłem [Yang i in., 2016] oraz stymuluje u nich odpowiedź immunologiczną [Xie i in., 2008]. Kury utrzymywane w niebieskim świetle, w porównaniu z hodowanymi w zielonym świetle, mają niższą temperaturę ciała oraz wyższe stężenie LDL i glukozy we krwi [Pan i in., 2014]. Barwa światła znacząco wpływa na transkrypcję genów zegarowych w szyszynce kury [Jiang i in., 2016; Ma i in., 2018], jednak niewiele wiadomo na temat wpływu światła monochromatycznego o różnej długości fali na syntezę i sekrecję MLT [Ma i in., 2019].

Budowa histologiczna i ultrastruktura szyszynki indyka różnią się znacznie od opisanych u kury, pomimo że oba gatunki należą do rodziny *Galliformes* [Ohshima i Matsuo, 1984; Przybylska-Gornowicz i in., 2005; Przybylska-Gornowicz i in., 2009; Petrusewicz-Kosińska i in., 2019a]. W świetle wyników dotychczasowych badań szyszynka indyka domowego stanowi bardzo atrakcyjny model do badań chronobiologicznych [Prusik i Lewczuk, 2019, 2020]. Posiada strukturę kanalikowo-pęcherzykową z dobrze rozwiniętymi pinealocytami szczątkowo-receptorowymi, co sugeruje, że bezpośredni odbiór bodźców świetlnych odgrywa bardzo dużą rolę w regulacji wydzielania MLT w tym narządzie [Petrusewicz-Kosińska i in., 2019a, b]. Spośród dotychczas badanych w warunkach *in vitro* szyszynek ptaków domowych, największy wpływ bezpośredniej fotorecepcji na sekrecję MLT wykazano w gruczole indyka [Prusik i Lewczuk, 2019]. Szyszynka tego gatunku bardzo szybko i precyzyjnie dostosowuje swoją aktywność wydzielniczą do zmian w cyklu świetlnym oraz posiada dobrze działający oscylator dobowy. Ponadto cechuje się bardzo dużą amplitudą dobowych zmian wydzielania MLT. Z punktu widzenia analizy zmian w metabolizmie indoli zachodzących wraz z wiekiem, będącej jednym z celów niniejszej pracy, należy podkreślić, że budowa szyszynki indyków jest bardzo dobrze scharakteryzowana od 1. dnia po wykluciu do końca 1. roku życia indyków [Przybylska-Gornowicz i in., 2005; Petrusewicz-Kosińska i in., 2019a, b]. Badania morfologiczne wykazały, że miąższ szyszynki jest utworzony prawie wyłącznie przez pinealocyty szczątkowo-receptorowe i ependymo-podobne komórki podporowe do 4. tygodnia życia, a liczba pinealocytów sekrecyjnych znacznie wzrasta po 20. tygodnia życia, zmieniając proporcje między obydwoma typami komórek [Przybylska-Gornowicz i in., 2005; Petrusewicz-Kosińska i in., 2019a]. Zjawisko to umożliwia analizę metabolizmu indoli w zależności od składu komórkowego miąższu szyszynki.

Znajomość fizjologii indyka domowego jest istotna z utylitarnego punktu widzenia ze względu na duże znaczenie tego gatunku w produkcji mięsa [Magdelaine i in., 2008; Windhorst, 2006]. Barwa i intensywność światła są istotnymi czynnikami wpływającym na zdrowotność i wydajność produkcyjną w fermach indyczych [Siopes i Underwood, 1987; Siopes, 1987; Denbow i in., 1990; Classen i in., 1994; Clark i Classen, 1995; Rozenboim i in., 1999; Rodenboog, 2001; El Halawani, 2009; Deep i in., 2010; Siopes, 2010]. Liczne badania wykazały, że MLT ma istotny związek z oddziaływaniem światła na produktywność indyków [Siopes i Underwood, 1987; Siopes, 1987].

Proces syntezy MLT w szyszynce (Ryc. 1) rozpoczyna się aktywnym wychwytem tryptofanu (TRP) z krwi przez pinealocyty [Reiter, 1991]. Związek ten w procesie hydroksylacji ulega przekształceniu w 5-hydroksytryptofan (5-HTRP) przy udziale hydroksylazy tryptofanowej (TPH). Następnie 5-HTRP pod wpływem działania dekarboksylazy aminokwasów aromatycznych (AADC) zostaje przekształcony w serotoninę (5-HT). W wyniku aktywności N-acetylotransferazy aryloalkyloaminowej (AA-NAT) oraz O-metylotransferazy N-acetyloserotoniny (ASMT) z 5-HT powstaje N-acetyloserotonina (NAS), a następnie MLT. Dodatkowo, znaczne ilości 5-HT ulegają w szyszynce oksydatywnej deaminacji pod wpływem oksydazy monoaminowej (MAO), co skutkuje powstaniem kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA) oraz 5-hydroksytryptofolu (5-HTOL). Związki te podlegają metylacji (również pod wpływem ASMT) odpowiednio do kwasu 5-metoksyindolooctowego (5-MIAA) oraz 5-metoksytryptofolu (5-MTOL). Ponadto, w szyszynce z 5-HT wytwarzana jest 5-metoksytryptamina (5-MTAM). Możliwa, ale dotychczas niepotwierdzona, jest również przemiana 5-HTRP do 5-metoksytryptofanu (5-MTRP).



Ryc. 1. Schemat przemian związków indolowych w szyszynce. Objaśnienia: TRP - tryptofan, 5-HTRP - 5-hydroksytryptofan, 5-HT - serotonina, NAS - N-acetyloserotonina, MLT - melatonina, 5-HIAL - aldehyd 5-hydroksyindolooctowy, 5-HIAA - kwas 5-hydroksyindolooctowy, 5-HTOL - 5-hydroksytryptofol, 5-MIAA - kwas 5-metoksyindolooctowy, 5-MTOL - 5-metoksytryptofol, 5-MTAM - 5-metoksytryptamina, 5-MTRP - 5-metoksytryptofan, TPH - hydroksylaza tryptofanowa, AADC - dekarboksylaza aminokwasów aromatycznych, AA-NAT - N-acetylotransferaza aryloalkyloaminowa, ASMT - O-metylotransferaza N-acetyloserotoniny, MAO - oksydaza monoaminowa, ALDH - dehydrogenaza aldehydowa, AR - reduktaza aldehydowa.

Szczegółowe badania metabolizmu indoli w szyszynce obejmujące pomiary wszystkich pochodnych TRP wykonano tylko u kilku gatunków ptaków, w tym u kury [Adamska i in., 2016], kaczki [Lewczuk i in., 2014] oraz gęsi [Ziółkowska i in., 2018; Hanuszewska i in., 2019]. Uzyskane dane wykazały bardzo duże różnice międzygatunkowe w profilach metabolicznych związków indolowych oraz w roli poszczególnych enzymów w regulacji syntezy MLT. Dotychczas nie badano wpływu wieku oraz intensywności i barwy światła na profil metaboliczny indoli związanych z syntezą MLT w szyszynce. W niniejszej pracy po raz pierwszy oznaczano w tym samym gruczole zawartość 11 indoli oraz aktywność czterech enzymów szlaku syntezy MLT.

4.2. Cel badań

Głównym celem badań było poznanie wpływu wieku oraz barwy i intensywności światła podczas dnia na metabolizm związków indolowych w szyszynce indyka domowego.

Szczegółowe cele badań obejmowały:

1. Scharakteryzowanie profilu metabolicznego indoli szlaku syntezy MLT u indyka domowego;
2. Poznanie zmian zawartości związków indolowych oraz aktywności enzymów szlaku syntezy MLT zachodzących w trakcie rozwoju powylęgowego;
3. Określenia występowania fluktuacji dobowych w metabolizmie indoli w szyszynce w okresie od 2. dnia do 45. tygodnia życia oraz modyfikacji, jakim podlegają w tym czasie;
4. Poznanie wpływu światła monochromatycznego czerwonego, niebieskiego i zielonego o różnych intensywnościach na zawartości związków indolowych oraz aktywności enzymów szlaku syntezy MLT;
5. Określenie wpływu światła monochromatycznego czerwonego, niebieskiego i zielonego o różnych intensywnościach na przebieg zmian dobowych w zawartości związków indolowych oraz aktywności enzymów szlaku syntezy MLT.

4.3. Materiały i metody

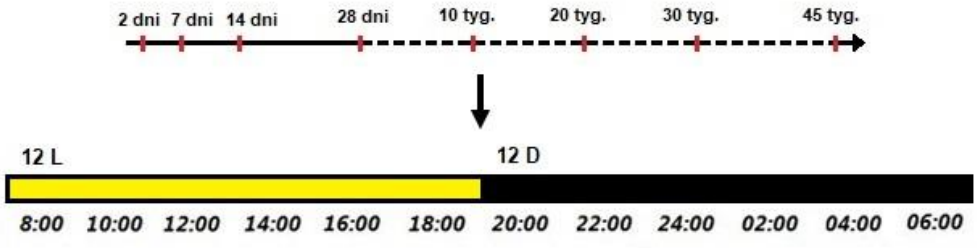
4.3.1. Zwierzęta doświadczalne

Badania przeprowadzono na samicach indyka domowego linii Hybrid XL, zakupionych jako jednodniowe pisklęta w zakładzie wylęgowym firmy Grelavi S.A. w Kętrzynie. Pisklęta przewożono do zwierzętarni Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie przystosowanej do odchowu ptaków w kontrolowanych warunkach oświetlenia. W trakcie doświadczeń indyki miały nieograniczony dostęp do wody pitnej oraz pełnoporcjowej paszy. Wszelkie procedury doświadczalne na zwierzętach przeprowadzono zgodnie z prawem polskim i Unii Europejskiej.

4.3.2. Przebieg doświadczeń

4.3.2.1. Doświadczenie 1 - Wpływ wieku na metabolizm związków indolowych związanych z syntezą melatoniny

Indyczki były odchowywane w cyklu świetlnym 12L:12D od pierwszego dnia do 45. tygodnia życia. Światło, którego źródłem były lampy żarowe o barwie zbliżonej do światła dziennego (3200 K), było włączane automatycznie o godzinie 07:00 i wyłączane o godzinie 19:00. Intensywność światła mierzona na wysokości głowy ptaków wynosiła 20 lux. Temperatura oraz intensywność wentylacji były regulowane zgodnie z wymaganiami zoohigienicznymi dla poszczególnych grup wiekowych indyków. Ptaki w wieku 2, 7, 14 i 28 dni oraz 10, 20, 30 i 45 tygodni poddawano eutanazji o 08:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00, 18:00, 20:00, 22:00, 24:00, 02:00, 04:00 oraz 06:00 (Ryc. 2). W przypadku indyczek w wieku 2 – 28 dni uśmiercano po 5 osobników w każdym punkcie czasowym, w przypadku ptaków starszych – po 4 osobniki. Szyszynki były pobieranie niezwłocznie po śmierci i zamrażane w temperaturze -75°C. Podczas fazy ciemnej wszystkie procedury były przeprowadzane w całkowitej ciemności z użyciem noktowizora.

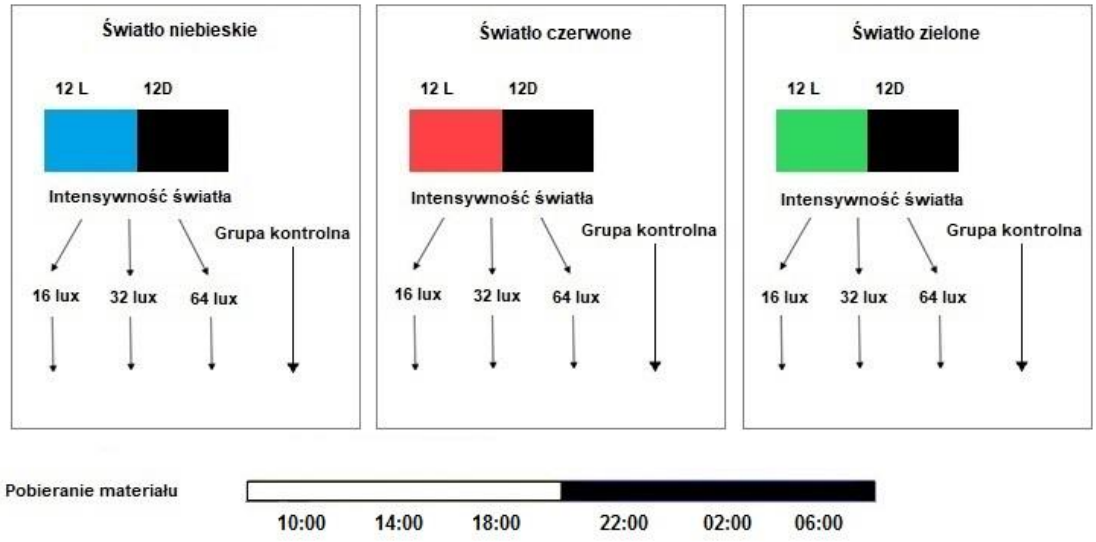


Ryc. 2. Schemat pobierania materiału w doświadczeniu 1.

4.3.2.2. Doświadczenie 2 - Wpływ barwy i intensywności światła monochromatycznego na metabolizm związków indolowych związanych z syntezą melatoniny

Doświadczenie zostało podzielone na trzy części, w których kolejno badano wpływ różnego natężenia monochromatycznego światła czerwonego (620 – 626 nm), niebieskiego (450 – 460 nm) oraz zielonego (520 – 530 nm). Każda z części rozpoczynała się odchowem piskląt trwającym 3 tygodnie, w trakcie którego ptaki przebywały w cyklu świetlnym 12 L:12 D ze światłem białym podczas dnia. Źródłem światła były lampy żarowe o barwie zbliżonej do światła dziennego (3200 K) włączane automatycznie o godzinie 09:00 i wyłączane o godzinie 21:00. Natężenie światła mierzone na wysokości 20 cm od podłogi wynosiło 16 lux. W wieku 3 tygodni ptaki w każdej części eksperymentu zostały losowo przydzielone do 3 grup badawczych - grupy z niską (16 lux), średnią (32 lux) i wysoką (64 lux) intensywnością światła monochromatycznego oraz do grupy kontrolnej utrzymywanej dalej w świetle białym (16 lux) podczas dnia. Źródłem światła monochromatycznego były panele o wymiarach zbliżonych do wielkości podłogi, zbudowane ze zróżnicowanej, w zależności od wymaganego natężenia światła, ilości diod emitujących światło, zawieszone na wysokości 170 cm. Diody były równomiernie rozmieszczone na całej powierzchni panelu. Natężenie światła monochromatycznego mierzono za pomocą specjalistycznego luksomierza (Multi-LED Light Meter TM-209M, Tenmars Electronics, Chiny). Ptaki przebywały w nowych warunkach oświetlenia przez 7 dni. W wieku 28 dni indyczki z każdej grupy badawczej oraz z grupy kontrolnej zostały poddane eutanazji o godzinie 10:00, 14:00, 18:00, 22:00, 02:00 i 06:00, niezwłocznie pobrano od nich szyszynki, które następnie zamrożono w temperaturze -75°C (Ryc. 3). W każdym punkcie czasowym pobrano po 6 gruczołów z każdej grupy badawczej oraz po 4 szyszynki z grupy kontrolnej (łącznie w 3 częściach pobrano 12 szyszynek w każdym punkcie

czasowym, które stanowiły grupę kontrolną). Podczas fazy jasnej szyszynki były pobierane przy świetle o natężeniu poniżej 5 lux o barwie zgodnej z daną częścią doświadczenia lub przy świetle białym w przypadku zwierząt kontrolnych. Podczas fazy ciemnej eutanazja zwierząt została przeprowadzona w całkowitej ciemności, a pobranie szyszynek odbywało się w świetle czerwonym o natężeniu nieprzekraczającym 3 lux we wszystkich częściach doświadczenia.



Ryc. 3. Schemat pobierania materiału w doświadczeniu 2.

4.3.3. Procedury analityczne

Oznaczenia zawartości indoli w szyszynce przeprowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z rozdziałem w gradiencie stężeń fazy ruchomej i detekcją fluorescencyjną. Określenie aktywności enzymów szlaku syntezy melatoniny wykonano poprzez pomiar ilości produktu wytworzonego w jednostce czasu w trakcie inkubacji homogenatu szyszynki w obecności substratów w odpowiednich warunkach. Zawartość produktów reakcji enzymatycznych oznaczano techniką HPLC.

4.3.3.1. Odczynniki chemiczne

Metanol o czystości gradientowej HPLC, kwas nadchlorowy oraz siarczan amonowo-żelazowy (II) zostały zakupione w firmie Merck Millipore (USA). Sól disodowa EDTA, octan sodowy oraz kwas octowy o najwyższej klasie czystości

pochodziły z firmy J. T. Baker (USA). Tetrahydrobiopteryna, ditiotreitol, dichlorowodorek 3-hydroksybenzylohydrazyny (NSD 1015), katalaza z wątroby bydlęcej, baza TRIS, 5-fosforan pirydoksalu, pargilina, tryptamina, sól sodowa acetylo-CoA oraz S-adenozynometionina zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich (USA). Roztwory standardowe indoli (TRP, 5-HTRP, 5-HT, NAS, MLT, 5-HIAA, 5-MIAA, 5-MTOL i 5-MTAM) przygotowano ze związków chemicznych o najwyższej dostępnej czystości, pochodzących z firmy Sigma-Aldrich (USA). 5-HTOL i 5-MTRP pochodziły z Santa Cruz Biotechnology (USA). We wszystkich procedurach stosowano ultraczystą wodę o parametrach 18,2 MΩ, TOC ≤ 5 ppb, przygotowaną bezpośrednio przed użyciem za pomocą systemu oczyszczania Milli-Q® IQ 7003/05 (Merck, USA).

4.3.3.2. Przygotowanie próbek do oznaczeń

Zamrożone szyszynki były indywidualnie ważone i homogenizowane (Vibra-Cell VC 70 z sondą o średnicy 2mm, Sonics & Materials Inc., USA) w 200 µl zimnej wody. Następnie 80 µl homogenatu dodawano do probówki typu Eppendorf zawierającej 20 µl 1 mM kwasu nadchlorowego, zawartość probówki mieszano na mieszadle typu „vortex" i pozostawiano w łaźni lodowej na 15 min. Po odwirowaniu z szybkością 30 000 x g w temperaturze 4°C przez 15 minut (Allegra 64 R, Coulter Beckman, USA) supernatant ostrożnie przenoszono do polipropylenowej fiolki przeznaczonej do autosamplera (La-Pha-Pack Werner, Niemcy). Supernatanty nie były filtrowane ze względu na absorpcję indoli do membrany filtracyjnej.

W celu wykonania oznaczeń aktywności enzymów pobierano po 20 µl homogenatu i dodawano do probówek typu Eppendorf zawierających odpowiednie dla poszczególnych enzymów mieszaniny reakcyjne. Czas od przygotowania homogenatu do rozpoczęcia inkubacji próbek nie przekraczał 30 sekund.

4.3.3.3. Oznaczenie zawartości indoli metodą HPLC z rozdziałem w gradiencie i detekcją fluorescencyjną

Oznaczenia wykonano za pomocą zestawu Vanquish Duo U/HPLC składającego się z tandemu dwóch niezależnych pomp gradientowych, autosamplera z dwiema niezależnymi igłami nastrzykowymi i systemem chłodzenia próbek, termostatu kolumnowego oraz dwóch detektorów fluorescencyjnych (Thermo Fisher Scientific, USA). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono w temperaturze 30°C przy użyciu kolumn Hypersil Gold aQ o wymiarach 150 × 4,6 mm i średnicy ziaren 3 µm (Thermo

Scientific, USA). Faza ruchoma składała się z metanolu oraz wodnego roztworu 5 mM octanu sodowego i 0,01 mM soli disodowej EDTA (pH 4,5 uzyskane przez dodanie kwasu octowego). Szybkość przepływu fazy ruchomej przez kolumnę wynosiła 1 ml/min. Początkowa zawartość metanolu wynosiła 3% (*v/v*). Pomiędzy 7. i 20. minutą od nastrzyku stężenie metanolu zwiększano liniowo aż do uzyskania stężenia 30% (*v/v*) w 20. minucie rozdziału. Detekcję przeprowadzono przy długości fali wzbudzenia 280 nm i fali emisji 345 nm w stałej temperaturze 38°C. Czułość detektora zmieniano w 15,25 minucie separacji z poziomu 6 na 8, co pozwoliło na oznaczenie związków o różnej intensywności fluorescencji. Objętość nastrzyku wynosiła 20 µl. Próbki przebywały w autosamplerze w temperaturze 10°C nie dłużej niż 8 godzin. Analizę uzyskanych chromatografów przeprowadzono za pomocą oprogramowania Chromeloeon 7.2.10 (Thermo Scientific, USA). Najniższe limity pomiaru (stosunek S/N 10:1, RSD $\leq$ 15%) dla wszystkich oznaczanych indoli były mniejsze niż 2 pg na nastrzyk. Współczynniki zmienności pola powierzchni pików dla oznaczeń wykonywanych w kolejnych dniach nie przekraczały 2%.

4.3.3.4. Oznaczanie aktywności enzymów szlaku syntezy MLT

4.3.3.4.1. Hydroksylaza tryptofanowa

Aktywność TPH oznaczano poprzez pomiar akumulacji 5-HTRP podczas inkubacji homogenatu szyszynki z odpowiednimi substratami oraz inhibitorem AADC. Homogenaty (20 µl) dodawano do probówek typu Eppendorf zawierających 10 µl 8 mM TRP, 10 µl 3,2 mM tetrahydrobiopteryny, 10 µl 8 mM ditiotreitolu, 10 µl 8 mM siarczanu amonowo-żelazowego (II), 2,5 µl katalazy z wątroby bydlęcej, 10 µl 8 mM NSD 1015 oraz 7,5 µl 1 M buforu octanowego TRIS. Następnie probówki inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 38°C przez 30 minut. Reakcję enzymatyczną przerywano przez dodanie 20 µl 1 mM kwasu nadchlorowego oraz umieszczenie probówek w łaźni lodowej na 15 minut. Po odwirowaniu w 30 000 x g (4°C, 15 min) supernatanty ostrożnie przenoszono do polipropylenowych fiolek przeznaczonych do autosamplera (La-Pha-Pack Werner, Niemcy). Zawartość 5-HTRP mierzono zgodnie z opisem podanym w podrozdziale 4.3.3.3 przy czym czułość detektora była ustawiona na poziomie 2, a objętość nastrzyku wynosiła 10 µl. Współczynniki zmienności pola powierzchni pików dla oznaczeń wykonywanych w kolejnych dniach nie przekraczały 2%.

4.3.3.4.2. Dekarboksylaza aromatycznych aminokwasów

Aktywność AADC określono poprzez oznaczenie poziomu dekarboksylacji 5-HTRP do 5-HT w obecności inhibitora MAO. Homogenat szyszynki (20 µl) dodawano do mieszaniny reakcyjnej zawierającej 10 µl 5 mM 5-HTRP, 10 µl 0,05 mM 5-fosforanu pirydoksalu oraz 10 µl 5 mM pargiliny w 0,2 M buforze fosforanowym o pH 7,8. Następnie mieszaninę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 38°C przez 30 minut. Reakcję enzymatyczną przerywano przez dodanie 20 µl 1 mM kwasu nadchlorowego. Po 15 minutowej inkubacji w łaźni lodowej, mieszaninę wirowano (30 000 x g, 4°C, 15 min) i supernatant ostrożnie umieszczono we fiolkach autosamplera. Zawartość 5-HT mierzono zgodnie z opisem podanym w podrozdziale 4.3.3.3 za wyjątkiem zastosowania innych parametrów gradientu fazy ruchomej, objętości nastrzyku oraz czułości detektora. Zawartość metanolu zwiększano liniowo od 5% (v/v) do 10% (v/v) w trakcie pierwszych 7 minut od nastrzyku, utrzymywano na stałym poziomie przez 2 minuty, a od 11. minuty ponownie zwiększono aż do uzyskania stężenia 30% (v/v). Następnie stężenie metanolu stopniowo zmniejszano do poziomu początkowego. Objętość nastrzyku wynosiła 2,5 µl. Czułość detektora była ustawiona na poziomie 1. Współczynniki zmienności pola powierzchni pików dla oznaczeń wykonywanych w kolejnych dniach nie przekraczały 2%.

4.3.3.4.3. N-acetylotransferaza aryloalkyloaminowa

Aktywność AA-NAT określono poprzez oznaczenie akumulacji N-acetylotryptaminy. Homogenaty (20 µl) dodawano do probówek typu Eppendorf zawierających 10 µl 5 mM tryptaminy, 10 µl 2,55 mM acetylo-CoA oraz 10 µl 0,2 mM buforu fosforanowego o pH 6,8. Następnie probówki inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 38°C przez 30 minut. Reakcję enzymatyczną przerywano przez dodanie 20 µl 1 mM kwasu nadchlorowego oraz umieszczenie probówek w łaźni lodowej na 15 minut. Po odwirowaniu w 30 000 x g (4°C, 15 min) supernatanty ostrożnie przenoszono do fiolek przeznaczonych do autosamplera. Oznaczenie zawartości N-acetylotryptaminy przeprowadzono tak jak dla AADC, z wyjątkiem włączenia detekcji dopiero w 18. minucie rozdziału (czas retencji dla N-acetylotryptaminy: 25,9-26,0 minuty) i ustawienia czułości detektora na 4. poziomie. Objętość nastrzyku wynosiła 5 µl. Współczynniki zmienności pola powierzchni pików dla oznaczeń wykonywanych w kolejnych dniach nie przekraczały 2%.

4.3.3.4.4. O-metylotransferaza N-acetyloserotoniny

Aktywność ASMT określono poprzez oznaczenie akumulacji MLT. Homogenaty (20 µl) dodawano do probówek typu Eppendorf zawierających 10 µl 2 mM NAS w buforze fosforanowym (0,2 M, pH 7,8) oraz 10 µl 0,4 mM S-adenozynometioniny w buforze fosforanowym (0,2 M, pH 7,8). Probówki inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 38°C przez 30 minut. Reakcję enzymatyczną przerywano przez dodanie 20 µl 1 mM kwasu nadchlorowego oraz umieszczenie probówek w łaźni lodowej na 15 minut. Po odwirowaniu w 30 000 x g (4°C, 15 min) supernatanty ostrożnie przenoszono do fiolek przeznaczonych do autosamplera. Zawartość MLT mierzono zgodnie z opisem podanym w podrozdziale 4.3.4, przy czym czułość detektora podczas pomiaru fluorescencji MLT ustawiono na poziomie 3, a objętość nastrzyku wynosiła 5 µl. Współczynniki zmienności pola powierzchni pików dla oznaczeń wykonywanych w kolejnych dniach nie przekraczały 2%

4.3.3.5. Oznaczanie zawartości białka

Zawartość białka w homogenacie, po jego uprzednim rozcieńczeniu, oznaczano za pomocą zestawu Quant-iT™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

4.3.4. Analiza statystyczna

Wpływ wieku na zawartość związków indolowych oraz aktywność enzymów analizowano dwuczynnikową analizą wariancji z wiekiem ptaków i czasem pobrania narządów jako czynnikami. Dane dotyczące wpływu światła monochromatycznego na zawartość związków indolowych oraz aktywność enzymów szklaku syntezy melatoniny były również analizowane za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji, w której czynnikami były warunki oświetlenia oraz czas pobrania próbek. Do analizy post-hoc w obu doświadczeniach wykorzystano test Duncana. Analizy przeprowadzono za pomocą programu *Statistica* 13.1 (StatSoft Polska). Za statystycznie istotne uznano różnice przy wartości poziomu istotności $P < 0,05$.

4.4. Wyniki

4.4.1. *Doświadczenie 1 - Wpływ wieku na metabolizm związków indolowych związanych z syntezą melatoniny*

4.4.1.1. Aktywność enzymów szlaku syntezy melatoniny

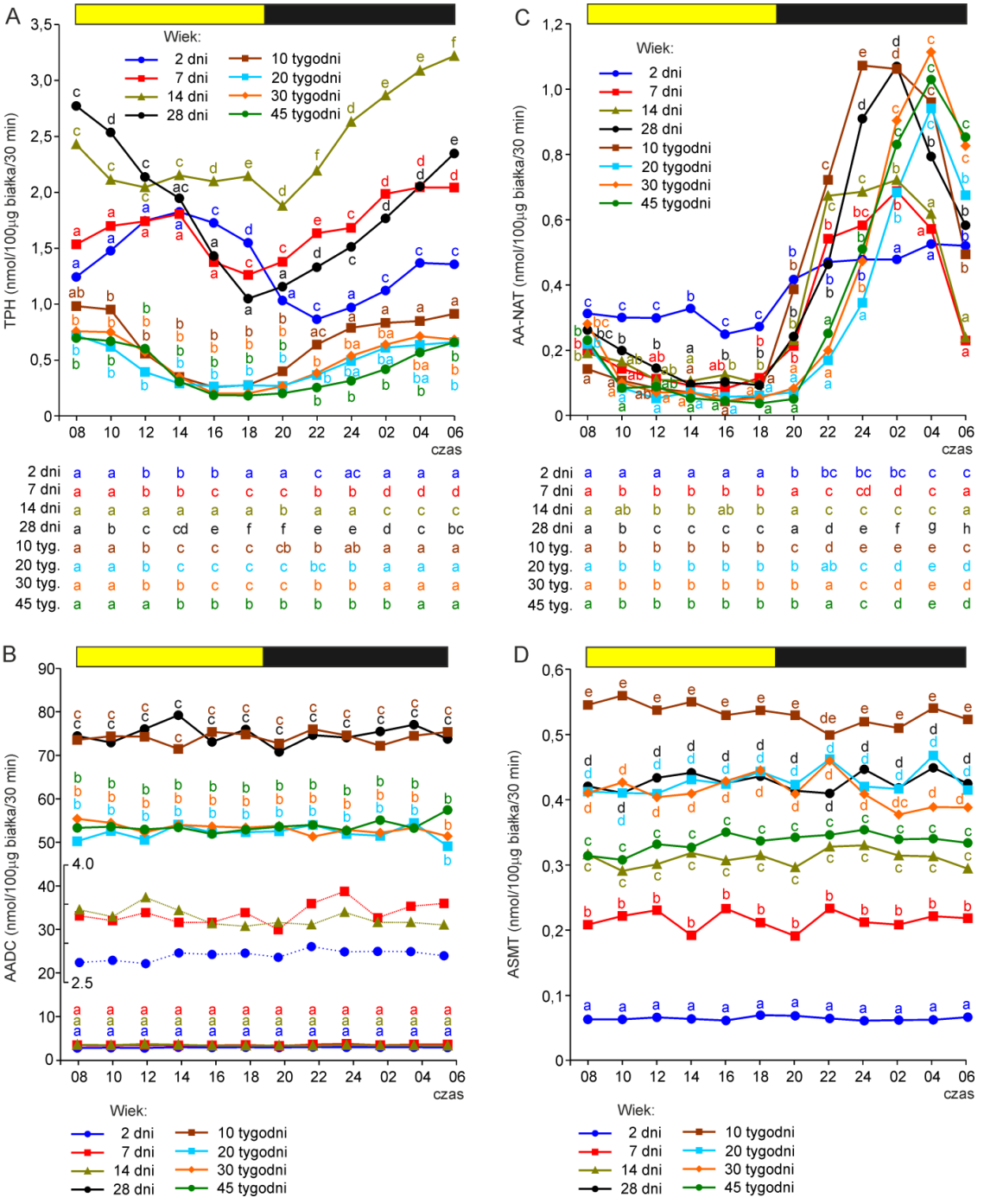
Aktywność enzymatyczną wyrażono w ilości wytworzonego produktu na 0,1 mg rozpuszczalnego białka w homogenacie szyszynki. Dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała istotny wpływ wieku zwierząt na aktywność wszystkich enzymów uczestniczących w syntezie MLT. Wpływ czasu pobrania próbek był istotny w analizach danych z pomiarów TPH i AA-NAT. W przypadku obu enzymów stwierdzono istotne interakcje między wiekiem zwierząt a czasem pobrania próbek.

Hydroksylaza tryptofanowa

Aktywność TPH w szyszynce wzrastała przez pierwsze dwa tygodnie życia ptaków (Ryc. 4A). Podczas fazy ciemnej aktywność tego enzymu była istotnie wyższa u indyków 7-dniowych niż u ptaków 2-dniowych. Z kolei, indyki 14-dniowe miały istotnie wyższą aktywność TPH w porównaniu do ptaków 7-dniowych. W trakcie fazy jasnej aktywność TPH była istotnie wyższa u indyków 14-dniowych niż u młodszych osobników. W szyszynce indyków 28-dniowych aktywność TPH utrzymywała się w pierwszej połowie dnia na poziomie zbliżonym do notowanego u ptaków 7-dniowych, a w drugiej połowie dnia i w nocy była podobna do stwierdzonej u ptaków 14-dniowych. Aktywność TPH w szyszynkach ptaków w wieku 10, 20, 30 i 45 tygodni była istotnie niższa w porównaniu do gruczołów 28-dniowych indyków. Ponadto, na początku dnia i podczas nocy, aktywność tego enzymu była istotnie niższa w szyszynkach ptaków 45-tygodniowych w porównaniu z indykami w wieku 10 tygodni.

Aktywność TPH wykazywała istotne zmiany dobowe w szyszynkach wszystkich badanych grup indyków, a przebieg tych zmian różnił się w zależności od wieku zwierząt (Ryc. 4A). W narządach ptaków 2-dniowych i 7-dniowych aktywność enzymu stopniowo wzrastała w pierwszej połowie fazy jasnej, powoli obniżała się w drugiej połowie tej fazy, a następnie wzrastała podczas nocy. W szyszynkach indyków w wieku 14 dni aktywność TPH utrzymywała się na wyrównanym poziomie podczas fazy jasnej i wydatnie wzrastała podczas fazy ciemnej. Aktywność TPH u zwierząt starszych stopniowo spadała podczas dnia i wzrastała w nocy. Najwyższą aktywność TPH u tych

ptaków odnotowano o godzinie 08:00, 10:00, 04:00 i 06:00, a najniższą o godzinie 18:00 i 20:00.



Ryc. 4. Aktywność (średnie) hydroksylazy tryptofanowej, TPH (A), dekarboksylazy aminokwasów aromatycznych, AADC (B), N-acetylotransferazy aryloalkyloaminowej, AA-NAT (C) i O-metylotransferazy N-acetyloserotoniny, ASMT (D) w szyszynkach indyków w wieku 2, 7, 14, 28 dni oraz 10, 20, 30, 45 tygodni. Belka pozioma przedstawia fazę jasną i ciemną cyklu dobowego. Litery na wykresach pokazują różnice między grupami wiekowymi w każdym punkcie czasowym w teście Duncana. Litery pod wykresami pokazują różnice między punktami czasowymi w grupie w teście Duncana. Te same litery oznaczają średnie, które nie różnią się istotnie.

Dekarboksylaza aromatycznych aminokwasów

Aktywność dekarboksylazy aromatycznych aminokwasów w szyszynkach indyków charakteryzowała się bardzo dużymi zmianami w okresie rozwoju powylęgowego (Ryc. 4B). Najniższą aktywność tego enzymu stwierdzono u indyków w wieku 2 dni. Aktywność AADC była o około 20% wyższa w szyszynkach ptaków 7-dniowych i 14-dniowych. Dwudziestokrotny wzrost aktywności AADC wystąpił między 14. a 28. dniem życia. Aktywność AADC u 10-tygodniowych indyków była zbliżona do obserwowanej u 4-tygodniowych ptaków. Istotny, około 30% spadek aktywności AADC odnotowano między 10. a 20. tygodniem życia. Nie stwierdzono istotnych różnic w aktywności enzymu między zwierzętami w wieku 20, 30 i 45 tygodni. Aktywność AADC nie wykazywała istotnych wahań dobowych (Ryc. 4B).

N-acetylotransferaza aryloalkyloaminowa

W celu poprawnej interpretacji uzyskanych wyników, wpływ wieku na aktywność AA-NAT należy analizować łącznie ze zmianami aktywności tego enzymu zachodzącymi w trakcie cyklu dobowego. W szyszynkach wszystkich grup wiekowych, z wyjątkiem najmłodszej, aktywność AA-NAT zmniejszała się na początku fazy jasnej, a następnie utrzymywała się na względnie stabilnym poziomie aż do rozpoczęcia fazy ciemnej (Ryc. 4C). Aktywność AA-NAT wzrosła po nastaniu ciemności, a wzrost ten był wolniejszy u indyków w wieku 20, 30 i 45 tygodni w porównaniu z młodszymi ptakami. W konsekwencji aktywność AA-NAT była istotnie niższa u starszych zwierząt w stosunku do młodszych na początku fazy ciemnej, a nocny szczyt aktywności AA-NAT wystąpił później u indyków w wieku 20, 30 i 45 tygodni niż u ptaków młodszych. Nie stwierdzono jednak znaczących różnic w maksymalnej aktywności AA-NAT u indyków w wieku od 4 do 45 tygodni. Nocny wzrost aktywności AA-NAT był istotnie niższy u indyków w wieku 2, 7 i 14 dni niż u ptaków starszych. Był on również niższy u ptaków 2-dniowych niż indyków 7-dniowych i 14-dniowych. Podczas fazy jasnej, między godziną 10:00 a 18:00, aktywność AA-NAT była istotnie wyższa u 2-dniowych indyków niż u starszych ptaków.

O-metylotransferaza N-acetyloserotoniny

Najniższą aktywność ASMT stwierdzono w szyszynkach indyków w wieku 2 dni (Ryc. 4D). Była ona około 4-krotnie wyższa u ptaków 7-dniowych i 5-krotnie wyższa u

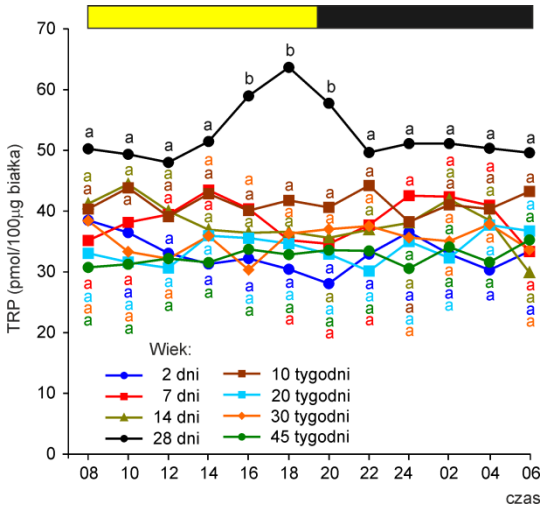
ptaków 14-dniowych w porównaniu z osobnikami najmłodszymi. Nie stwierdzono istotnych różnic w aktywności ASMT pomiędzy szyszynkami indyków w wieku 14 i 28 dni. Dalszy wzrost aktywności AMST nastąpił między 4. a 10. tygodniem życia, co skutkowało osiągnięciem najwyższego poziomu aktywności na koniec tego okresu. Aktywność ASMT była istotnie niższa u indyków w wieku 20, 30 i 45 tygodni w porównaniu z ptakami w wieku 10 tygodni. We wszystkich badanych grupach wiekowych nie stwierdzono istotnych dobowych wahań aktywności ASMT.

4.4.1.2. Stężenia związków indolowych

Stężenie indoli wyrażono w przeliczeniu na 0,1 mg rozpuszczalnego białka w homogenacie szyszynki. Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała istotny wpływ wieku zwierząt i czasu pobierania próbek na stężenie badanych pochodnych tryptofanu. Ponadto, w przypadku wszystkich pochodnych stwierdzono istotne interakcje między tymi dwoma czynnikami.

Tryptofan

Stężenie TRP pomiędzy godziną 16:00 a 20:00 było istotnie wyższe w szyszynkach indyków w wieku 28 dni niż w gruczołach ptaków młodszych oraz starszych (Ryc. 5). Nie zaobserwowano istotnych dobowych wahań poziomu TRP niezależnie od wieku ptaków.



Ryc. 5. Stężenie tryptofanu (TRP) w szyszynkach indyków w wieku 2, 7, 14, 28 dni oraz 10, 20, 30, 45 tygodni. Belka pozioma przedstawia fazą jasną i ciemną cyklu dobowego. Litery na wykresach pokazują różnice między grupami wiekowymi w każdym punkcie czasowym w teście Duncana. Te same litery oznaczają średnie, które nie różnią się istotnie.

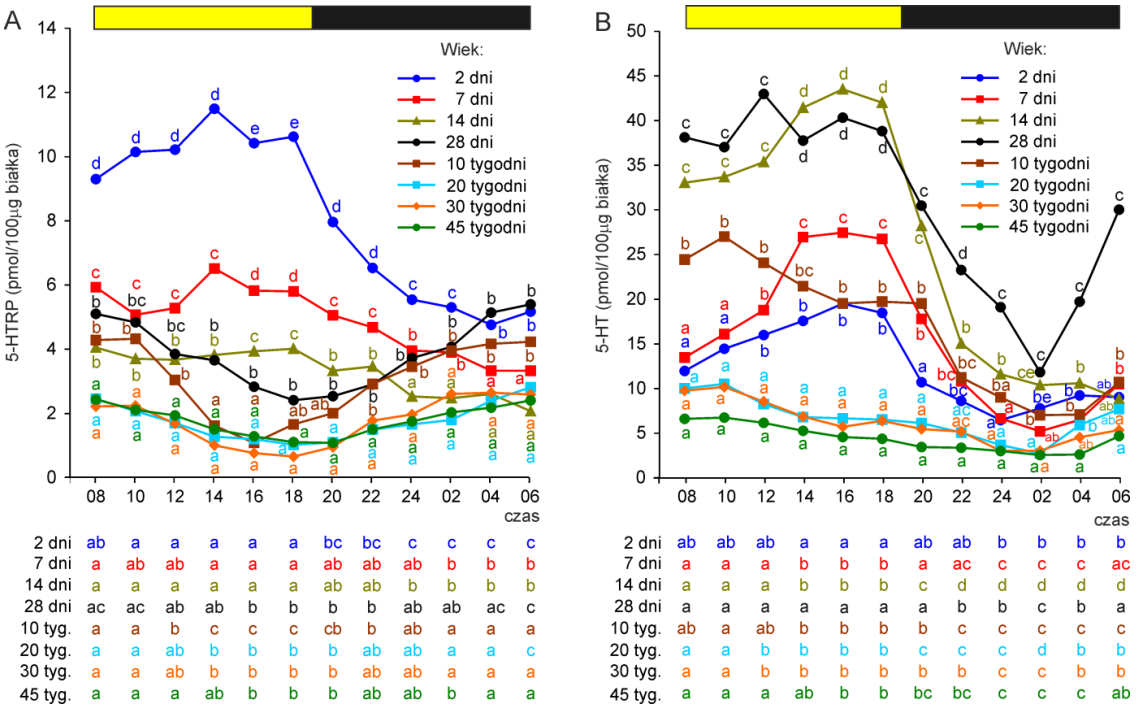
5-hydroksytryptofan

Najwyższe stężenia 5-HTRP stwierdzono w szyszynkach indyków 2-dniowych. U ptaków w wieku 7 dni poziomy 5-HTRP były istotnie niższe niż u najmłodszych indyków we wszystkich badanych punktach czasowych (Ryc. 6A). Podobnie stężenia 5-HTRP były istotnie niższe u indyków w wieku 14 dni niż u ptaków w wieku 7 dni. Bardziej złożone zależności występowały w szyszynkach indyków w wieku 4 i 10 tygodni w porównaniu z młodszymi ptakami, głównie ze względu na różny przebieg dobowych wahań stężenia 5-HTRP. Ogólnie stężenia te były znacznie niższe pomiędzy godziną 16:00 a 20:00 u 4- i 10-tygodniowych indyków niż u młodszych ptaków, ale podobne lub nawet wyższe w innych punktach czasowych. Najniższe stężenia 5-HTRP stwierdzono w szyszynkach indyków w wieku 20, 30 i 45 tygodni. W czasie fazy jasnej były one istotnie niższe niż u ptaków w wieku 2, 7, 14 i 28 dni, zaś w czasie fazy ciemnej (od godziny 22:00) - istotnie niższe niż u indyków w wieku 2 i 28 dni oraz 10 tygodni.

We wszystkich badanych grupach indyków stwierdzono istotne dobowe wahania stężenia 5-HTRP, ale ich przebieg i amplitudy różniły się znacznie w zależności od wieku zwierząt (Ryc. 6A). W szyszynkach 2-dniowych, 7-dniowych i 14-dniowych indyków stężenia 5-HTRP były istotnie wyższe podczas fazy jasnej niż w godzinach 24:00, 02:00, 04:00 i 06:00, jednak amplitudy wahań dobowych malały wraz z wiekiem indyków. Natomiast u starszych ptaków najniższe poziomy 5-HTRP odnotowano w drugiej połowie fazy jasnej. Spośród tych zwierząt najwyższą amplitudę zmian dobowych odnotowano u 10-tygodniowych indyków.

Serotonina

Stężenie 5-HT mierzone podczas fazy jasnej stopniowo wzrastało w trakcie rozwoju powylęgowego od 2. do 14. dnia życia (Ryc. 6B). Analogicznych zmian poziomów nie odnotowano podczas fazy ciemnej. Stężenie 5-HT w szyszynkach 28-dniowych indyków było na podobnym poziomie do obserwowanego u ptaków 14-dniowych. Poziom 5-HT był istotnie niższy w szyszynkach indyków w wieku 10 tygodni niż u zwierząt 28-dniowych. Najniższe stężenia 5-HT wystąpiły u indyków w wieku 20, 30 i 45 tygodni. Stężenia te pomiędzy godziną 08:00 a 02:00 były dwa razy niższe niż w szyszynkach indyków w wieku 10 tygodni.

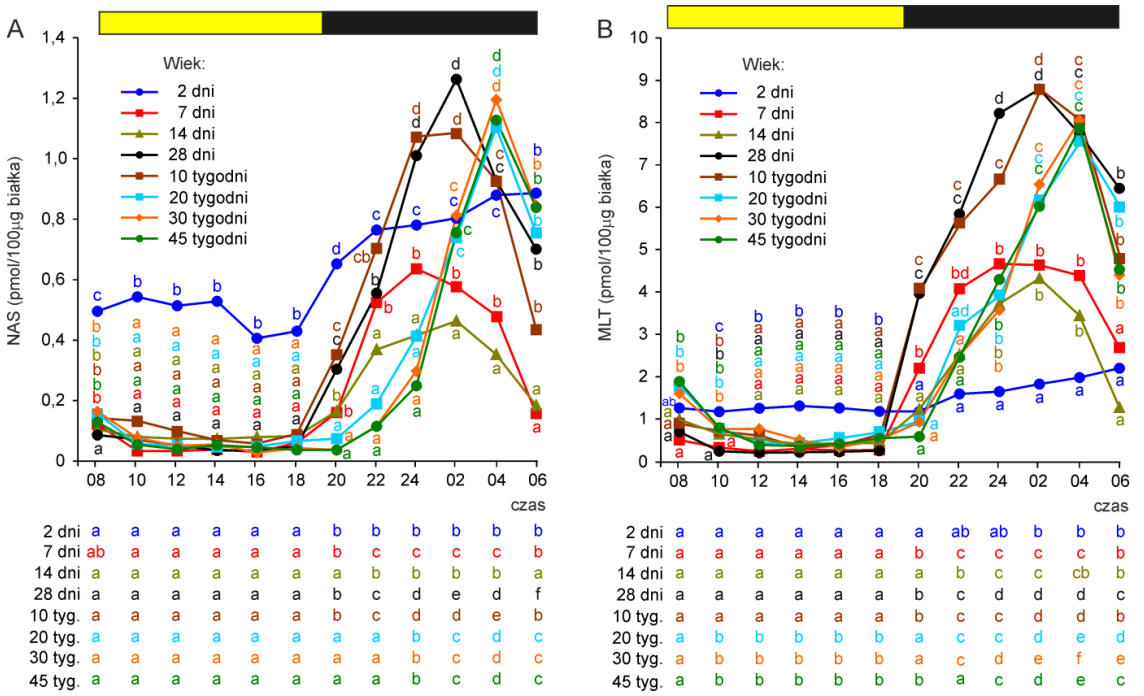


Ryc. 6. Stężenie (średnie) 5-hydroksytryptofanu, 5-HTRP (A) oraz serotoniny, 5-HT (B) w szyszynkach indyków w wieku 2, 7, 14, 28 dni oraz 10, 20, 30, 45 tygodni. Belka pozioma przedstawia fazę jasną i ciemną cyklu dobowego. Litery na wykresach pokazują różnice między grupami wiekowymi w każdym punkcie czasowym w teście Duncana. Litery pod wykresami pokazują różnice między punktami czasowymi w grupie w teście Duncana. Te same litery oznaczają średnie, które nie różnią się istotnie.

Stężenie 5-HT zmieniało się istotnie podczas doby we wszystkich badanych grupach wiekowych (Ryc. 6B). W szyszynkach indyków w wieku 2, 7 i 14 dni stężenie 5-HT wzrastało w czasie fazy jasnej, by w drugiej połowie tej fazy osiągnąć wartości maksymalne, a następnie malało w czasie trwania fazy ciemnej. Amplituda dobowych wahań wzrastała wraz z wiekiem ptaków. U 28-dniowych indyków poziom 5-HT był raczej stabilny podczas dnia, obniżał się po rozpoczęciu fazy ciemnej osiągając minimalną wartości o godzinie 02:00, a następnie szybko wzrastał. Stężenie 5-HT u starszych ptaków było najwyższe o godzinie 08:00 i 10:00, następnie stopniowo spadało do osiągnięcia minimum o godzinie 02:00, po czym ponownie wzrastało.

N-acetyloserotonina

Stężenie NAS w szyszynce podczas fazy jasnej było od 3 od 5 razy wyższe u 2-dniowych indyków niż u starszych ptaków (Ryc. 7A). W początkowej fazie rozwoju powylęgowego nocne poziomy NAS zmniejszały się wraz z wiekiem i były istotnie niższe u ptaków 7-dniowych niż u 2-dniowych oraz u indyków 14-dniowych niż u 7-dniowych. Następnie, stężenia NAS podczas fazy ciemnej rosły wraz z wiekiem i były istotnie wyższe u indyków w wieku 4, 10, 20, 30 i 45 tygodni niż u ptaków 2-dniowych.



Ryc. 7. Stężenie (średnie) N-acetyloserotoniny, NAS (A) oraz melatoniny, MLT (B) w szyszynkach indyków w wieku 2, 7, 14, 28 dni oraz 10, 20, 30, 45 tygodni. Belka pozioma przedstawia fazy jasne i ciemne cyklu dobowego. Litery na wykresach pokazują różnice między grupami wiekowymi w każdym punkcie czasowym w teście Duncana. Litery pod wykresami pokazują różnice między punktami czasowymi w grupie w teście Duncana. Te same litery oznaczają średnie, które nie różnią się istotnie.

Przebieg dobowych zmiany stężenia NAS różnił się znacznie pomiędzy poszczególnymi grupami wiekowymi (Ryc. 7A). U indyków w wieku 2 dni poziom NAS wzrósł około 2-krotnie w trakcie czterech pierwszych godzin od rozpoczęcia fazy ciemnej, a następnie pozostał na stosunkowo stabilnym poziomie. U starszych ptaków stężenie NAS stopniowo wzrastało w pierwszej części fazy ciemnej, a następnie spadało. Wartości maksymalne stężeń występowały wcześniej u indyków w wieku 7, 14, 28 dni i 10 tygodni niż u starszych ptaków.

Melatonina

Stężenie MLT było istotnie wyższe podczas fazy jasnej między godziną 12:00 a 18:00 u indyków w wieku 2 dni niż u starszych ptaków, ale różnice były znacznie mniejsze w porównaniu ze stwierdzonymi w poziomie NAS (Ryc. 7B). Podczas fazy ciemnej, pomiędzy godziną 22:00 a 04:00, stężenie MLT było istotnie niższe u 2-dniowych indyków niż u ptaków starszych. Poziomy MLT w szyszynkach ptaków w wieku 7 i 14 dni były zbliżone oraz około 2-krotnie wyższe niż u 2-dniowych indyków. Z kolei, w porównaniu z wartościami maksymalnymi obserwowanymi u ptaków w wieku od 4 do 45 tygodni były około 2-krotnie niższe. Maksymalne stężenia melatoniny

u indyków w wieku 20 – 45 tygodni były nieznacznie niższe niż u zwierząt w wieku 4 oraz 10 tygodni. Dobowy profil zmian stężenia MLT był zbliżony do opisanego dla NAS.

Kwas 5-hydroksyindolooctowy oraz 5-hydroksytryptofol

W przeciwieństwie do 5-HT, stężenie 5-HIAA było istotnie wyższe w szyszynkach indyków 2-dniowych niż ptaków 7-dniowych i 14-dniowych (Ryc. 8A). Poziom 5-HIAA w szyszynce u 28-dniowych ptaków był zbliżony do tego u 2-dniowych indyków. U zwierząt w wieku 10, 20, 30 i 45 tygodni stężenie 5-HIAA było istotnie niższe niż u indyków w wieku 28 dni. Stężenia 5-HIAA między godziną 08:00 a 20:00 były również istotnie niższe u 45-tygodniowych zwierząt w porównaniu z 10-tygodniowymi.

Stężenie 5-HIAA wykazywało istotne zmiany dobowe we wszystkich badanych grupach indyków, a przebieg tych zmian był podobny do specyficznych dla wieku dobowych wahań poziomu 5-HT (Ryc. 8A).

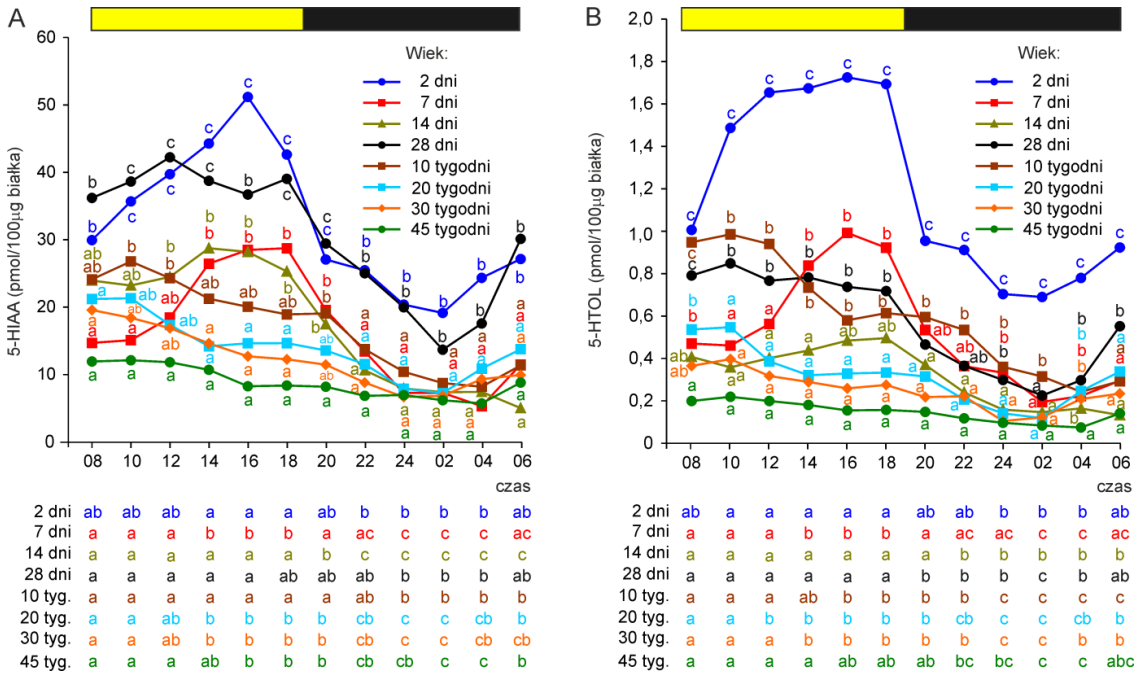
Podczas rozwoju powylęgowego stężenie 5-HTOL w szyszynce ulegało obniżeniu do 14. dnia życia, z znacznym spadkiem między 2. a 7. dniem (Ryc. 8B). Następnie u indyków w wieku 4 i 10 tygodni zwiększyło się do poziomów znacznie wyższych niż występujące u ptaków 14-dniowych, jednak nie we wszystkich punktach czasowych stwierdzono istotne różnice, ze względu na różny przebieg profili dobowych zmian stężenia 5-HTOL w tych grupach zwierząt. Stężenia 5-HTOL były istotnie niższe między godziną 08:00 a 02:00 u indyków w wieku 20 oraz 30 tygodni niż u zwierząt w wieku 10 tygodni. Dalszy spadek poziomu 5-HTOL stwierdzono u 45-tygodniowych indyków.

Stężenia 5-HTOL zmieniały się istotnie w ciągu doby. Przebieg tych zmian różnił się w zależności od wieku ptaków i był zbliżony do zmian opisanych dla 5-HT (Ryc. 8B).

Kwas 5-metoksyindolooctowy oraz 5-metoksytryptofol

W przeciwieństwie do 5-HIAA, najniższe stężenia jego metabolitu – 5-MIAA stwierdzono u 2-dniowych i 7-dniowych indyków (Ryc. 9A). Stężenia 5-MIAA między godziną 08:00 a 20:00 były istotnie wyższe u ptaków w wieku 14 dni niż u ptaków młodszych. U indyków w wieku 4 i 10 tygodni poziom 5-MIAA w szyszynce był istotnie wyższy w porównaniu z młodszymi ptakami we wszystkich punktach

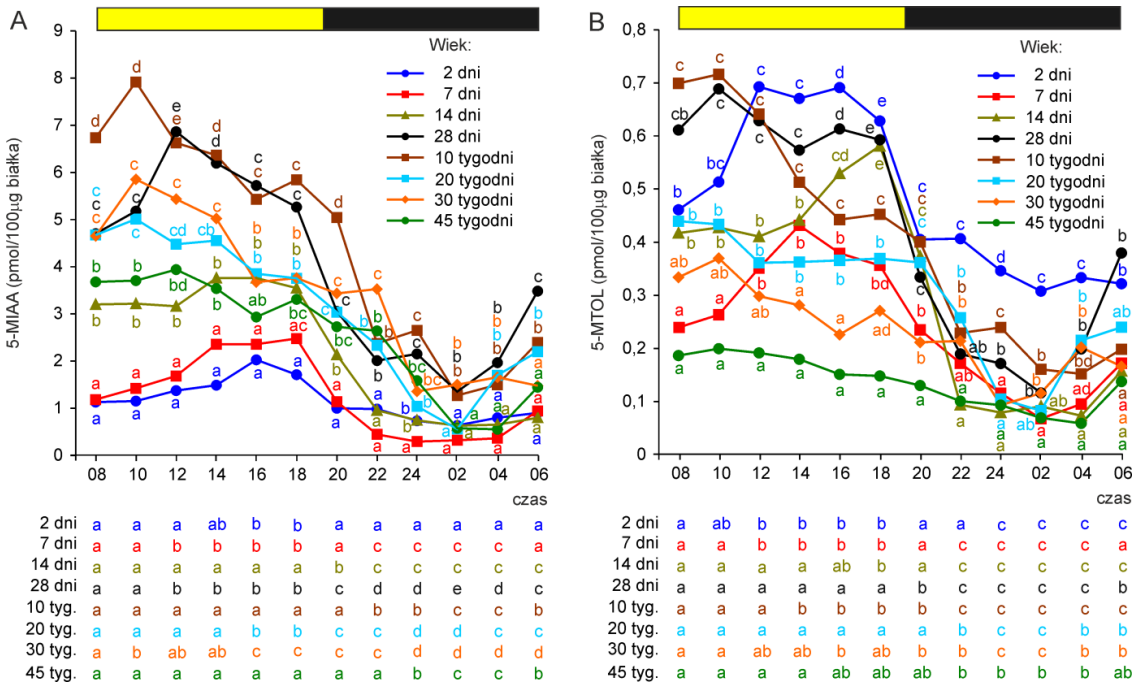
czasowych. Z kolei, poziom 5-MIAA był istotnie niższy u 20-, 30- i 45-tygodniowych indyków w porównaniu z 10-tygodniowymi indykami podczas dnia, ale nie w trakcie nocy.



Ryc. 8. Stężenie (średnie) kwasu 5-hydroksyindolooctowego, 5-HIAA (A) oraz 5-hydroksytryptofolu, 5-HTOL (B) w szyszynkach indyków w wieku 2, 7, 14, 28 dni oraz 10, 20, 30, 45 tygodni. Belka pozioma przedstawia fazę jasną i ciemną cyklu dobowego. Litery na wykresach pokazują różnice między grupami wiekowymi w każdym punkcie czasowym w teście Duncana. Litery pod wykresami pokazują różnice między punktami czasowymi w grupie w teście Duncana. Te same litery oznaczają średnie, które nie różnią się istotnie.

Stężenia 5-MIAA zmieniały się istotnie w przebiegu cyklu dobowego we wszystkich grupach indyków (Ryc. 9A). Poziomy 5-MIAA w szyszynkach 2-dniowych indyków były istotnie wyższe pomiędzy godziną 10:00 a 18:00 niż pomiędzy 20:00 a 06:00. U ptaków w wieku 7 i 14 dni stężenia były istotnie wyższe między 08:00 a 20:00 niż między 22:00 a 04:00 (lub 06:00 u ptaków 14-tygodniowych). Najwyższe poziomy 5-MIAA u tych ptaków odnotowano w drugiej połowie fazy jasnej. Natomiast u starszych ptaków stężenia 5-MIAA były najwyższe w pierwszej połowie fazy jasnej. U 28-dniowych indyków stężenia 5-MIAA były istotnie wyższe podczas dnia niż podczas nocy, osiągając wartość najwyższą o godzinie 12:00, a najniższą o godzinie 02:00. Podobny dobowy profil poziomu 5-MIAA, ale z pikiem o godzinie 10:00 stwierdzono u 10-, 20- i 30-tygodniowych indyków. U indyków w wieku 45 tygodni poziomy 5-

MIAA były tylko nieznacznie wyższe w pierwszej połowie fazy jasnej niż w drugiej, a najniższe stężenia 5-MIAA odnotowano o godzinie 02:00 i 04:00.



Ryc. 9. Stężenie (średnie) kwasu 5-metoksyindolooctowego, 5-MIAA (A) oraz 5-metoksytryptofolu, 5-MTOL (B) w szyszynkach indyków w wieku 2, 7, 14, 28 dni oraz 10, 20, 30, 45 tygodni. Belka pozioma przedstawia fazę jasną i ciemną cyklu dobowego. Litery na wykresach pokazują różnice między grupami wiekowymi w każdym punkcie czasowym w teście Duncana. Litery pod wykresami pokazują różnice między punktami czasowymi w grupie w teście Duncana. Te same litery oznaczają średnie, które nie różnią się istotnie.

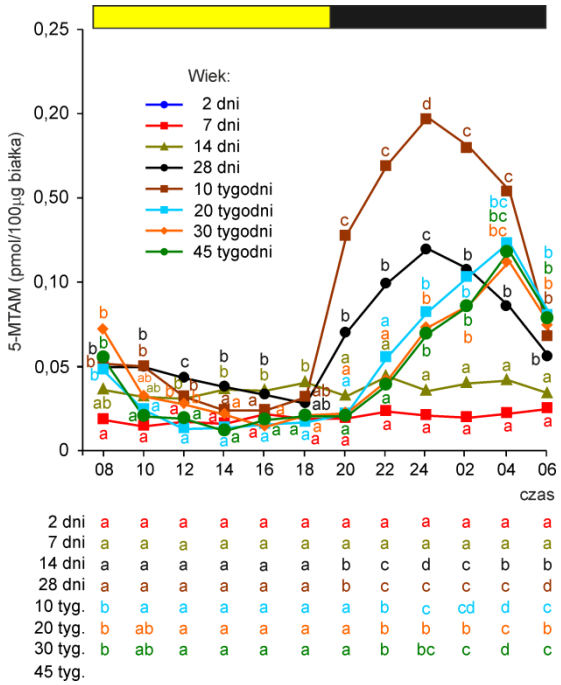
Stężenie 5-MTOL zmniejszało się w pierwszych dniach po wykluciu i było istotnie niższe u 7-dniowych indyków niż u 2-dniowych ptaków we wszystkich punktach czasowych (Ryc. 9B). Następnie stężenie tej aminy wzrastało i wykazywało wyraźniejsze dobowe wahania. U indyków w wieku 14 i 28 dni oraz 10 tygodni stężenia 5-MTOL osiągnęły poziomy występujące u ptaków 2-dniowych podczas fazy jasnej, jednak były one znacznie niższe niż u indyków 2-dniowych podczas fazy ciemnej. W porównaniu z 10-tygodniowymi indykami, stężenia 5-MTOL były istotnie niższe u ptaków w wieku 20, 30 i 45 tygodni podczas całej fazy jasnej oraz podczas fazy ciemnej o godzinie 24:00 i 02:00. Istotne różnice odnotowano również między ptakami w wieku 20, 30 i 45 tygodni.

We wszystkich badanych grupach indyków zaobserwowano dobowe wahania stężenia 5-MTOL, z wyższymi poziomami w czasie fazy jasnej w porównaniu z ciemną (Ryc. 9B). Przebieg tych wahań różnił się w poszczególnych grupach wiekowych. U indyków 2-, 7- i 14-dniowych stężenie 5-MTOL było wyższe w drugiej połowie fazy

jasnej w stosunku do pierwszej połowy tej fazy, natomiast u zwierząt starszych najwyższe stężenia 5-MTOL odnotowano o godzinie 10:00, czyli wkrótce po rozpoczęciu fazy jasnej. We wszystkich badanych grupach poziom tego związku ulegał wyraźnemu obniżeniu po rozpoczęciu nocy.

5-metoksytryptamina oraz 5-metoksytryptofan

5-MTAM była niewykrywalna w szyszynkach 2-dniowych indyków. Poziom 5-MTAM przekraczał dolny limit pomiaru metody u ptaków w wieku 7 i 14 dni i był wyższy u 14-dniowych indyków niż u 7-dniowych, ale nie wykazywał wahań dobowych (Ryc. 10).



Ryc. 10. Stężenie (średnie) 5-metoksytryptaminy, 5-MTAM w szyszynkach indyków w wieku 2, 7, 14, 28 dni oraz 10, 20, 30, 45 tygodni. Belka pozioma przedstawia fazę jasną i ciemną cyklu dobowego. Litery na wykresach pokazują różnice między grupami wiekowymi w każdym punkcie czasowym w teście Duncana. Litery pod wykresami pokazują różnice między punktami czasowymi w grupie w teście Duncana. Te same litery oznaczają średnie, które nie różnią się istotnie.

Nocny wzrost stężenia 5-MTAM po raz pierwszy odnotowano u 28-dniowych indyków. Poziom tej aminy podczas nocy był wyższy u indyków w wieku 10 tygodni w porównaniu do ptaków w wieku 28 dni. U indyków w wieku 20, 30 i 45 tygodni nocne poziomy 5-MTAM osiągały podobne wartości jak u zwierząt 28-dniowych, ale występowały w późniejszych godzinach niż u ptaków młodszych.

Poziom 5-MTRP był poniżej dolnego limitu detekcji metody we wszystkich grupach wiekowych.

4.4.2. *Doświadczenie 2 - Wpływ barwy i intensywności światła monochromatycznego na metabolizm związków indolowych związanych z syntezą melatoniny*

4.4.2.1. Aktywność enzymów szlaku syntezy melatoniny

Aktywność enzymatyczną wyrażono w przeliczeniu na ilość wytworzonego produktu przez całą szyszynkę. Dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała istotny wpływ warunków oświetlenia na aktywność TPH, AADC oraz AA-NAT. Wpływ czasu pobierania próbek był istotny w analizach danych z pomiarów TPH i AA-NAT. W przypadku obu enzymów stwierdzono istotne interakcje między warunkami oświetlenia a czasem pobrania próbek.

Hydroksylaza tryptofanowa

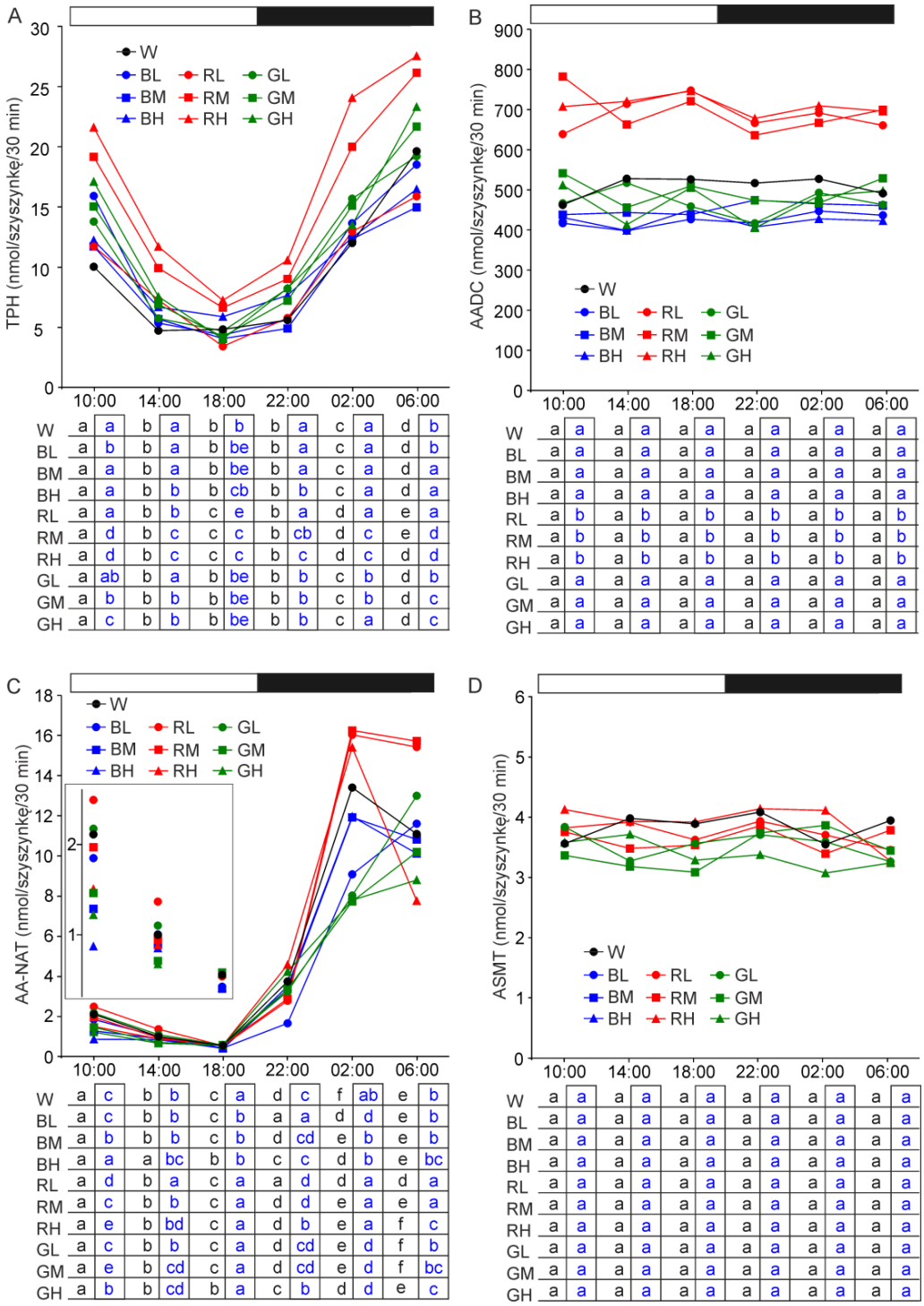
Aktywność TPH w szyszynce wykazała wydatne zmiany dobowe (Ryc. 11A). We wszystkich grupach charakteryzowała się istotnie wyższy poziomem o godzinie 02:00, 06:00 oraz 10:00 w stosunku do godziny 14:00, 18:00 i 22:00, zaś różnica pomiędzy szczytem aktywności oraz jej najniższym poziomem była czterokrotna. U ptaków utrzymywanych w świetle czerwonym z grupy RM oraz RH aktywność enzymatyczna TPH była istotnie wyższa w każdym punkcie czasowym w stosunku do grup ptaków przebywających w świetle niebieskim i zielonym.

Dekarboksylaza aromatycznych aminokwasów

Aktywność AADC nie ulegała zmianom podczas cyklu dobowego we wszystkich badanych grupach zwierząt (Ryc. 11B). Ptaki utrzymywane w świetle czerwonym bez względu na natężenie światła wykazały istotnie wyższą aktywność tego enzymu w stosunku do pozostałych grup badawczych utrzymywanych w świetle monochromatycznym i grupy kontrolnej.

N-acetylotransferaza aryloalkyloaminowa

Aktywność AA-NAT we wszystkich badanych grupach zwierząt wykazywała rytm dobowy, z najniższym poziomem o godzinie 18:00, a najwyższym o godzinie 02:00 lub 06:00 (Ryc. 11C).



Ryc. 11. Aktywność (średnie) hydroksylazy tryptofanowej, TPH (A), dekarboksylazy aminokwasów aromatycznych, AADC (B), N-acetylotransferazy aryloalkyloaminowej, AA-NAT (C) i O-metylotransferazy N-acetyloserotoniny, ASMT (D) w szyszynkach indyków utrzymywanych: W – w świetle białym o natężeniu 16 lux, BL – w świetle niebieskim 16 lux, BM – w świetle niebieskim 32 lux, BH – w świetle niebieskim 64 lux, RL – w świetle czerwonym 16 lux, RM – w świetle czerwonym 32 lux, RH – w świetle czerwonym 64 lux, GL – w świetle zielonym 16 lux, GM – w świetle zielonym 32 lux, GH – w świetle zielonym 64 lux. Belka pozioma przedstawia fazę jasną i ciemną cyklu dobowego. W tabeli pod wykresem czarne litery pokazują różnice między punktami czasowymi w grupie (poziomo), a niebieskie różnice między grupami w każdym punkcie czasowym (pionowo) w teście Duncana. Te same litery oznaczają średnie, które nie różnią się istotnie.

Przebieg dobowych zmian aktywności enzymatycznej różnił się istotnie pomiędzy grupami. Aktywność AA-NAT o godzinie 10:00 była istotnie niższa u ptaków przebywających w świetle monochromatycznym o większym natężeniu niż o mniejszym natężeniu. Ponadto, przy natężeniu 16 lux aktywność była niższa u ptaków przebywających w świetle niebieskim w porównaniu z grupą utrzymywanych w świetle czerwonym i zielonym. Podobne różnice między badanymi grupami zwierząt występowały o godzinie 14:00.

O godzinie 18:00 aktywność AA-NAT była istotnie niższa u ptaków utrzymywanych w świetle niebieskim niż u zwierząt z pozostałych grup badawczych oraz grupy kontrolnej. Znaczący wzrost aktywności AA-NAT był obserwowany o 22:00 (1 h po rozpoczęciu fazy ciemnej) i był on istotnie niższy u zwierząt eksponowanych na światło o natężeniu 16 lux niż 32 i 64 lux. Wzrost aktywności enzymu był również istotnie niższy u indyków eksponowanych na światło niebieskie w stosunku do tych, które były utrzymywane w oświetleniu czerwonym i zielonym o tej samej intensywności (z wyjątkiem 32 lux). Najwyższą aktywność AA-NAT stwierdzono o godzinie 02:00 z wyjątkiem ptaków z grup BL oraz GL, GM i GH, u których szczyt zaobserwowano o godzinie 06:00. Aktywności AA-NAT o godzinie 02:00 była największa u ptaków przebywających świetle czerwonym, a najmniejsza u zwierząt trzymanych w świetle zielonym. Różnice między maksymalną a minimalną aktywnością AA-NAT w trakcie doby wynosiły 24 - 29 razy u zwierząt z grup BL, BM, BH, RL, RM, RH i W, zaś tylko 13 razy u ptaków z grup GL, GM i GH.

O-metylotransferaza N-acetyloserotoniny

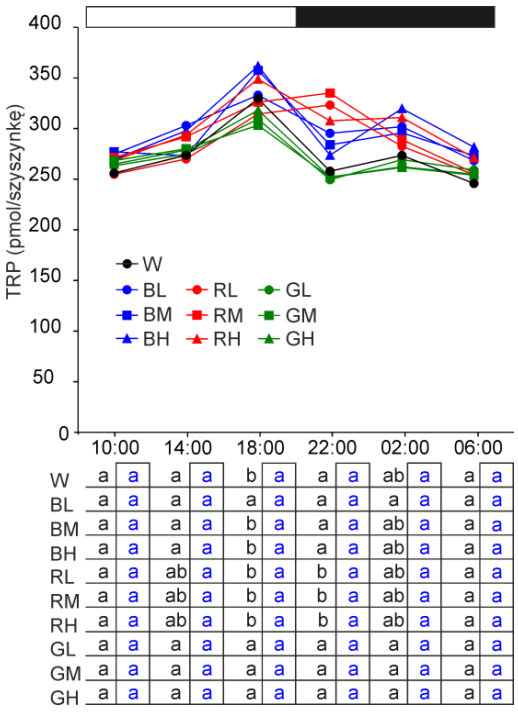
Badania nie wykazały istotnych różnic w dobowej aktywności ASMT oraz pomiędzy poszczególnymi grupami zwierząt (Ryc. 11 D).

4.4.1.2. Stężenia związków indolowych

Zawartość indoli wyrażono w przeliczeniu na cały gruczoł. Dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała istotny wpływ warunków oświetlenia i czasu pobrania próbek na zawartość badanych pochodnych tryptofanu. Stwierdzono również istotne interakcje między badanymi czynnikami w przypadku wszystkich analizowanych pochodnych tryptofanu.

Tryptofan

Średnia zawartość TRP wynosiła 245,8-361,8 pmol/szyszynkę (Ryc. 12) i charakteryzowała się dużą zmiennością osobniczą. Dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała brak istotnego wpływu barwy światła monochromatycznego oraz godziny pobrania narządów na zawartość tego związku indolowego. Jednakże, według testu Duncana poziom TRP był istotnie wyższy o godzinie 18:00 w porównaniu z godziną 10:00, 14:00 i 06:00 u indyków z grupy kontrolnej oraz u ptaków z grup BM i BH. Poziom tego związku był również istotnie wyższy o godzinie 18:00 i 22:00 w porównaniu z godziną 10:00 i 06:00 u ptaków utrzymywanych w świetle czerwonym. Nie wykazano istotnych statystycznie zmian dobowych w zawartości TRP u indyków przebywających w świetle zielonym oraz w świetle niebieskim o intensywności 16 lux. Jednakże, warto zaznaczyć, że przebieg zmian zawartości TRP u tych zwierząt był podobny do obserwowanego w grupie kontrolnej.



	10:00		14:00		18:00		22:00		02:00		06:00	
W	a	a	a	a	b	a	a	a	ab	a	a	a
BL	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
BM	a	a	a	a	b	a	a	a	ab	a	a	a
BH	a	a	a	a	b	a	a	a	ab	a	a	a
RL	a	a	ab	a	b	a	b	a	ab	a	a	a
RM	a	a	ab	a	b	a	b	a	ab	a	a	a
RH	a	a	ab	a	b	a	b	a	ab	a	a	a
GL	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
GM	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
GH	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

Ryc. 12. Zawartość tryptofanu, TRP w szyszynkach indyków utrzymywanych: W – w świetle białym o natężeniu 16 lux, BL – w świetle niebieskim 16 lux, BM – w świetle niebieskim 32 lux, BH – w świetle niebieskim 64 lux, RL – w świetle czerwonym 16 lux, RM – w świetle czerwonym 32 lux, RH – w świetle czerwonym 64 lux, GL – w świetle zielonym 16 lux, GM – w świetle zielonym 32 lux, GH – w świetle zielonym 64 lux. Pozostałe objaśnienia na rycinie 11.

5-hydroksytryptofan

Zawartość 5-HTRP wykazywała rytm dobowy z istotnie wyższym poziomem o godzinie 10:00, 02:00 i 06:00 niż o godzinie 14:00, 18:00 oraz 22:00 we wszystkich

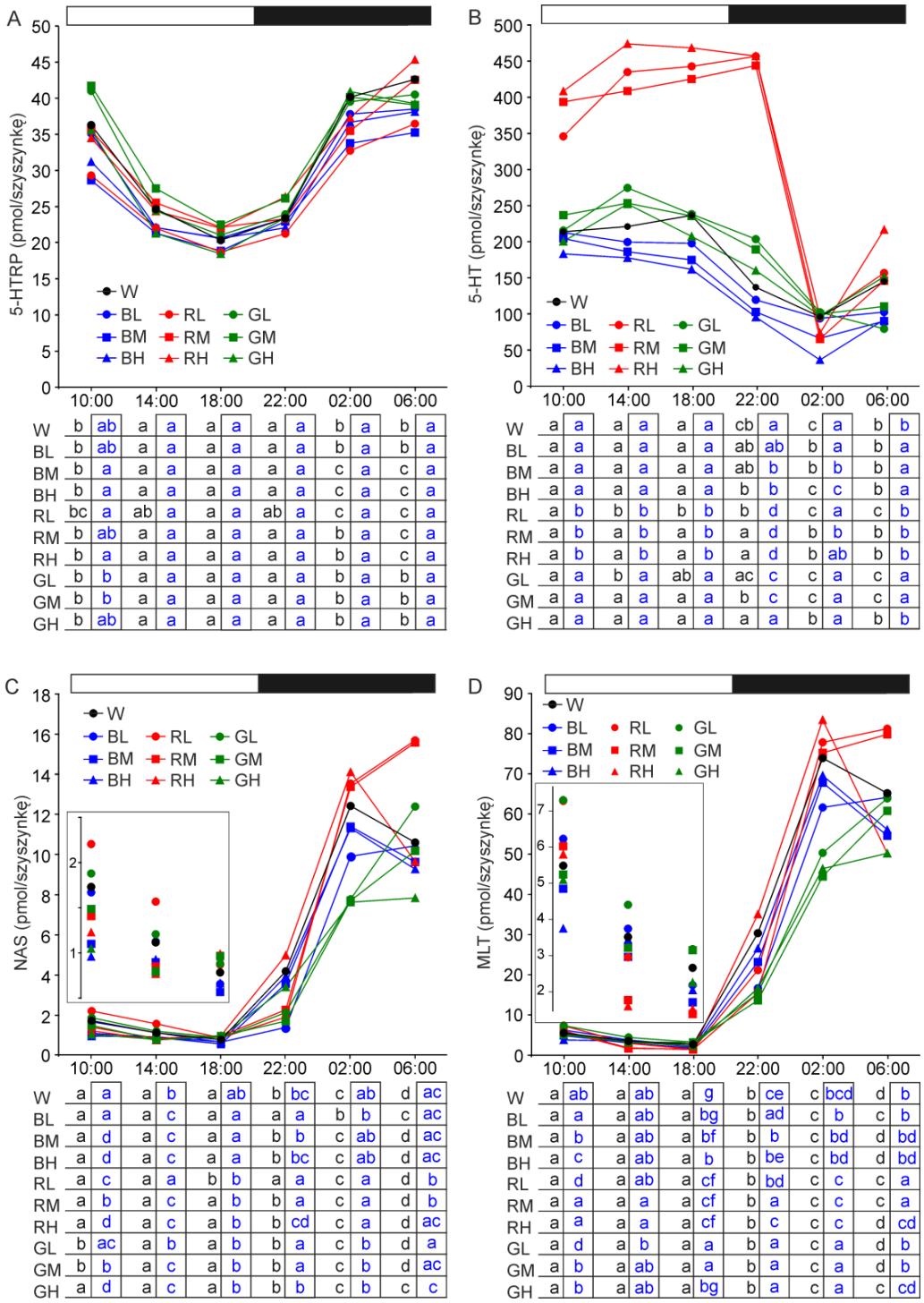
grupach ptaków (Ryc. 13A). Poziom 5-HTRP był również istotnie wyższy o godzinie 02:00 i 06:00 w porównaniu z 10:00 u ptaków z grup BM i BH, a także o godzinie 06:00 w stosunku do 02:00 i 10:00 u ptaków z grup RM i RH. Różnica pomiędzy najwyższą i najniższą zawartością 5-HTRP nie przekraczała dwukrotności we wszystkich badanych grupach. Istotne różnice międzygrupowe w poziomie tego związku zaobserwowano jedynie o godzinie 10:00, kiedy zawartość 5-HTRP u ptaków z grup GL i GM była istotnie wyższa niż u indyków przebywających w świetle niebieskim.

Serotonina

Zawartość 5-HT charakteryzowała się wyraźnym rytmem dobowym z istotnie wyższym poziomem o godzinie 10:00, 14:00 i 18:00 w porównaniu z godziną 02:00 u wszystkich badanych grup zwierząt (Ryc. 13B). Barwa światła monochromatycznego miała wpływ zarówno na poziom 5-HT, jak i na przebieg zmian dobowych. Zawartość tego związku o godzinie 10:00, 14:00, 18:00 i 22:00 była dwukrotnie wyższa u ptaków przebywających w świetle czerwonym niż u indyków utrzymywanych w innych barwach światła. U ptaków z grup RL, RM, i RH stwierdzono ponad 4-krotny spadek poziomu 5-HT pomiędzy godziną 22:00 i 02:00, do poziomu występującego u indyków z pozostałych grup. Zawartość 5-HT była istotnie wyższa o godzinie 22:00 niż o 02:00 (i w większości przypadków o 06:00) u indyków z grup RL, RM, i RH, GM i GH oraz BH. Nie zaobserwowano takich różnic u ptaków z grup GL, BL i BM oraz W. Istotne różnice międzygrupowe w zawartości 5-HT zanotowano także o godzinie 02:00 i 06:00.

N-acetyloserotonina

Zawartość NAS ulegała istotnym zmianom dobowym we wszystkich grupach indyków (Ryc. 13C). Wartości minimalne były notowane o godzinie 18:00 i oscylowały w zakresie od 0,56 od 0,98 pmol/szyszynkę w zależności od warunków oświetlenia, osiągając najniższy poziom u indyków utrzymywanych w świetle niebieskim. Wartości maksymalne wynosiły od 7,89 do 15,69 pmol/szyszynkę i występowały o 02:00 lub 06:00, w zależności od warunków oświetlenia.



Ryc. 13. Zawartość 5-hydroksytryptofanu, 5-HTRP (A), serotoniny, 5-HT (B), N-acetyloserotoniny, NAS (C) oraz melatoniny, MLT (B) w szyszynkach indyków utrzymywanych: W – w świetle białym o natężeniu 16 lux, BL – w świetle niebieskim 16 lux, BM – w świetle niebieskim 32 lux, BH – w świetle niebieskim 64 lux, RL – w świetle czerwonym 16 lux, RM – w świetle czerwonym 32 lux, RH – w świetle czerwonym 64 lux, GL – w świetle zielonym 16 lux, GM – w świetle zielonym 32 lux, GH – w świetle zielonym 64 lux. Pozostałe objaśnienia na rycinie 11.

Przebieg zmian dobowych i zawartość NAS różniły się w zależności od warunków oświetlenia. Godzinę po rozpoczęciu fazy jasnej (o 10:00) zawartość NAS była istotnie większa u zwierząt przebywających w świetle czerwonym o natężeniu 16 lux niż utrzymywanych w świetle niebieskim. Poziom tego związku był również większy u indyków przebywających w niższych intensywnościach światła w porównaniu wyższymi bez względu na barwę. O godzinie 14:00 zawartość NAS uległa obniżeniu w porównaniu z godziną 10:00 i była istotnie wyższa u indyków z grupy RL niż u ptaków z pozostałych grup. O godzinie 18:00 różnice między grupami były najmniejsze, aczkolwiek najniższy poziom NAS występował u zwierząt utrzymywanych w świetle niebieskim. Następnie, godzinę po zapadnięciu ciemności, poziom NAS istotnie wzrastał we wszystkich grupach badawczych, szczególnie wydatnie u ptaków utrzymywanych w wysokich intensywnościach światła monochromatycznego podczas dnia. O godzinie 02:00 zawartość tego związku indolowego była istotnie wyższa u zwierząt z grupy RL, RM i RH niż GL, GM, GH i BL. Poziom NAS znacząco spadł o godzinie 06:00 w grupach RH, BM i BH oraz W. W pozostałych grupach odnotowano istotny wzrost zawartości NAS między 02:00 i 06:00.

Melatonina

Dobowy rytm fluktuacji zawartości MLT był zbliżony do rytmu zmian poziomu NAS (Ryc. 13D). MLT wykazała jednak większą amplitudę zmian, a osiągane wartości były wyższe niż w przypadku NAS. Najniższy poziom MLT notowany w dzień wynosił między 1,38 a 3,15 pmol/szyszynkę, a najwyższy nocny poziom tego hormonu od 50,2 do 83,4 pmol/szyszynkę. Międzygrupowe różnice w zawartości MLT były bardzo podobne do opisanych w przypadku NAS.

Kwas 5-hydroksyindolooctowy oraz 5-hydroksytryptofol

Dobowe zmiany oraz różnice międzygrupowe w zawartości 5-HIAA i 5-HTOL (Ryc.14A, B) były zbliżone do opisanych dla 5-HT. Wyjątek stanowiła niższa amplituda zmian poziomów 5-HIAA i 5-HTOL w porównaniu z zawartością 5-HT u ptaków utrzymywanych w świetle czerwonym. Różnice w zawartościach 5-HIAA i 5-HTOL pomiędzy indykami utrzymywanymi w świetle czerwonym i ptakami z innych grup były analogiczne do różnic w poziomie 5-HT.

Kwas 5-metoksyindolooctowy oraz 5-metoksytryptofol

Zawartość 5-MIAA charakteryzowała się wyraźnym rytmem dobowym z najwyższym poziomem między 10:00 i 18:00 we wszystkich badanych grupach indyków (Ryc. 14C). O godzinie 22:00 poziom tego związku był istotnie niższy w porównaniu z godziną 10:00, 14:00 i 18:00. Najniższe wartości zaobserwowano o 02:00 lub 06:00 w zależności od warunków oświetlenia.

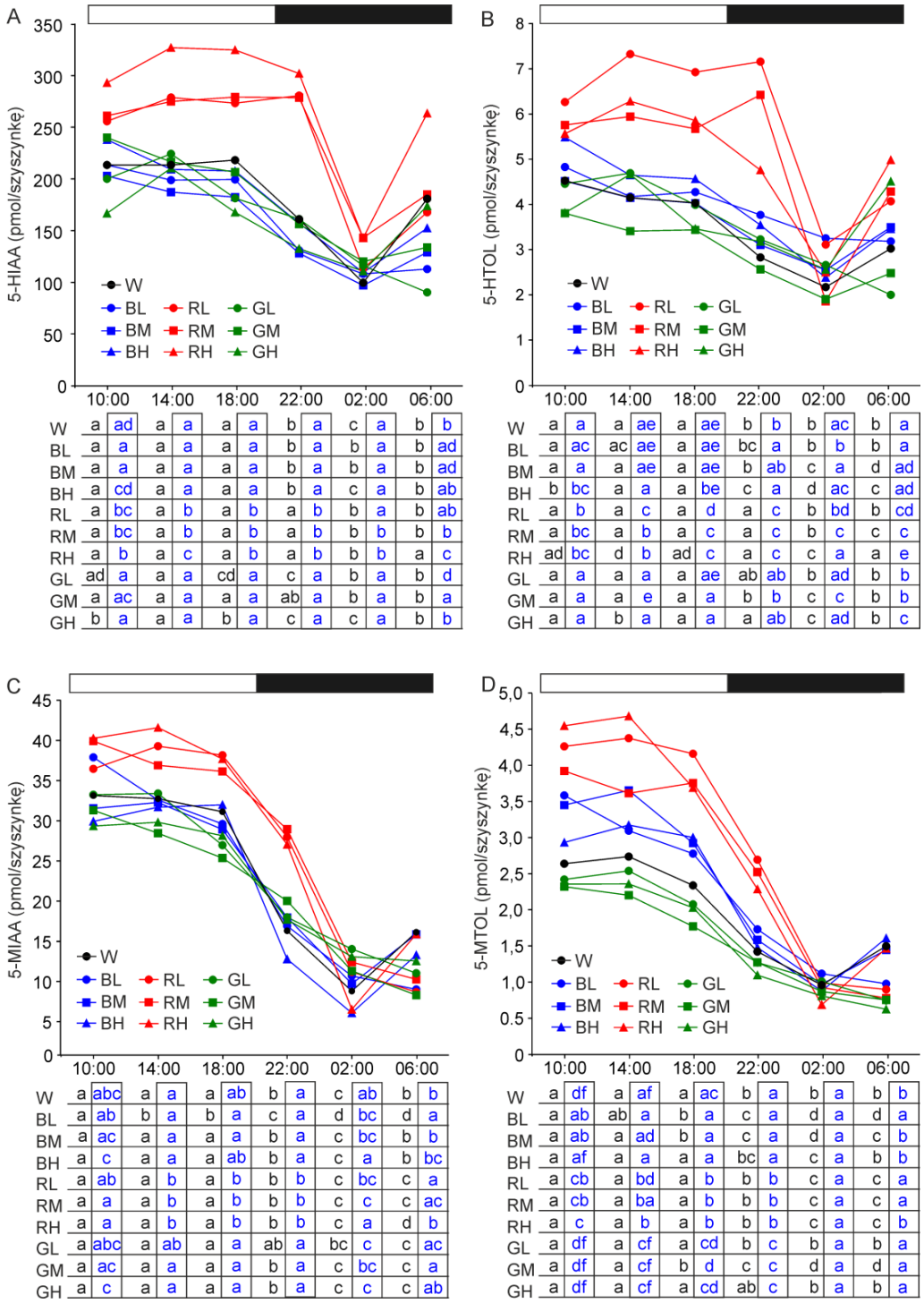
U ptaków utrzymywanych w świetle czerwonym zawartość 5-MIAA o godzinie 14:00, 18:00 i 22:00 była istotnie wyższa niż w innych grupach. Różnice te były mniej wyraźne o 10:00 (Ryc. 14C). O godzinie 02:00 najwyższy poziom 5-MIAA występował u ptaków z grup GL i GM, a najniższy - u indyków z grup RH i BH. Podobnie do 5-HT i 5-HIAA, zawartość 5-MIAA wzrosła między 02:00 i 06:00 u indyków BM i BH oraz RH i W, a nieznacznie spadła w pozostałych grupach.

Poziom 5-MTOL był prawie 10-krotnie niższy w porównaniu z 5-MIAA. Dobowe zmiany zawartości 5-MTOL były zbliżone do opisanych dla 5-MIAA, jednak z wyraźniej zaznaczonymi różnicami międzygrupowymi (Ryc. 14D). Poziom tego związku o 18:00 i 22:00 był istotnie wyższy u indyków utrzymywanych w świetle czerwonym w porównaniu do światła niebieskiego, zielonego i białego oraz w świetle niebieskim w porównaniu z zielonym.

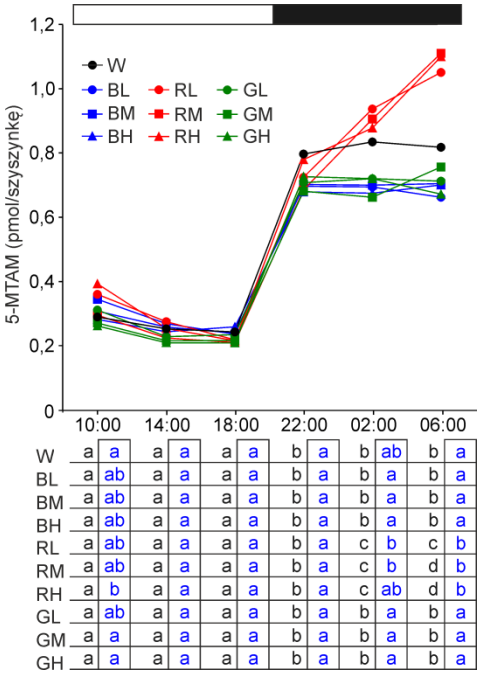
5-metoksytryptamina oraz 5-metoksytryptofan

Zawartość 5-MTAM we wszystkich grupach indyków wykazała rytm dobowy z istotnie wyższymi wartościami podczas fazy ciemnej (Ryc. 15). Zawartość tego związku nie uległa istotnym zmianom pod wpływem światła niebieskiego i zielonego w porównaniu do światła białego. Z kolei u zwierząt utrzymywanych w świetle czerwonym zaobserwowano wyraźny wzrost zawartości 5-MTAM o godzinie 02:00 i 06:00 w porównaniu z godziną 22:00. Zawartość MLT była wyższa o godzinie 02:00 i 06:00 w grupach RL, RM i RH niż w pozostałych grupach indyków przebywających w świetle monochromatycznym.

Poziom 5-MTRP w szyszynce indyka domowego był poniżej limitu detekcji.



Ryc. 14. Zawartość kwasu 5-hydroksyindolooctowego,5-HIAA (A), 5-hydroksytryptofolu, 5-HTOL (B), kwasu 5-metoksyindolooctowego, 5-MIAA (A), 5-metoksytryptofolu, 5-MTOL w szyszynkach indyków utrzymywanych: W – w świetle białym o natężeniu 16 lux, BL – w świetle niebieskim 16 lux, BM – w świetle niebieskim 32 lux, BH – w świetle niebieskim 64 lux, RL – w świetle czerwonym 16 lux, RM – w świetle czerwonym 32 lux, RH – w świetle czerwonym 64 lux, GL – w świetle zielonym 16 lux, GM – w świetle zielonym 32 lux, GH – w świetle zielonym 64 lux. Pozostałe objaśnienia na rycinie 11.



Ryc. 15. Zawartość kwasu 5-metoksytryptaminy, 5-MTAM w szyszynkach indyków utrzymywanych: W – w świetle białym o natężeniu 16 lux, BL – w świetle niebieskim 16 lux, BM – w świetle niebieskim 32 lux, BH – w świetle niebieskim 64 lux, RL – w świetle czerwonym 16 lux, RM – w świetle czerwonym 32 lux, RH – w świetle czerwonym 64 lux, GL – w świetle zielonym 16 lux, GM – w świetle zielonym 32 lux, GH – w świetle zielonym 64 lux. Pozostałe objaśnienia na rycinie 11.

4.5. Dyskusja

W pracy po raz pierwszy oznaczono aktywność wszystkich czterech enzymów biorących udział w syntezie MLT oraz zawartość 11 związków indolowych związanych z tym procesem w tej samej próbce materiału biologicznego. Uzyskane wyniki umożliwiły szczegółową analizę zmian zachodzących w metabolizmie indoli w szyszynce indyka domowego podczas rozwoju powylęgowego, jak również pod wpływem światła monochromatycznego o różnej barwie i intensywności.

Badania dotyczące zmian w metabolizmie indoli zachodzących w szyszynce w trakcie rozwoju powylęgowego obejmowały okres od wyklucia poprzez dojrzewanie płciowe (początek nieśności w wieku 24-25 tygodni) aż do osiągnięcia dojrzałości somatycznej w wieku około 30 tygodni, jak również kolejne 15 tygodni życia ptaków. Na podstawie uzyskanych wyników można wyróżnić cztery fazy w przebiegu tych zmian. Pierwsza faza, obejmująca okres od wyklucia piskląt do 14. dnia życia, charakteryzuje się bardzo dużymi zmianami w poziomach poszczególnych związków, w tym: (i) spadkiem stężenia 5-HTRP, (ii) wzrostem stężenia 5-HT oraz (iii) wzrostem

stężenia MLT, 5-MIAA i 5-MTAM. Spadek poziomu 5-HTRP jest prawdopodobnie związany z intensywnym wykorzystaniem tego związku do syntezy 5-HT pod wpływem zwiększonej aktywności AADC. Występuje on pomimo około 2-krotnego wzrostu nocnej aktywności TPH pomiędzy 2. a 14. dniem życia ptaków. Z kolei, analiza aktywności enzymów szlaku syntezy melatoniny oraz zawartości indoli w szyszynce wyraźnie wskazuje, że wzrost stężenia 5-HT jest skutkiem nie tylko zwiększonej syntezy tego związku, ale również zmniejszonej degradacji w procesie oksydatywnej deaminacji, co ma odzwierciedlenie w spadku stężeń 5-HIAA i 5-HTOL. W pracy nie badano aktywności oksydazy monoaminowej (MAO), dlatego też nie można w pełni wyjaśnić mechanizmu odpowiedzialnego za zredukowaną degradację 5-HT. Należy wziąć pod uwagę zarówno mniejszą aktywność MAO, jak i magazynowanie 5-HT w przestrzeni komórkowej niedostępnej dla tego enzymu. Badania przeprowadzone na szyszynkach embrionów gęsich wykazały, że mechanizm chroniący 5-HT przed degradacją przez MAO zaczyna rozwijać się już w życiu zarodkowym i jego rozwój jest kontynuowany po wykluciu [Hanuszewska i in., 2019; Ziółkowska i in., 2018]. Wzrost stężenia 5-metoksyindoli w trakcie pierwszej fazy zmian powylęgowych w metabolizmie indoli jest wynikiem aż 5-krotnego wzrostu aktywności enzymatycznej ASMT między 2. a 14. dniem po wykluciu. Następstwem zwiększonej aktywności ASMT jest spadek poziomu NAS i wzrost stężenia MLT, a także wzrost zawartości 5-MIAA. W przeciwieństwie do NAS i MLT, stężenie 5-HIAA jest 10-krotnie wyższe niż 5-MIAA, dlatego intensywność metylacji nie ma wpływu na poziom 5-HIAA. Co ciekawe, stężenie 5-MTOL obniża się między 2. a 7. dniem życia, a następnie znów wzrasta. Spadek prawdopodobnie wynika z bardzo dużego zmniejszenia się poziomu 5-HTOL oraz wysokiego powinowactwa ASMT do tej aminy. Synteza 5-MTAM na wykrywalnym poziomie rozpoczyna się w około 7. dnia rozwoju, ale nie wykazuje wahań dobowych.

Drugi etap powylęgowego rozwoju metabolizmu indoli w szyszynce charakteryzują wyniki uzyskane u indyków 28-dniowych. Na tym etapie zarówno aktywność enzymatyczna AA-NAT jak i stężenia NAS oraz MLT osiągnęły wartości maksymalne stwierdzone w trakcie całego doświadczenia. Aktywność AADC była ponad 20-krotnie wyższa niż w przypadku indyków 14-dniowych i również osiągnęła swoje maksimum dla całego doświadczenia. Zawartość 5-HT u ptaków 14-dniowych oraz 28-dniowych była podobna i jednocześnie najwyższa spośród badanych grup zwierząt. Jednakże stężenia 5-HIAA, 5-HTOL, 5-MIAA i 5-MTOL były dużo wyższe

w 28. dniu życia niż w 14., wyraźnie wskazując na intensywniejszą syntezę oraz degradację 5-HT na tym etapie rozwoju. Zawartość 5-MTAM była znacznie wyższa niż u ptaków młodszych oraz wykazała wahania dobowe. Poziom TRP w indyków 28-dniowych również osiągnął wartości najwyższe w całym doświadczeniu.

Profil metaboliczny indoli u indyków 10-tygodniowych opisuje trzecią fazę zmian rozwojowych w szyszynce. Cechuje się prawie 50% niższą koncentracją 5-HT i 5-HIAA w porównaniu do ptaków 28-dniowych. Z kolei zawartość 5-MIAA była na podobnym poziomie, co sugeruje wzrost intensywności metylacji. Stężenia NAS i MLT również nie wykazywały istotnych różnic między indykami 28-dniowymi i 10-tygodniowymi. Koncentracja 5-MTAM osiągnęła najwyższy poziom w całym doświadczeniu. Aktywność TPH była niższa na tym etapie rozwoju niż u młodszych indyków, natomiast nie zaobserwowano różnic w aktywności AADC i AA-NAT między drugim i trzecim stadium. Aktywność ASMT była najwyższą stwierdzoną w doświadczeniu.

Ostatni, czwarty etap, obejmuje okres od 20. do 45. tygodnia życia, w którego trakcie profil metaboliczny wykazuje niewielkie zmiany. Najbardziej charakterystyczną cechą tej fazy jest znacznie zmniejszona synteza, zawartość i degradacja 5-HT w porównaniu do poprzednich etapów. Zarówno aktywność enzymatyczna TPH jak i stężenie 5-HTRP były na najniższym poziomie w całym doświadczeniu. Aktywność AADC była mniejsza o około 25% w porównaniu do 4-tygodniowych indyków, natomiast stężenie 5-HT było od 5 do 10 razy niższe niż u tych ptaków. Stężenia 5-HIAA i 5-HTOL były od 2 do 4 razy niższe niż u 4-tygodniowych indyków. Spadki poziomu 5-MIAA i 5-MTOL były mniejsze niż ich substratów, prawdopodobnie dlatego, że aktywność ASMT zmniejszyła się tylko o 20%. Spadek metabolizmu 5-HT powoli postępował od 20. do 45. tygodnia życia. Należy podkreślić, że pomimo zmian stężeń 5-HT nie było wydatnych różnic w aktywności AA-NAT oraz w szczytowych nocnych poziomach NAS i MLT. Maksymalne stężenie 5-MTAM było niższe niż u ptaków 4- i 10-tygodniowych.

Zmiany strukturalne zachodzące w szyszynce indyka domowego w trakcie rozwoju powylęgowego były szczegółowo badane z użyciem technik mikroskopii świetlnej i elektronowej [Przybylska-Gornowicz i in., 2005; Petrusewicz-Kosińska i in., 2019a]. Uzyskane wyniki pozwalają na powiązanie zmian metabolizmu indoli ze zmianami w budowie histologicznej i ultrastrukturalnej tego narządu. Miąższ szyszynki indyka charakteryzuje się budową pęcherzykową przez cały okres życia, jednakże

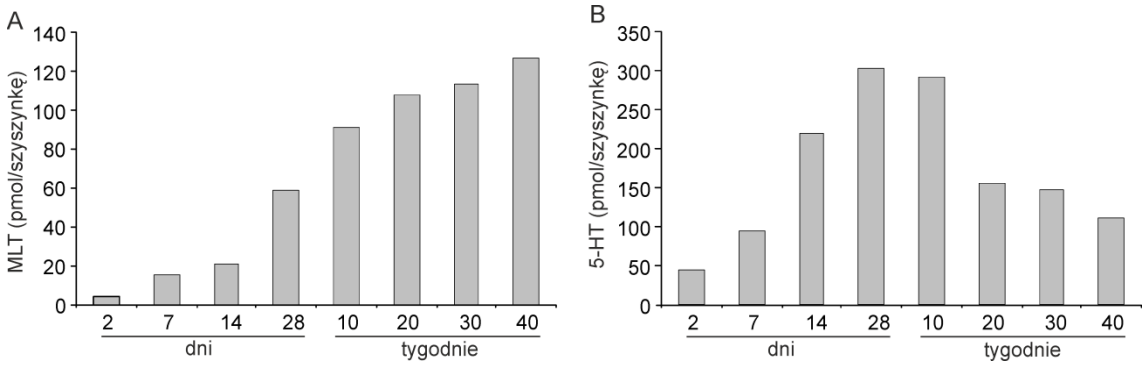
podczas rozwoju powylęgowego dochodzi do wielu istotnych zmian strukturalnych w obrębie narządu [Przybylska-Gornowicz i in., 2005; Vollrath, 1981]. Z punktu widzenia prezentowanych badań profilu metabolicznego indoli, najistotniejsze zmiany dotyczą budowy ściany pęcherzyków szyszynki. Wewnętrzna część ściany, otaczająca światło pęcherzyka, jest utworzona przez pinealocyty szczątkowo-receptorowe oraz podporowe komórki ependymo-podobne. Z kolei część zewnętrzną ściany pęcherzyka budują pinealocyty sekrecyjne, komórki astrocyto-podobne, a także wypustki komórkowe i ich zakończenia. Do 4. tygodnia życia część zewnętrzna ściany pęcherzyka ograniczona jest do nielicznych komórek zlokalizowanych przy błonie podstawnej, dlatego można stwierdzić, że miąższ gruczołu budują głównie pinealocyty szczątkowo-receptorowe oraz ependymo-podobne komórki podporowe. Ilość komórek w części zewnętrznej ściany pęcherzyka jest nieco większa u indyków 10-tygodniowych, ale największy wzrost występuje od 20. tygodnia życia ptaków. Wzrost liczby pinealocytów sekrecyjnych i astrocyto-podobnych komórek podporowych prowadzi do odwrócenia proporcji pomiędzy grubością części wewnętrznej i zewnętrznej ściany pęcherzyka. Badania ultrastrukturalne wykazały, że pinealocyty szczątkowo-receptorowe rozwijają się do 10. tygodnia życia a następnie ulegają regresji po 20. tygodniu życia [Przybylska-Gornowicz i in., 2005; Petrusewicz-Kosińska i in., 2019a]. Najbardziej intensywny proces rozwoju tych komórek przypada na pierwsze 4 tygodnie życia powylęgowego indyków i obejmuje wydłużanie się ciała komórki, rozwój szorstkiej siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego, zwiększenie ilości mitochondriów oraz tworzenie uporządkowanego układu organelli w cytoplazmie. Regresja pinealocytów szczątkowo-receptorowych jest widoczna jako skrócenie się komórki i redukcja liczby organelli.

Wyróżniony w niniejszej pracy pierwszy etap zmian w metabolizmie indoli, w którego trakcie komórki zwiększyły swoją zdolność do syntezy 5-HT i MLT, koreluje z wczesną fazą powylęgowego rozwoju pinealocytów szczątkowo-receptorowych, charakteryzującą się głównie wzrostem liczby cystern szorstkiej siateczki śródplazmatycznej i mitochondriów. Drugi i trzeci etap zbiega się z obecnością dobrze rozwiniętych pinealocytów szczątkowo-receptorowych o uporządkowanym układzie organelli, z licznymi cysternami szorstkiej siateczki śródplazmatycznej, rozbudowanym aparatem Golgiego otoczonym jasnymi i gęstymi pęcherzykami oraz licznymi mitochondriami w szczytowych partiach komórki. Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że dobrze rozwinięte pinealocyty szczątkowo-receptorowe

charakteryzuje bardzo wysoki poziom syntezy i metabolizmu 5-HT. Pinealocyty szczątkowo-receptorowe są nieco lepiej rozwinięte podczas trzeciego etapu rozwoju metabolizmu indoli niż podczas drugiego. Ponadto, w trakcie trzeciego etapu pinealocyty sekrecyjne są liczniejsze niż w drugim etapie rozwoju. Zatem, niższe stężenie 5-HT podczas trzeciego etapu można przypisać ostatecznemu dojrzewaniu pinealocytów szczątkowo-receptorowych lub obecności większej liczby pinealocytów sekrecyjnych. Czwarty etap zmian metabolizmu indoli koreluje z dużym wzrostem liczby pinealocytów sekrecyjnych oraz regresją pinealocytów szczątkowo-receptorowych. Zasadnym wydaje się stwierdzenie, że synteza i degradacja 5-HT są zredukowane w pinealocytach sekrecyjnych, podczas gdy synteza MLT utrzymuje się na podobnym poziomie jak w pinealocytach szczątkowo-receptorowych. Stężenia 5-HT i 5-HIAA spadają między 20. a 45. tygodniem życia, kiedy następuje wzrost liczby pinealocytów sekrecyjnych oraz regresja pinealocytów szczątkowo-receptorowych.

Analizując wyniki badań morfologicznych należy zauważyć, że chociaż relacje ilościowe pomiędzy pinealocytami i komórkami podporowymi nie zostały ustalone, podwójne barwienia immunofluorescencyjne na obecność kwaśnego, włókienkowego białka glejowego (GFAP, marker komórek podporowych) i ASMT wskazują, że proporcje między tymi populacjami komórek nie ulegają zauważalnym zmianom w okresie od 14 dnia do 56 tygodnia życia [Petrusewicz-Kosińska i in., 2019a]. Komórki podporowe w reakcjach immunochemicznych dają wynik negatywny na obecność TPH i 5-HT. Należy również zwrócić uwagę na intensywny rozwój tkanki łącznej wokół pęcherzyków oraz w torebce otaczającej szyszynkę po 20. tygodniu życia [Przybylska-Gornowicz i in., 2005]. Biorąc pod uwagę, że proporcja tkanki łącznej w stosunku do miąższu narządu wzrasta w trakcie rozwoju, uzyskane dane zostały przedstawione w przeliczeniu na zawartość rozpuszczalnego białka w homogenacie szyszynki, a nie na masę narządu, ponieważ włókna kolagenowe nie ulegają rozpadowi podczas sonifikacji. W ten sposób starano się zmniejszyć wpływ zwiększonej zawartości tkanki łącznej na uzyskane wyniki.

Z endokrynologicznego punktu widzenia interesującym wydaje się poznanie zmian dotyczących całkowitej zawartości MLT w szyszynce indyka domowego. Zawartość MLT podczas nocnego piku wzrastała wraz z wiekiem zwierząt aż do końca doświadczenia, najintensywniej w okresie między 2. i 7. dniem oraz 2. i 10. tygodniem życia (Ryc. 16). Z kolei, maksymalna zawartość 5-HT znacznie zmniejszyła się po 10. tygodniu życia (Ryc. 16).



Ryc. 16. Maksymalna całkowita zawartość (średnie) melatoniny, MLT (A) oraz serotoniny, 5-HT (B) w badanych szyszynkach.

Stężenia wszystkich mierzonych pochodnych TRP wykazywały istotne wahania dobowe przez cały okres trwania doświadczenia, a ich przebieg zmieniał się wraz z wiekiem indyków. Wyniki uzyskane u ptaków 2-dniowych należy rozpatrywać z zastrzeżeniem, że nowo wyklute pisklęta zakupiono w komercyjnej wylęgarni, gdzie jaja inkubowano bez zachowania ściśle określonego cyklu świetlnego. Wykorzystanie piskląt wyklutych w warunkach laboratoryjnych nie było możliwe ze względu na liczbę zwierząt potrzebnych do wykonania eksperymentu. We wszystkich grupach wiekowych dobowe wahania stężeń indoli były spowodowane zmianami aktywności dwóch enzymów – TPH i AA-NAT. Przebieg dobowych zmian aktywności TPH zmieniał się znacząco do 10. tygodnia życia ptaków. Uogólniając, spadek aktywności TPH podczas fazy jasnej zaczynał się u młodszych ptaków później niż u ptaków starszych. Nocne piki AA-NAT występowały z opóźnieniem u indyków w wieku 20, 30 i 45 tygodni w porównaniu z młodszymi ptakami. Zależne od wieku zmiany dobowych profili 5-TPH, 5-HT, 5-HIAA, 5-HTOL, 5-MIAA i 5-MTOL były bardzo zróżnicowane, ponieważ wynikały ze zmian aktywności zarówno TPH, jak i AA-NAT. Z kolei za zmiany w dobowych profilach NAS i MLT odpowiadała jedynie aktywność AA-NAT, stąd też ich przebieg był podobny do zmian w aktywności tego enzymu. Dobowy rytm stężenia 5-MTAM występował od 4. tygodnia życia, a nocny szczyt zawartości tej aminy miał miejsce 4 godziny później u indyków w wieku 20, 30 i 45 dni niż u indyków w wieku 4 i 10 tygodni.

Różnice w przebiegu dobowych profili zawartości indoli oraz aktywności enzymów szlaku syntezy MLT między indykami w wieku 20-45 tygodni a młodszymi ptakami mogą być związane ze zwiększoną liczbą pinealocytów sekrecyjnych. Należy zauważyć, że pinopsyna, światłoczuła opsyna niewzrokowa, jest obecna w szyszynce

indyka przez cały okres rozwoju powylęgowego, ale jej rozmieszczenie wykazuje wyraźne zmiany zależne od wieku. Wraz z wiekiem ptaków wzrasta liczba pinopsyno-pozytywnych wypustek w zewnętrznej części ściany pęcherzyków oraz ulega zmniejszeniu liczba pinopsyno-pozytywnych wypustek apikalnych w świetle pęcherzyka [Petrusewicz-Kosińska i in., 2019b]. Obecność struktur pinopsyno-pozytywnych w zewnętrznej części ściany pęcherzyka sugeruje, że pinealocyty sekrecyjne, podobnie jak pinealocyty szczątkowo-receptorowe, są światłoczułe. Badania *in vitro* przeprowadzone w hodowli przepływowej wykazały, że szyszynki 45-tygodniowych indyków są mniej wrażliwe na nocną ekspozycję na światło niż 10-tygodniowe ptaki [Prusik i Lewczuk, 2019]. Należy jednak podkreślić, że szyszynki 45-tygodniowych indyków w badaniach *in vitro* wydzielają MLT w wyraźnym rytmie dobowym oraz posiadają zdolność do adaptacji swojej aktywności wydzielniczej do odwróconego cyklu świetlnego z taką samą szybkością jak narządy 10-tygodniowych indyków oraz szybciej niż szyszynki innych badanych gatunków ptaków: 15-tygodniowych kur [Csernus i in., 1999], 12-tygodniowych gęsi [Ziółkowska i in., 2018] i 9-miesięcznych kaczek [Prusik i in., 2015]. Różnice w dobowych profilach zawartości indoli i aktywności enzymów szlaku syntezy MLT między młodymi a dorosłymi ptakami mogą być również związane ze wzrostem znaczenia regulacji współczulnej wraz z wiekiem tych zwierząt, co sugerowały badania przeprowadzone na kurze domowej [Zawilska i in., 2005]. Unerwienie współczulne przekazuje sygnał nerwowy z jądra nadskrzyżowaniowego (SCN), które stanowi oscylator rytmu dobowego znajdujący się pod kontrolą siatkówki oka [Cassone i in., 1990; Prusik i Lewczuk, 2008]. Sygnał ten może wpływać na dobowy rytm generowany przez pinealocyty wyposażone we własne mechanizmy odbioru bodźców świetlnych.

Uzyskane wyniki dowodzą, że profil zawartości związków indolowych ulega istotnym zmianom w trakcie rozwoju powylęgowego. Zmiany te zachodzą w bardzo długim przedziale czasu, z różnym natężeniem (najwolniej po uzyskaniu dojrzałości płciowej) oraz mają zróżnicowany charakter. W kontekście otrzymanych w niniejszej pracy wyników należy poddać analizie dane literaturowe dotyczące znaczących różnic międzygatunkowych w stosunkach ilościowych między poszczególnymi indolami, jakie opisano w oparciu o badania szyszynek gęsi [Ziółkowska i in., 2018; Hanuszewska i in., 2019], kaczek [Lewczuk i in., 2014] i kur [Adamska i in., 2016]. Największe z nich dotyczyły 5-HT i produktów jej oksydacyjnej deaminacji. Szyszynki gęsi i kaczek charakteryzowały się wysoką względną zawartością 5-HT, wyraźnymi dobowymi

zmianami poziomu tej aminy ze spadkiem późną nocą oraz niskimi względnymi poziomami 5-HIAA. Najwyższy udział 5-HT miała w szyszynce gęsi, w której stanowiła aż 35–60% wszystkich badanych indoli. Z kolei 5-HIAA stanowił tylko 3,0-5,3% spośród wszystkich amin szyszynki. W szyszynce kaczki 5-HT stanowiła, w zależności od pory dnia, 15–35% badanych indoli, zaś 5-HIAA 8–15% indoli. Najmniejszą zawartością 5-HT, poniżej 5%, cechowała się szyszynka kur. U tego gatunku 5-HIAA stanowił 18–38%. Stosunek ilościowy 5-HIAA do 5-HT wynosił około 10 u kur, poniżej 0,7 u kaczek i 0,1 u gęsi. Wyniki badań uzyskane w niniejszej pracy u 4-tygodniowych indyków wykazały, że 5-HT stanowiła od około 15% badanych indoli o godzinie 02:00 do około 30 % o godzinie 18:00. Stosunek 5-HIAA/5-HT był bliski 1. Do tej pory uważano wysoką względną zawartość 5-HT za unikalną cechę szyszynki ptaków rzędu *Anseriformes*. Niniejsze dane wskazują na podobieństwa we względnej ilości 5-HT i stosunku 5-HIAA/5-HT między indykiem i kaczką a także na wyraźne różnice między indykiem i kurą, dwoma gatunkami należącymi do tego samego rzędu, *Galliformes*. Wyraźne różnice w profilach dobowych zawartości indoli między badanymi gatunkami ptaków dotyczą również 5-MTAM. Amina ta była niewykrywalna lub prawie niewykrywalna w szyszynce kury [Adamska i in., 2016], podczas gdy występowała w znacznych ilościach w szyszynce kaczki [Lewczuk i in., 2014], gęsi [Ziółkowska i in., 2018] oraz indyka. W kontekście uzyskanych w niniejszej pracy wyników, wskazujących na istotne zmiany w profilu indoli szyszynkowych zachodzące wraz z wiekiem powstaje pytanie, czy wynikające z wcześniejszych badań wnioski o różnicach gatunkowych są poprawne i czy nie mają swojego źródła w zróżnicowanym wieku badanych ptaków. Opublikowane dane zostały uzyskane u 16-dniowych kurcząt [Adamska i in., 2016], 14-tygodniowych kaczek [Lewczuk i in., 2014] oraz 14-tygodniowych gęsi [Ziółkowska i in., 2018]. W szyszynce indyka procentowa zawartość 5-HT w dzień wahała się od 12,9 do 17,4 % u ptaków 2-dniowych, od 19,1 do 27,2 % u ptaków 7-dniowych oraz od 31,55 do 37,9 % u ptaków 14-dniowych, a więc była znacznie wyższa niż u kurcząt 16-dniowych (poniżej 5 %). Proporcja 5-HIAA do 5-HT wynosiła od 0,5-0,7 u indycząt 14-dniowych do 2,2-2,9 u ptaków 2-dniowych. Przytoczone dane jednoznacznie wskazują, że różnice międzygatunkowe profili indoli szyszynkowych są znacznie większe niż zmiany zachodzące podczas rozwoju. W oparciu o badania nad embrionalną ontogenezą szlaku przemian indoli związanych z syntezą MLT w szyszynce gęsi wysunięto wniosek, że

gatunkowo specyficzny profil metabolizmu indoli kształtuje się w już w okresie życia zarodkowego [Hanuszewska i in., 2019].

Istotne różnice gatunkowe stwierdzono również w przebiegu dobowych zmian zawartość badanych indoli. Nocny wzrost poziomu 5-HTRP u indyków był niższy niż u kur [Adamska i in., 2016] oraz zbliżony do występującego u kaczek [Lewczuk i in., 2014] i gęsi [Ziółkowska i in., 2018]. Ponadto u indyków występował później niż u innych badanych ptaków. Zawartość 5-HT wykazała duży spadek w drugiej części fazy ciemnej u indyków, gęsi i kaczek, podczas gdy u kur pojawił się nagły wzrost pod koniec nocy. Różnice między najwyższym i najniższym poziomem NAS oraz MLT w ciągu doby były znacznie większe u indyków niż u kaczek [Lewczuk i in., 2014] i gęsi [Ziółkowska i in., 2018], ale mniejsze niż u kur [Adamska i in., 2016]. Rytmy 5-HIAA i 5-HTOL odpowiadały zmianom w poziomie 5-HT u wszystkich badanych gatunków. Wyraźne różnice międzygatunkowe dotyczyły z kolei zmian dobowych zawartości 5-MIAA i 5-MTOL. Dobowe wahania stężeń 5-MIAA i 5-MTOL w szyszynce kaczki były prawie tożsame ze zmianami poziomów ich bezpośrednich prekursorów [Lewczuk i in., 2014], natomiast w szyszynce kury dobowe rytmy 5-MIAA i 5-MTOL nie wynikały ze zmian poziomów 5-HIAA i 5-HTOL [Adamska i in., 2016]. Prawdopodobnie bardzo duży wzrost nocnego poziomu NAS wraz ze znacznie większym powinowactwem ASTM do tej aminy niż do 5-HIAA i 5-HTOL zmniejsza syntezę 5-MIAA i 5-MTOL. Przedstawiony mechanizm wyjaśnia występowanie rytmu dobowego w poziomach 5-MIAA i 5-MTOL bez analogicznych zmian w zawartości 5-HIAA i 5-HTOL. U indyków dobowe rytmy zmian poziomów 5-MIAA i 5-MTOL miały wyższe amplitudy niż fluktuacje 5-HIAA i 5-HTOL. Podobnie jak w przypadku szyszynki kury, zjawisko to wydaje się mieć swoje źródło w konkurencji między 5-hydroksyindolami o metylację przez ASMT. Podobnie jak w przypadku kaczek [Lewczuk i in., 2014] i gęsi [Ziółkowska i in., 2018], w szyszynce indyka poziom 5-MTAM wykazywał rytm dobowy ze wzrostem podczas nocny, ale mechanizm odpowiedzialny za jego powstanie nie jest znany.

Jednoczesny pomiar aktywności enzymów i zawartości indoli umożliwił analizę mechanizmów odpowiedzialnych za zmiany dobowe w metabolizmie tych związków, przy czym należy zaznaczyć, że pomiary aktywności enzymów w homogenacie szyszynki mogą nie odzwierciedlać ich rzeczywistej aktywności w żywych komórkach. W niniejszej dysertacji analizę relacji zmian aktywności enzymów i zawartości indoli w przebiegu cyklu dobowego ograniczono do szyszynek 28-dniowych indyków, u których

wahania dobowe były największe. Jak wyżej podano, dobowe zmiany swojej aktywności w szyszynce indyków wykazywały dwa enzymy: TPH oraz AA-NAT. W szyszynkach indyków 28-dniowych (utrzymywanych w świetle białym) aktywność TPH była około 4-krotnie wyższa o godzinie 04:00 i 06:00 w stosunku do 14:00, 18:00 i 22:00. Ten nocny wzrost aktywności enzymatycznej zapewniał dostarczanie odpowiedniej ilości 5-HT do intensywnej syntezy NAS podczas nocy. Dodatkowo aktywność tego enzymu pozostawała znacząco podwyższona o godzinie 10:00, umożliwiając odnowę puli 5-HT w pinealocytach. Aktywność AA-NAT, w porównaniu do TPH, wykazywała bardzo duże wahania dobowe, które miały swoje odzwierciedlenie w zawartości wszystkich pochodnych TRP, z wyjątkiem 5-HTRP i 5-MTAM. U 28-dniowych indyków utrzymywanych w świetle białym najwyższa aktywność AA-NAT, wstępująca o godzinie 02:00, przewyższała wartość najniższą, obserwowaną o godzinie 18:00, około 25-krotnie. Dobowe zmiany aktywności AA-NAT miały swoje bezpośrednie odzwierciedlenie poziomach NAS i MLT. Nocny wzrost aktywności AA-NAT skutkował również intensywnym wykorzystaniem 5-HT oraz znacznym spadkiem poziomu tej aminy i indoli pochodzących z jej oksydacyjnej deaminacji (5-HIAA, 5-HTOL, 5-MIAA i 5-MTOL). Stwierdzone znaczne wahania dobowe aktywności AA-NAT oraz zawartości NAS i MLT są zgodne z przebiegiem dobowego rytmu wydzielania MLT w hodowli przepływowej szyszynki indyka [Prusik i Lewczuk, 2019] oraz dobowymi zmianami w stężeniu MLT w osoczu krwi [Prusik i Lewczuk, 2020].

W szyszynkach indyków 28-dniowych aktywność AADC wydaje się być bardzo wysoka w stosunku do poziomu dostępnego substratu. Za tym poglądem przemawia szereg argumentów: (i) aktywność AADC mierzona w homogenacie szyszynki jest prawie 20-krotnie wyższa niż aktywność TPH mierzona *in vitro*, (ii) stosunek zawartości 5-HTRP do zawartości 5-HT jest niezwykle niski oraz (iii) amplituda rytmu dobowego stężenia 5-HTRP jest znacznie niższa niż rytmu aktywności TPH. Należy również zauważyć, że dekarboksylacja do 5-HT jest jedynym zidentyfikowanym szlakiem metabolicznym 5-HTRP w szyszynce indyka, ponieważ nie było wykrywalnych ilości 5-MTRP, związku powstającego przez metylację 5-HTRP.

Szczególną uwagę należy zwrócić na aktywność ASMT w szyszynce indyka, gdyż zawartość NAS jest bardzo niska w porównaniu z MLT. Dodatkowo amplituda dobowych zmian poziomu NAS jest niższa niż MLT. W badaniach przeprowadzonych u innych gatunków, z wyjątkiem kury, zawartość NAS była zwykle znacznie większa

niż MLT, a amplituda rytmu NAS była wyraźnie wyższa niż MLT [Ziółkowska i in., 2018; Hanuszewska i in., 2019; Liu i Borjigin, 2005]. Takie relacje między NAS i MLT są powszechnie uważane za dowód limitującej roli ASMT w szlaku syntezy MLT [Liu i Borjigin, 2005; Chattoraj i in., 2009]. Wyniki uzyskane w badaniach własnych sugerują, że aktywność ASMT jest wystarczająco wysoka, aby zapewnić szybką konwersję NAS do MLT nawet w godzinach nocnych, a enzym ten nie ma lub ma bardzo słaby ograniczający wpływ na syntezę MLT w szyszynkach 4-tygodniowych indyków. W przeciwieństwie do syntezy MLT, ASMT wpływa limitująco na tworzenie 5-MIAA i 5-MTOL o godzinie 02:00 i 06:00 w szyszynkach 28-dniowych indyków, na co wskazuje większy nocny spadek zawartości 5-MIAA i 5-MTOL w porównaniu z poziomami 5-HIAA i 5-HTOL.

Dobowe zmiany zawartości indoli w szyszynce wykazano u indyków utrzymywanych w monochromatycznym świetle niebieskim, czerwonym oraz zielonym w cyklu 12L:12D, niezależnie od jego natężenia. Należy podkreślić, że rytmy aktywności AA-NAT oraz zawartości NAS i MLT o wysokiej amplitudzie stwierdzono zarówno u indyków przebywających w świetle niebieskim, jak i u zwierząt eksponowanych na światło czerwone, nawet o najniższym natężeniu. Melanopsyna i pinopsyna, dwa barwniki światłoczułe zaangażowane w odbiór bodźców świetlnych w mechanizmach regulacji rytmów biologicznych, wykazują bardzo wysoką wrażliwość na światło niebieskie i bardzo niską na światło czerwone [Okano i in., 1997; Okano i Fukada, 1997; Torii i in., 2007]. Dlatego też światło niebieskie jest uważane za kluczowy czynnik regulujący rytm dobowy, a z kolei światło czerwone ma na niego bardzo słaby lub żaden wpływ i jest powszechnie używane w eksperymentach chronobiologicznych jako odpowiednik ciemności. Yadav i in. [2015] wykazali, że okresowe, naprzemienne ekspozycje na światło niebieskie i czerwone w cyklu dobowym były interpretowane przez ptaki odpowiednio jako dzień i noc. Planując doświadczenie zakładano, że światło czerwone o natężeniu 16 lux będzie niewystarczające do utrzymania rytmu dobowego i spodziewany był wyraźny spadek aktywności AA-NAT oraz zawartości NAS i MLT. Wbrew przyjętej hipotezie, uzyskane dane wykazały, że czerwone oświetlenie o natężeniu 16 lux podczas fazy jasnej jest wystarczające do zachowania wysokiej amplitudy rytmu dobowego syntezy MLT u indyków. Należy podkreślić, że w naszym eksperymencie ptaki podczas nocy były trzymane w całkowitej ciemności, co może zwiększać wpływ słabego światła na aktywność wydzielniczą szyszynki. Ostatnie doniesienia naukowe wskazują na

znaczenie zachowania ciemności podczas nocy w wielu aspektach fizjologii zwierząt [Rumanova i in., 2020].

Światło monochromatyczne istotnie modyfikowało metabolizm indoli w szyszynce indyka domowego, a sposób jego działania był zależny od barwy i intensywności. Wyraźne zmiany dotyczyły przebiegu dobowego rytmu aktywności AA-NAT i w konsekwencji syntezy MLT. Różnice w warunkach świetlnych wpłynęły na: (i) spadek aktywności AA-NAT podczas fazy jasnej oraz najniższy osiągnięty poziomem aktywności tego enzymu, (ii) wzrost aktywności AA-NAT po rozpoczęciu fazy ciemnej oraz (iii) czas wystąpienia szczytu aktywności i osiągniętą w tym punkcie czasowym wartość maksymalną. Przy natężeniu światła 16 lux, 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. Minimalny, stwierdzony podczas dnia poziom aktywności AA-NAT, był najniższy u ptaków eksponowanych na światło niebieskie. Wzrost aktywności AA-NAT po rozpoczęciu nocy był szybszy u indyków utrzymywanych w oświetleniu o większym natężeniem światła monochromatycznego podczas dnia. 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. W szczycie aktywności największą aktywność stwierdzono u indyków trzymanych 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 o godzinie 10:00, 14:00, 18:00 i 22:00 była około 2 razy wyższa u indyków utrzymywanych w czerwonym świetle niż w innych grupach zwierząt, jak również w poziomach 5-HIAA, 5-HTOL, 5-MIAA i 5-MTOL. Różnice w zawartości 5-HIAA i 5-HTOL między zwierzętami eksponowanymi na światło czerwone a innymi grupami ptaków podczas fazy jasnej były niższe niż te stwierdzone w poziomie 5-HT. Wydaje się, że aktywność oksydazy monoaminowej była zbyt niska, aby wyprodukować więcej 5-HIAA i 5-HTOL. Co ciekawe, czerwone światło nie miało wpływu na poziom 5-HTRP i zjawisko to można wytłumaczyć szybką przemianą 5-HTRP w 5-HT. Czerwone światło wpłynęło na przebieg dobowego rytmu 5-MTAM, zwiększając poziom tej aminy w drugiej połowie fazy ciemnej.

Mechanizmy oddziaływania światła o różnych długościach fali na aktywność wydzielniczą szyszynki pozostają nieznane. Należy wziąć pod uwagę trzy możliwe drogi działania światła o różnej barwie na szyszynkę ptaków: (i) przez struktury pinopsyno-pozytywne lub melanopsyno-pozytywne zlokalizowane w szyszynce, (ii) przez segmenty zewnętrzne komórek fotoreceptorowych siatkówki oraz (iii) przez zawierające melanopsynę komórki zwojowe siatkówki. Pierwsza z wymienionych możliwości jest poparta wynikami badań *in vitro* wykazującymi, że regulujący wpływ światła na sekrecję MLT przez szyszynkę kury jest zależny od długości fali [Csernus i in., 1999]. Należy również podkreślić, że miąższ szyszynki 4-tygodniowych indyków zbudowany jest z dobrze wykształconych pinealocytów szczątkowo-receptorowych z wypustkami wierzchołkowymi zawierającymi pinopsynę [Petrusewicz-Kosińska i in., 2019a]. Co więcej, ostatnie badania sugerują, że pinopsyna jest odpowiedzialna za wysokoczuły odbiór bodźców świetlnych w siatkówkach niższych kręgowców, bowiem ma zdolność percepcji światła o bardzo niskim natężeniu [Sato i in., 2018]. Analizując drugą opcję, należy zaznaczyć, że komórki fotoreceptorowe siatkówki są wysoce wrażliwe na światło i monochromatyczne bodźce świetlne odbierają selektywnie. Ponadto tworzą połączenia synaptyczne z komórkami zwojowymi siatkówki zawierającymi melanopsynę. Wykazano, że światło monochromatyczne wpływa na rytmiczną ekspresję genów zegarowych w komórkach fotoreceptorowych siatkówki *in vitro* [Bian i in., 2020]. W przypadku ostatniej z wymienionych możliwości, weryfikacji w badaniach *in vivo* wymaga wrażliwość komórek zwojowych siatkówki zawierających melanopsynę na światło o różnej długości fali, a szczególnie ich zdolność do reagowania na światło czerwone.

Wyniki licznych badań wskazują, że zastosowanie światła monochromatycznego podczas fazy jasnej zmienia rytm dobowy ekspresji genów zegarowych w szyszynce ptaków [Jiang i in., 2016; Yang i in., 2020; Jin i in., 2011; Drozdova i in., 2019; Jiang i in., 2020]. U piskląt odchowywanych w świetle monochromatycznym o natężeniu 15 lux, a następnie utrzymywanych w ciągłej ciemności, istotny wpływ na transkrypcję genów zegarowych miała barwa zastosowanego światła [Jiang i in., 2016]. Amplitudy rytmów okołodobowych były podwyższone dla pozytywnych genów zegarowych (*Clock, Bmal1*) i zmniejszone dla negatywnych genów (*Per2, Cry*) w świetle zielonym, zaś odwrotne wyniki uzyskano w świetle czerwonym. W porównaniu ze światłem białym, światło niebieskie przyspieszało akrofazy negatywnych genów zegarowych i opóźniało akrofazy genów pozytywnych. Światło czerwone przyspieszało akrofazy

wszystkich genów z wyjątkiem *cClock* i *cPer2*, podczas gdy światło zielone opóźniało akrofazy wszystkich genów z wyjątkiem *cBmal2*. Podwyższone poziomy mRNA pozytywnych genów zegarowych i obniżone poziomy mRNA negatywnych genów zaobserwowano u piskląt odchowywanych w świetle zielonym, ale nie w świetle czerwonym [Jiang i in., 2016]. Dane dotyczące wpływu długości fali na transkrypcję genów zegarowych u kur zostały poddane szczegółowej analizie statystycznej przez Yang'a i współautorów [2020]. Zgodnie z uzyskanymi wynikami, transkrypcja genów zegarowych wykazuje rytm dobowy w świetle o długich falach, podczas gdy jest arytmiczna w świetle o krótkich falach. Ekspresja *Clock* spada w ciągu dnia i podnosi się nocą u piskląt przebywających w świetle czerwonym, odwrotny schemat ekspresji zachodzi w świetle zielonym oraz jest arytmiczna w świetle niebieskim. Pod wpływem światła zielonego ekspresja genu *Bmal1* podnosi się w ciągu dnia i spada w nocy. Jednakże u ptaków, przebywających w świetle czerwonym i niebieskim, ekspresja *Bmal1* spada w ciągu dnia i wzrasta nocą.

Światło monochromatyczne wpływało również na ekspresję genu AA-NAT u kurcząt utrzymywanych w cyklu świetlnym 12L:12D [Jiang i in., 2020]. Wykazano, że światło zielone zwiększało poziom mRNA AA-NAT, podczas gdy czerwone światło obniżało jego poziom. Amplitudy rytmów okołodobowych mRNA AA-NAT były wyższe w świetle zielonym i niższe w świetle czerwonym. Ponadto światło monochromatyczne wpływało na białka genów zegarowych w szyszynce kur. Stężenia białka CLOCK i BMAL1 były podwyższone w świetle zielonym i ulegały obniżeniu w świetle czerwonym. Wykazano, że światło monochromatyczne wpływało również na ekspresję opsyn [Jiang i in., 2020].

Bardzo niewiele wiadomo na temat wpływu światła monochromatycznego na aktywność enzymów szlaku syntezy MLT oraz zawartość związków indolowych. Wykazano, że poziom MLT w osoczu podczas subiektywnego dnia w warunkach ciągłej ciemności był istotnie obniżony u piskląt odchowanych w świetle czerwonym podczas fazy jasnej, podwyższony u ptaków odchowywanych w świetle zielonym oraz niezmieniony w przypadku odchowu w świetle niebieskim [Jiang i in., 2016]. Jin i współpracownicy [2011] wykazali, że zielone światło zastosowane podczas fazy jasnej istotnie zwiększało nocny poziom MLT w osoczu u 7-dniowych piskląt. Zaobserwowano również, że w okresie embrionalnym rytmiczna produkcja MLT w szyszynce jest wrażliwa na światło monochromatyczne o różnej długości fali [Drozdova i in., 2019].

Analizując wyniki dotyczące wpływu barwy i intensywności światła na szyszynkę, należy zaznaczyć, że wyrażenie natężenia światła w jednostce lux, aczkolwiek powszechnie stosowane w doświadczeniach chronobiologicznych, nie jest wolne od wad. Zaletą jednostki lux jest niewątpliwie jej popularność, a zatem łatwe porównywanie wyników między poszczególnymi doświadczeniami oraz ze standardami zootechnicznymi. Wadą jest jednak odniesienie do dziennej wrażliwości oka ludzkiego [Grubisic i in., 2019]. Zakres wrażliwości oka zwierząt na poszczególne długości fali światła widzialnego może być inny niż opisany u ludzi [Grubisic i in., 2019; Barber i in., 2006; Lewis i Morris, 2006]. Takie różnice odnotowano u kur i indyków, dlatego zaproponowano alternatywne jednostki miary o nazwie kura-lux oraz indyk-lux [Barber i in., 2006; Lewis i Morris, 2006]. Kury postrzegają światło z lamp żarowych jako o 10–20% jaśniejsze w porównaniu ze światłem fluorescencyjnym pomimo takich samych wartości natężenia wyrażonych w luksach [Mohammed, 2019]. W celu zrozumienia wpływu światła na organizm, kluczowym jest wzięcie pod uwagę postrzegania natężenia światła w zależności od źródła oświetlenia przez poszczególne gatunki zwierząt, a nawet jego percepcji przez dany narząd w organizmie. Należy również zauważyć, że pomiar natężenia światła białego oraz monochromatycznego (LED) wymaga użycia dedykowanego luksomierza w celu uniknięcia błędnych wyników.

4.6. Wnioski

1. Profil metaboliczny indoli w szyszynce indyka, poczynając od 7. dnia życia, charakteryzuje się (i) wysoką amplitudą rytmu aktywności AA-NAT oraz zawartości NAS i MLT, (ii) stosunkiem ilościowym 5-HIAA do 5-HT w zakresie od 0,5 do 2,5 oraz (iii) wyższą zawartością MLT niż NAS podczas nocy.
2. W trakcie rozwoju powylęgowego zachodzą w szyszynce indyka istotne zmiany w metabolizmie indoli związanych z syntezą MLT.
3. W przebiegu postembrionalnych zmian profilu metabolicznego indoli w szyszynce indyka można wyróżnić cztery etapy. Pierwszy etap charakteryzuje się (i) spadkiem stężenia 5-HTRP, (ii) wzrostem stężenia 5-HT oraz (iii) wzrostem stężenia MLT, 5-MIAA i 5-MTAM. W drugim etapie poziomy syntezy i degradacji 5-HT, aktywności AA-NAT oraz stężenia NAS i MLT osiągają wartości maksymalne. Trzeci etap charakteryzuje się obniżonym o około 50% stężeniem 5-HT i 5-HIAA w stosunku do etapu drugiego, ale niezmienionym poziomem 5-MIAA oraz najwyższym stężeniem 5-MTAM. Ostatni, czwarty etap charakteryzuje się znacznie

obniżoną syntezą, zawartością i degradacją 5-HT, przy zachowanym poziomie syntezy MLT.

4. Zmiany w metabolizmie indoli korelują ze znanym z danych literaturowych rozwojem pinealocytów szczątkowo-receptorowych oraz pinealocytów sekrecyjnych.
5. Stężenia wszystkich mierzonych pochodnych TRP wykazują znaczne wahania dobowe do 45. tygodnia życia, a ich przebieg zmienia się wraz z wiekiem indyków.
6. Rytm dobowy związków indolowych utrzymuje się u ptaków przebywających podczas dnia w świetle monochromatycznym czerwonym, niebieskim i zielonym, nawet przy natężeniu 16 lux.
7. Światło monochromatyczne modyfikuje metabolizm indoli, a jego efekty zależą od barwy i intensywności tego światła.
8. Na początku fazy jasnej światło niebieskie ma silniejszy wpływ hamujący na syntezę MLT niż światło zielone i czerwone. Hamujący efekt światła monochromatycznego wzrasta wraz z jego intensywnością, niezależnie od długości fali. Szybkość wzrostu syntezy MLT po nastaniu ciemności zależy od natężenia światła monochromatycznego podczas fazy jasnej. Zarówno barwa jak i intensywność światła wpływają na czas wystąpienia nocnego szczytu aktywności enzymatycznej AA-NAT oraz zawartości NAS i MLT. Światło czerwone istotnie zwiększa syntezę 5-HT, co skutkuje wyższymi poziomami 5-HIAA, 5-HTOL, 5-MIAA i 5-MTOL.

4.7. Piśmiennictwo

Adamska, I.; Lewczuk, B.; Markowska, M.; Majewski, P.M. Daily profiles of melatonin synthesis-related indoles in the pineal glands of young chickens (Gallus gallus domesticus L.). *J. Photochem. Photobiol. B*. 2016, 164, 335–343.

Attanasio, A.; Rager, K.; Gupta, D. Ontogeny of circadian rhythmicity of melatonin, serotonin, and N-acetylserotonin in humans. *J. Pineal Res.* 1986, 3, 251–256.

Barber, C.L.; Prescott, N.B.; Jarvis, J.R.; Le Seuer, C.; Perry, G.C.; Wathes, D.M. Comparative study of the photopic spectral sensitivity of domestic ducks (Anas platyrhynchos domesticus), turkeys (Meleagris gallopavo gallopavo) and humans. *Br. Poult. Sci.* 2006, 47, 365–374.

Bian, J.; Wang, Z.; Dong, Y.; Cao, J.; Chen, Y. Effect of monochromatic light on the circadian clock of cultured chick retinal tissue. *Exp. Eye Res.* 2020, 194, 108008.

Cassone, V.M.; Forsyth, A.M.; Woodlee, G.L. Hypothalamic regulation of circadian noradrenergic input to the chick pineal gland. *J. Comp. Physiol. A Sens. Neural Bahav. Physiol.* 1990, 167, 187–192.

Csernus, V.; Becher, P.; Mess, B. Wavelength dependency of light-induced changes in rhythmic melatonin secretion from chicken pineal gland in vitro. *Neuro Endocrinol. Lett.* 1999, 20, 299–304.

Chattoraj, A.; Liu, T.; Zhang, L.S.; Huang, Z.; Borjigin, J. Melatonin formation in mammals: In vivo perspectives. *Rev. Endocr. Metab. Disord*. 2009, 10, 237–243.

Clark W.D.; Classen H.L. The effects of continuously or diurnally fed melatonin on broiler performance and health. *Poult Sci* 1995, 74, 1900-1904.

Classen, H.L.; Riddell, C.; Robinson, F.E.; Shand, P.J.; McCurdy, A.R. Effect of lighting treatment on the productivity, health, behaviour and sexual maturity of heavy male turkeys. *Br. Poult. Sci*. 1994, 35, 215–225.

Csernus, V.; Becher, P.; Mess, B. Wavelength dependency of light-induced changes in rhythmic melatonin secretion from chicken pineal gland in vitro. *Neuro Endocrinol. Lett.* 1999, 20, 299–304.

Deep, A.; Schwean-Lardner, K.; Crowe, T.G.; Fancher, B.I.; Classen, H.L. Effect of light intensity on broiler production, processing characteristics and welfare. *Poult. Sci.* 2010, 89, 2326–2333.

Denbow, D.M.; Leighton, A.T.; Hulet, R.M. Effect of light sources and light intensity on growth, performance, and behaviour of female turkeys. *Br. Poult. Sci.* 1990, 31, 439–443.

Drozdova, A.; Okuliarova, M.; Zeman, M. The effect of different wavelengths of light during incubation on the development of rhythmic pineal melatonin biosynthesis in chick embryos. *Animals* 2019, 13, 1635–1640.

El Halawani, M. F. Light intensity requirement for breeder hen turkeys. *Gobbles* 2009, 66, 6-7.

Gooley, J.J.; Lu, J.; Chou, T.C.; Scammell, T.E.; Saper, C.B. Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat. Neurosci.* 2001, 4, 1165.

Grubisic, M.; Haim, A.; Bhusal, P.; Dominoni, D.M.; Gabriel, K.M.A.; Jechow, A.; Kupprat, F.; Lerner, A.; Marchant, P.; Riley, W.; Stebelova, K.; van Grunsven, R.H.A.; Zeman, M.; Zubidat, A.E.; Hölker, F. Light pollution, circadian photoreception, and melatonin in vertebrates. *Sustainability* 2019, 11, 6400.

Guo, Q.; Dong, Y.; Cao, J.; Wang, Z.; Zhang, Z.; Chen, Y. Developmental changes of melatonin receptor expression in the spleen of the chicken, Gallus domesticus. *Acta Histochem.* 2015, 117, 559–565.

Gwinner, E.; Zeman, M.; Klaassen, M. Synchronization by low-amplitude light-dark cycles of 24-hour pineal and plasma melatonin rhythms of hatchling European starlings (Sturnus vulgaris). *J. Pineal Res.* 1997, 23, 176–181.

Halevy, O.; Biran, I.; Rozenboim, I. Various light source treatments affect body and skeletal muscle growth by affecting skeletal muscle satellite cell proliferation in broilers. *Comp. Biochem. Physiol. A-Mol. Integr. Physiol*. 1998, 120, 317–323.

Hannibal, J. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res*. 2002, 309, 73–88.

Hanuszewska, M.; Prusik, M.; Lewczuk, B. Embryonic ontogeny of 5-hydroxyindoles and 5-methoxyindoles synthesis pathways in the goose pineal organ. *Int. J. Mol. Sci*. 2019, 20, 3948.

Hassan, M.R.; Sultana, S.; Choe, H.S.; Ryu, K.S. Effect of monochromatic and combined light color on performance, blood parameters, ovarian, morphology, and reproductive hormones in laying hens. *Italian J. Anim. Sci.* 2013, 12, e56.

Herichová, I.; Zeman, M.; Macková, M.; Griac, P. Rhythms of the pineal N-acetyltransferase mRNA and melatonin concentrations during embryonic and post-embryonic development in chicken. *Neurosci. Lett.* 2001, 298, 123–126.

Holthues, H.; Engel, L.; Spessert, R.; Vollrath, L. Circadian gene expression patterns of melanopsin and pinopsin in the chick pineal gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 326, 160–165.

Huber-Eicher, B.; Suter, A.; Spring-Stahli, P. Effects of colored light-emitting diode illumination on behavior and performance of laying hens. *Poultry Sci.* 2013, 92, 869–873.

Jia, L.; Wang, Z.; Chen, Y. Distribution and cytoarchitecture of sympathetic neurons innervating the pineal gland in chick: A CTB-HRP study. *Anat. Histol. Embryol.* 2009, 38, 76–83.

Jiang, N.; Cao, J.; Wang, Z.; Dong, Y.; Chen, Y. Effect of monochromatic light on the temporal expression of N-acetyltransferase in chick pineal gland. *Chronobiol. Int.* 2020, 37, 1140–1150.

Jiang, N.; Wang, Z.; Cao, J.; Dong, Y.; Chen, Y. Role of monochromatic light on daily variation of clock gene expression in the pineal gland of chick. *J. Photochem. Photobiol. B* 2016, 164, 57–64.

Jin, E.; Jia, L.; Li, J.; Yang, G.; Wang, Z.; Cao, J.; Chen, Y. Effect of monochromatic light on melatonin secretion and arylalkylamine N-acetyltransferase mRNA expression in the retina and pineal gland of broilers. *Anat. Rec.* 2011, 294, 1233–1241.

Laakso, M.L.; Hätönen, A.A.T.; Mustanoja, S.M. Ontogeny of pineal melatonin rhythm in rats under 12:12 hr and 14:14 hr light: Dark conditions. *J. Pineal Res.* 1996, 21, 155–164.

Lewczuk, B.; Ziółkowska, N.; Prusik, M.; Przybylska-Gornowicz, B. Diurnal profiles of melatonin synthesis-related indoles, catecholamines and their metabolites in the duck pineal organ. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 12604–12630.

Lewis, P.D.; Morris, T.R. Poultry Lighting: The Theory and Practice; Northcot: Andover, UK, 2006; p. 176.

Liu, T.; Borjigin, J. N-acetyltransferase is not the rate limiting enzyme of melatonin synthesis at night. *J. Pineal Res.* 2005, 39, 91–96

Ma, S.; Wang, Z.; Cao, J.; Dong, Y.; Chen, Y. Effect of monochromatic light on circadian rhythm of clock genes in chick pinealocytes. *Photochem. Photobiol*. 2018, 94, 1263–1272.

Ma, S.; Wang, Z.; Cao, J.; Dong, Y.; Chen, Y. BMAL1 but not CLOCK is associated with monochromatic greenlight-induced circadian rhythm of melatonin in chick pinealocytes. *Endocr. Connect.* 2019, 8, 57–68.

Magdelaine, P.; Spiess, M.P.; Valceschini, E. Poultry meat consumption trends in Europe. *World Poultry Sci. J.* 2008, 64, 53-64.

Mohammed, H.H. Assessment of the role of light in welfare of layers. *SVU-Int. J. Vet. Sci.* 2019, 2, 36–50.

Ohshima, K.; Matsuo, S. Functional morphology of the pineal gland in young chickens. *Anat. Anz.* 1984, 156, 407–418.

Okano, T.; Fukada, Y. Phototransduction cascade and circadian oscillator in chicken pineal gland. *J. Pineal Res.* 1997, 22, 145–151.

Okano, T.; Takanaka, Y.; Nakamura, A.; Hirunagi, K.; Adachi, A.; Ebihara, S.; Fukada, Y. Immunocytochemical identification of pinopsin in the pineal glands of chicken and pigeon. *Brain Res. Mol.* 1997, 50, 190–196.

Okano, T.; Yoshizawa, T.; Fukada, Y. Pinopsin is a chicken pineal photoreceptive molecule. *Nature* 1994, 372, 94–97.

Olanrewaju, H.A.; Purswell, J.L.; Maslin, W.R.; Collier, S.D.; Branton, S.L. Effects of color temperatures (kelvin) of LED bulbs on growth performance, carcass characteristics, and ocular development indices of broilers grown to heavy weights. *Poult. Sci.* 2015, 94, 338–344.

Pan, J.; Yang, Y.; Yang, B.; Yu, Y. Artificial polychromatic light affects growth and physiology in chicks. *PLoS ONE* 2014, 9, 113595.

Panda, S.; Sato, T.K.; Castrucci, A.M.; Rollag, M.D.; DeGrip, W.J.; Hogenesch, J.B.; Provencio, I.; Kay, S.A. Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 2002, 298, 2213–2216.

Pang, S.F.; Tang, P.L. Decreased serum and pineal concentrations of melatonin and N-acetylserotonin in aged male hamsters. *Horm. Res.* 1983, 17, 228–234.

Pang, S.F.; Tang, F.; Tang, P.L. Negative correlation of age and the levels of pineal melatonin, pineal N-acetylserotonin, and serum melatonin in male rats. *J. Exp. Zool.* 1984, 229, 41–47.

Paredes, S.D.; Terrón, M.P.; Cubero, J.; Valero, V.; Barriga, C.; Reiter, R.J. Comparative study of the activity/rest rhythms in young and old ringdove (Streptopelia risoria): Correlation with serum levels of melatonin and serotonin. *Chronobiol. Int.* 2006, 23, 779–793.

Petrusewicz-Kosińska, M.; Przybylska-Gornowicz, B.; Ziółkowska, N.; Martyniuk, K.; Lewczuk, B. Developmental morphology of the turkey pineal organ. Immunocytochemical and ultrastructural studies. *Micron* 2019, 122, 8–20.

Petrusewicz-Kosińska, M.; Przybylska-Gornowicz, B.; Prusik, M.; Ziółkowska, N.; Lewczuk, B. Pinopsin and photoreception in the pineal organ of the domestic turkey during post-hatching development. *Micron* 2019, 126, 102749.

Prusik, M.; Lewczuk, B. Regulation of melatonin secretion in the avian pineal gland [In polish] *Med. Weter.* 2008, 64, 617–736.

Prusik, M.; Lewczuk, B.; Ziółkowska, N.; Przybylska-Gornowicz, B. Regulation of melatonin secretion in the pineal organ of the domestic duck - an *in vitro* study. *Pol. J. Vet. Sci.* 2015, 18, 635–644.

Prusik, M.; Lewczuk, B. Roles of direct photoreception and the internal circadian oscillator in the regulation of melatonin secretion in the pineal organ of the

domestic turkey: a novel in vitro clock and calendar model. *Int. J. Mol. Sci*. 2019, 20, 4022.

Prusik, M.; Lewczuk, B. Diurnal rhythm of plasma melatonin concentration in the domestic turkey and its regulation by light and endogenous oscillators. *Animals* 2020, 10, 678.

Przybylska-Gornowicz, B.; Lewczuk, B.; Prusik, M.; Nowicki, M. Post-hatching development of the turkey pineal organ: histological and immunohistochemical studies. *Neuro Enocrinol. Lett.* 2005, 26, 383–392.

Przybylska-Gornowicz, B.; Lewczuk, B.; Prusik, M.; Bulc, M. Pineal concretions in Turkey (Meleagris gallopavo) as a results of collagen mediated calcification. *Histol. Histopathol*. 2009, 24, 407–415.

Reiter, R.J.; Richardson, B.A.; Johnson, L.Y.; Ferguson, B.N.; Dinh, D.T. Pineal melatonin rhythm: Reduction in aging Syrian hamsters. *Science* 1980, 210, 1372–1373.

Reiter, R.J. Intrinsic rhythms of the pineal gland and associated hormone cycles in body fluids. *Annu. Rev. Chronopharmacol.* 1988, 4, 77–105.

Rodenboog, H. Sodium, green, blue, cool or warm-white light? *World Poultry* 2001, 17, 22-23.

Rozenboim, I.; Biran, I.; Chaiseha, Y.; Yahav, S. The effect of a green and blue monochromatic light combination on broiler growth and development. *Poult. Sci*. 2004, 83, 842–845.

Rozenboim, I.; Biran, I.; Uni, Z.; Robinzon, B.; Halevy, O. The effect of monochromatic light on broiler growth and development. *Poult. Sci*. 1999, 78, 135–138.

Rozenboim, I.; Robinzon, B.; Rosenstrauch, A. Effect of light source and regimen on growing broilers. *Br. Poult. Sci.* 1999, 40, 452–457.

Rumanova, V.S.; Okuliarova, M.; Zeman, M. Differential effects of constant light and dim light at night on the circadian control of metabolism and behavior. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 5478.

Sato, T.; Attanasio, A.; Wake, K.; Gupta, D. Rhythm development in pineal and circulating serotonin, N-acetylserotonine, and melatonin in Syrian Hamsters. *J. Pineal Res.* 1989, 7, 45–54.

Sato, K.; Yamashita, T.; Kojima, K.; Sakai, K.; Matsutani, Y.; Yanagawa, M.; Yamano, Y.; Wada, A.; Iwabe, N.; Ohuchi, H.; Shichida, Y. Pinopsin evolved as the ancestral dim-light visual opsin in vertebrates. *Commun. Biol*. 2018, 1, 156.

Siopes, T.D.; Underwood H.A. Pineal gland and ocular influences on turkey breeder hens. 1.Reproductive performance. *Poult Sci* 1987, 66, 521-527.

Siopes, T.D. Pineal gland and ocular influences on turkey breeder hens. 2. Body weight, feed intake, and egg characteristics. *Poult Sci* 1987, 66, 528-534.

Siopes, T.D. Initiation of egg production by turkey breeder hens: sexual maturation and age at lighting. *Poult Sci* 2010, 89, 1490-1496.

Tang, P.L.; Pang, S.F. The ontogeny of pineal and serum melatonin in male rats at mid-night and mid-dark. *J. Neural Transm.* 1988, 72, 43–53.

Torii, M.; Kojima, D.; Okano, T. Two isoforms of chicken melanopsins show blue light sensitivity. *FEBS Lett.* 2007, 581, 5327–5331.

Waldhauser, F.; Kovács, C.S.; Reiter, E. Age-related changes in melatonin levels in humans and its potential consequences for sleep disorders. *Exp. Gerontol.* 1998, 33, 759–772.

Windhorst, H.-W. Changing regional patterns of turkey production and turkey meat trade. *World Poultry Sci. J.* 2006, 62, 97-114.

Vollrath, L. The Pineal Organ. Handbuch Der Mikroskopischen Anatomie Des Menschen VI/7. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1981.

Xie, D.; Wang, Z.X.; Dong, Y.L.; Cao, J.; Wang, J.F.; Chen, J.L.; Chen, Y.X. Effects of monochromatic light on immune response of broilers. *Poult. Sci.* 2008, 87, 1535–1539.

Yadav, G.; Malik, S.; Rani, S.; Kumar, V. Role of light wavelengths in synchronization of circadian physiology in songbirds. *Physiol. Behav*. 2015, 140, 164–171.

Yang, Y.; Liu, Q.; Wang, T.; Pan, J. Wavelength-specific artificial light disrupts molecular clock in avian species: A power-calibrated statistical approach. *Environ. Pollut*. 2020, 265, 114206.

Yang, Y.; Yu, Y.; Pan, J.; Ying, Y.; Zhou, H. A new method to manipulate broiler chicken growth and metabolism: Response to mixed LED light system. *Sci. Rep*. 2016, 6, 25972.

Zawilska, J.B.; Berezińska, M.; Stasikowska, O.; Lorenc, A.; Skene, D.J.; Nowak, J.Z. Posthatching developmental changes in noradrenaline content in the chicken pineal gland. *J. Pineal Res.* 2005, 38, 123–129.

Zawilska, J.B.; Lorenc, A.; Berezińska, M.; Vivien-Roels, B.; Pévet, P.; Skene, D.J. Diurnal and circadian rhythms in melatonin synthesis in the turkey pineal gland and retina. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2006, 145, 162–168.

Zawilska, J.B.; Lorenc, A.; Berezińska, M.; Vivien-Roels, B.; Pévet, P.; Skene, D.J. Daily oscillation in melatonin synthesis in the Turkey pineal gland and retina: Diurnal and circadian rhythms. *Chronobiol. Int.* 2006, 23, 341–350.

Zawilska, J.B.; Skene, D.J.; Arendt, J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol. Rep.* 2009, 61, 383–410.

Zeman, M.; Herichová, I. Circadian melatonin production develops faster in birds than in mammals. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2011, 172, 23–30.

Ziółkowska, N.; Lewczuk, B.; Prusik, M. Diurnal and circadian variations in indole contents in the goose pineal gland. *Chronobiol. Int.* 2018, 25, 1–16.

Artykuły wraz z oświadczeniami autorów

Olsztyn 19.09.2022 r.

Prof. dr hab. Bogdan Lewczuk
Katedra Histologii i Embriologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn

OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji naukowych w rozprawie doktorskiej lek. wet. Kamili Martyniuk pod tytułem: „Metabolizm związków indolowych związanych z syntezą melatoniny w szyszynce indyka domowego w zależności od wieku ptaków oraz barwy i intensywności światła":

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 (24), 9750. DOI: 10.3390/ijms21249750.
2. Martyniuk, K.; Hanuszewska-Dominiak, M; Lewczuk, B. Changes 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 (18), 10872. DOI: 10.3390/ijms231810872.

Oświadczam, że udział lek. wet. Kamili Martyniuk w powstaniu powyższych publikacji był wiodący (praca 1 - 65%, praca 2 – 55 %). Doktorantka odegrała pierwszoplanową rolę w opracowaniu koncepcji badań i ich przeprowadzeniu, analizie uzyskanych wyników, wnioskowaniu i przygotowaniu manuskryptów. Mój udział w powstaniu powyższych publikacji ograniczał się do pomocy w trakcie opracowywania koncepcji badań i wykonania analiz metodą HPLC oraz korekty manuskryptów do druku.

Prof. dr hab. Bogdan Lewczuk

Olsztyn 19.09.2022 r.

Dr wet. Maria Hanuszewska-Dominiak
Katedra Histologii i Embriologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn

OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji naukowych w rozprawie doktorskiej lek. wet. Kamili Martyniuk pod tytułem: „Metabolizm związków indolowych związanych z syntezą melatoniny w szyszynce indyka domowego w zależności od wieku ptaków oraz barwy i intensywności światła":

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 (24), 9750. DOI: 10.3390/ijms21249750.
2. Martyniuk, K.; Hanuszewska-Dominiak, M; Lewczuk, B. Changes 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 (18), 10872. DOI: 10.3390/ijms231810872.

Oświadczam, że udział lek. wet. Kamili Martyniuk w powstaniu powyższych publikacji był wiodący (praca 1 - 65%, praca 2 – 55 %). Mój udział w przygotowaniu powyższych publikacji ograniczał się do pomocy w trakcie pobierania próbek tkanek do badań oraz dyskusji nad manuskryptem.

Maria Hanuszewska-Dominiak

dr wet. Maria Hanuszewska-Dominiak

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Metabolism of Melatonin Synthesis-Related Indoles in the Turkey Pineal Organ and Its Modification by Monochromatic Light

Kamila Martyniuk, Maria Hanuszewska and Bogdan Lewczuk *

Department of Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn, Poland;
kamila.kwiecinska@uwm.edu.pl (K.M.); maria.hanuszewska@uwm.edu.pl (M.H.)
* Correspondence: lewczukb@uwm.edu.pl; Tel.: +48-(89)523-39-49

Received: 1 December 2020; Accepted: 18 December 2020; Published: 21 December 2020



Abstract: The metabolism of pineal indoles is closely related to alterations in the light and dark phases of a daily cycle. Recent research showed important interspecies differences in the pineal biochemistry, and a strong impact of monochromatic light on many physiological processes in birds. Therefore, the aims of study were to characterize the metabolism of melatonin-synthesis indoles in the pineal organ of the domestic turkey, and to determine the changes occurring in this metabolism under the influence of different wavelengths and intensities of light. For this purpose, 3-week-old turkeys were kept under 16 lx white light, or under blue, green, and red light with intensities of 16, 32, and 64 lx during the photophase, and after 7 d were sacrificed at 4 h intervals. The activities of melatonin-synthesizing enzymes and the contents of indoles were measured in the same pineal organ. The results revealed that the activities of tryptophan hydroxylase and arylalkylamine N-acetyltransferase, and the levels of all tryptophan derivatives had significant daily changes in birds kept under each light condition used. The profile of pineal indole metabolism in 4-week-old turkeys was characterized by high-amplitude rhythms in the activity of arylalkylamine N-acetyltransferase and the contents of N-acetylserotonin and melatonin, equal relative amounts of serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid, and higher content of melatonin than N-acetylserotonin. The monochromatic light significantly modified the pineal indole metabolism, and its effects were dependent on the color and intensity of light. Pronounced changes occurred in the level of serotonin synthesis and the daily rhythm course of melatonin synthesis.

Keywords: pineal organ; melatonin; serotonin; indoles; monochromatic light; turkey; birds

1. Introduction

Many physiological processes in birds are closely correlated with day and night alterations. The pineal organ and its main hormone, melatonin (MLT), play an important role in regulating these phenomena [1].

Avian pinealocytes are photosensitive due to the presence of two photopigments: pinopsin [2,3] and melanopsin [4]. Pinopsin is specific to the pineal organ, and controls the daily melatonin output [3,5,6]. Melanopsin occurs both in the pineal organ and the retina [7] and is involved in entrainment of the circadian clocks [8]. The axons of melanopsin-containing retinal ganglion cells build the retinal-hypothalamic tract that terminates in the suprachiasmatic nucleus [9,10]. The multisynaptic neuronal pathway connects this nucleus with the pineal organ, both in birds and mammals [11,12].

The color of light has an enormous influence on many physiological functions of birds. Red light reduces feather pecking, aggression, and cannibalism [13], and has a significant effect on egg-laying performance [13–15]. Green light increases early age growth of chicken broilers, and blue light increases

growth in older birds [16–19]. Moreover, blue light reduces motor activity [20] and plays a role in alleviating the stress response in broilers [21]. Simultaneous use of green and blue light combines the advantages of these two wavelengths [22]. It has a stimulatory effect on broiler body weight due to significantly improved influence on the feed conversion compared with normal artificial light [23], and enhances immune responses in broilers [21]. Chickens kept under blue light, compared with those reared under green light, attain lower body temperature, and have higher low-density lipoprotein cholesterol and glucose concentrations [24]. The color of light significantly influences the transcription of clock genes in the chicken pineal organ [25,26], however very little is known about the spectral effect of light on MLT synthesis and secretion [27].

Previous studies demonstrated that the pineal organ of the domestic turkey is a very attractive model for chronobiological studies [28,29]. Although both turkeys and chickens belong to the *Galliformes* family, the histological organization and ultrastructure of the turkey pineal organ differ greatly from the chicken pineal organ [30–33]. The turkey pineal gland possesses a tubule-follicular structure with highly developed rudimentary-receptor pinealocytes, which suggests that direct photoreception plays a primary role in the regulation of melatonin secretion [3,33]. Among all examined domesticated birds, the highest impact of direct pineal photoreception on melatonin secretion was demonstrated in the turkey [28]. The turkey pineal organ very quickly and precisely adapts the secretory activity to the phase-shifts of light–dark cycles and possesses a well-working circadian oscillator.

Detailed studies on pineal indole metabolism (see Appendix A, Figure A1) based on the measurements of all tryptophan derivatives occurring at considerable levels, have been performed in only a few avian species, including the chicken [34], duck [35], and goose [36,37]. The results showed prominent interspecies differences in the quantitative relationships between indoles and their daily changes in concentration. The obtained data indicate very important species-specific interplays between indoles, which are related to the limiting action of enzymes of the MLT-synthesis pathway.

The aims of this study were: (i) to characterize the metabolism of MLT-synthesis indoles in the pineal organ of the domestic turkey, and (ii) to determine the changes in this metabolism occurring under the influence of different wavelengths and intensities of light. For this purpose, 3-week-old turkeys were kept under 16 lx white light, or under blue, green, and red light with intensities of 16, 32, and 64 lx during photophases of 7 d, and then euthanized at 4 h intervals. To characterize the indole metabolism, the activities of four enzymes involved in melatonin-synthesis and content of eleven indolic compound were measured in the same pineal organ.

2. Results

2.1. Activities of Melatonin Synthesis Pathway Enzymes

2.1.1. Tryptophan Hydroxylase

The activity of tryptophan hydroxylase (TPH) showed a daily rhythm with significantly higher levels at 02.00, 06.00, and 10.00 than at 14.00, 18.00, and 22.00 in all studied groups of animals (Figure 1A). The difference between peak and nadir was approximately 4 folds. The TPH activity was significantly increased, at all time-points, in animals kept under red light with intensities of 32 and 64 lx, compared with turkeys from other groups.

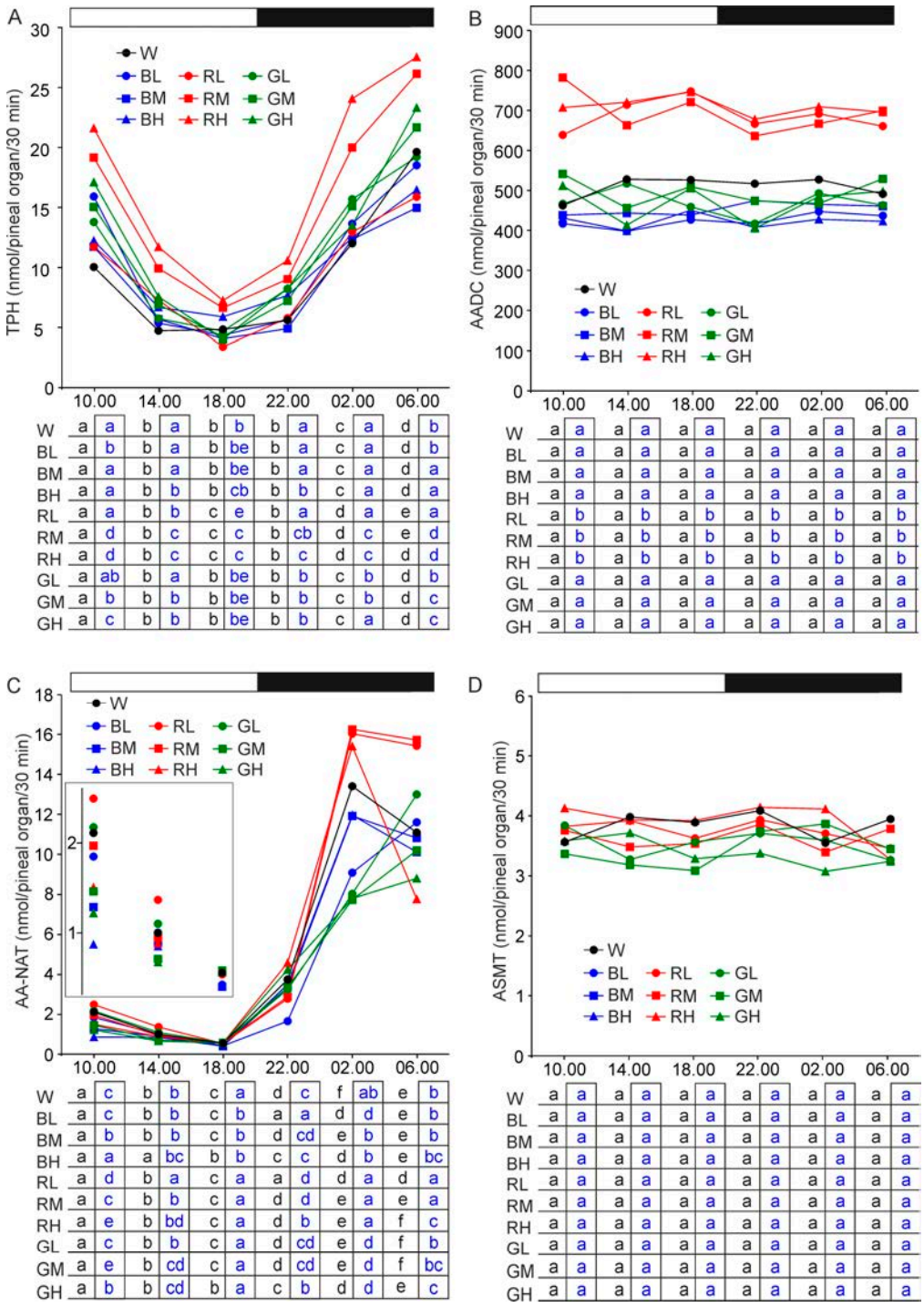


Figure 1. Activity (means) of tryptophan hydroxylase, TPH (**A**), aromatic amino acid decarboxylase, AADC (**B**), arylalkylamine N-acetyltransferase, AA-NAT (**C**) and N-acetylserotonin O-methyltransferase, ASMT (**D**) in the pineal organs of turkeys kept under white light (W) with intensity of 16 lx, blue light with intensities of 16 lx (BL), 32 lx (BM), and 64 1× (BH), red light with intensities of 16 lx (RL), 32 lx (RM), and 64 lx (RH), green light with intensities of 16 lx (GL), 32 lx (GM), and 64 lx (GH) during the photophase. Horizontal bar represents the periods of light and dark phases of a daily cycle. Insert shows data in a limited range of scale. The table charts below report results of the Duncan test. Black letters show differences between time-points within a group (horizontal line) and blue letters - between groups at each time-point (vertical line). The same letters indicate means, which are not significantly different.

2.1.2. Aromatic Amino Acid Decarboxylase

The activity of aromatic amino acid decarboxylase (AADC) did not change during a daily cycle course in the studied groups of turkeys (Figure 1B). It was significantly higher in birds exposed to red light during the photophase than in control turkeys and animals kept under blue and green lights. There were no differences in AADC activity between turkeys exposed to red illumination with different intensities.

2.1.3. Arylalkylamine N-Acetyltransferase

The activity of arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT) showed a prominent daily rhythm, with the lowest level at 18.00 and the highest levels at 02.00 and 06.00, in all studied groups of animals (Figure 1C). The course of daily changes in enzyme activity differed significantly between groups. AA-NAT activity at 10.00, 1 h after the photophase onset, was significantly lower in birds kept under monochromatic light with higher intensity than in those exposed to light with lower intensity. Moreover, at the lowest illumination intensity (16 lx), it was lower in animals kept under blue light than in turkeys exposed to red and green light. At the highest illumination intensity, it was also the lowest in blue-light-exposed animals. Similar differences between the studied groups of animals were also found at 14.00. At 18.00, the enzyme activity was significantly lower in blue-exposed birds than in animals exposed to red, green, and white light. A significant increase in AA-NAT activity was observed at 22.00, after 1 h of darkness. This increase was lower in animals kept under monochromatic light intensity of 16 lx than in those kept under light intensities of 32 and 64 lx. Increase in the enzyme activity was also significantly lower in animals exposed during the photophase to blue light than in turkeys kept under red and green illuminations with the same intensity (except 32 lx). The highest AA-NAT activity was found at 02.00, excluding the groups of birds kept under blue light with intensity of 16 lx and green light with intensities of 16, 32, and 64 lx, in which the peak was noted at 6.00. At 02.00, the highest activity was found in turkeys kept under red light and the lowest activity in animals kept under green light. The differences between peak and nadir of AA-NAT activity rhythm were between 24 and 29 folds in blue, red, and white light exposed animals, and only 13 folds in green exposed birds.

2.1.4. N-Acetylserotonin O-Methyltransferase

There were no significant differences in N-acetylserotonin O-methyltransferase (ASMT) activity between the investigated groups of turkeys (Figure 1D). The ASMT activity also did not change significantly in a daily cycle course.

2.2. Content of Melatonin Synthesis-Related Indoles

2.2.1. Tryptophan

The mean content of tryptophan (TRP) varied between 245.8 and 361.8 pmol/pineal organ (Figure 2), but there were large differences in the level of this amine acid between individuals. Two-way analysis of variance (ANOVA) showed no significant effect of illumination (group) and significant effect of sampling time on TRP content. According to the Duncan test, the TRP content was significantly higher at 18.00 than at 10.00, 14.00, 22.00, and 6.00 in control turkeys and animals kept under 32 and 64 lx blue light. It was also significantly higher at 18.00 and 22.00 than at 10.00 and 06.00 in turkeys kept under red light. No significant differences were detected by the Duncan test in turkeys kept under green light and 16 lx blue light. However, it should be noted that the mean values of TRP content in these animals fluctuated in parallel to those in control turkeys.

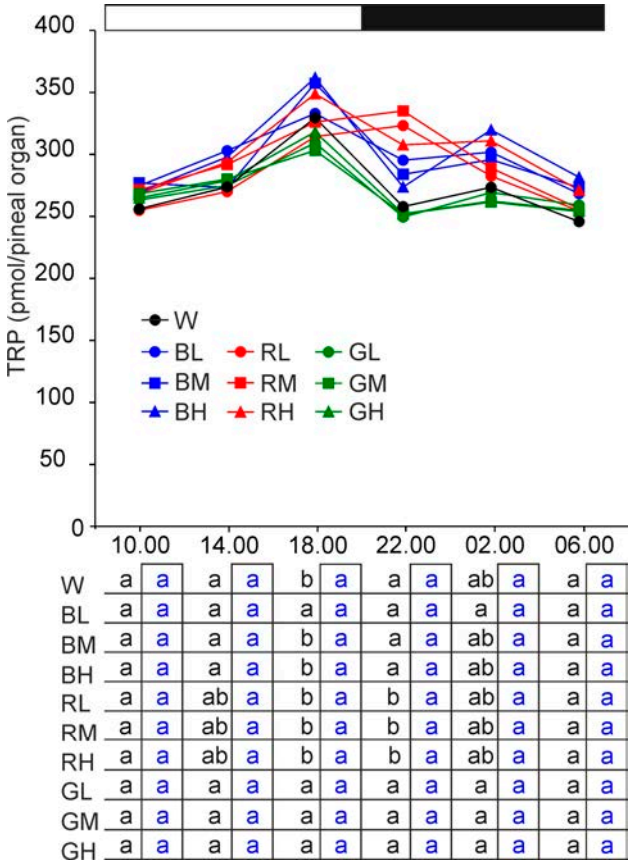


Figure 2. Content (means) of tryptophan (TRP) in the pineal organs of turkeys kept under white light (W) with intensity of 16 1×, blue light with intensities of 16 lx (BL), 32 lx (BM), and 64 lx (BH), red light with intensities of 16 lx (RL), 32 lx (RM), and 64 lx (RH), green light with intensities of 16 lx (GL), 32 lx (GM), and 64 lx (GH) during the photophase. For further explanation, see Figure 1.

2.2.2. 5-Hydroxytryptophan

The content of 5-hydroxytryptophan (5-HTRP) showed a daily rhythm with significantly higher levels at 10.00, 02.00, and 06.00 than at 14.00, 18.00, and 22.00 in all groups of turkeys (Figure 3A). It was also significantly higher at 02.00 and 06.00 than at 10.00 in animals kept under blue light with intensities of 32 and 64 lx, and at 06.00 than at 02.00 and 10.00 in turkeys exposed to red light with intensities of 32 and 64 lx. The difference between the peak and the nadir of the rhythm did not extend 2-fold in all groups of animals. Significant between-groups differences were noted exclusively at 10.00, when the 5-HTRP content was higher in turkeys kept under green light with intensities of 16 and 32 lx than in those kept under blue light.

2.2.3. Serotonin

The serotonin (5-HT) content showed a daily rhythm with significantly higher levels at 10.00, 14.00, and 18.00 than at 02.00 in all studied groups of animals (Figure 3B). Illumination with monochromatic light induced changes in the 5-HT level and the course of daily changes. Red light, independent of its intensity, had the most prominent effect on 5-HT level. The 5-HT content at 10.00, 14.00, 18.00, and 22.00 was approximately 2 folds higher in turkeys kept under red light than in other groups. In the red light exposed animals, the 5-HT content declined by more than 4 folds between 22.00 and 02.00, reaching the level similar to that in other groups. The 5-HT content was significantly higher at 22.00 than at 02.00 (and at 06.00 in most cases) in animals kept under red light, 32 and 64 lx green light, 64 lx blue light, while these differences were not found in animals kept under 16 lx green light,

16 and 32 lx intensity blue light, and white light. The prominent between-groups differences were also observed in the relationship between the content of 5-HT at 02.00 and 06.00.

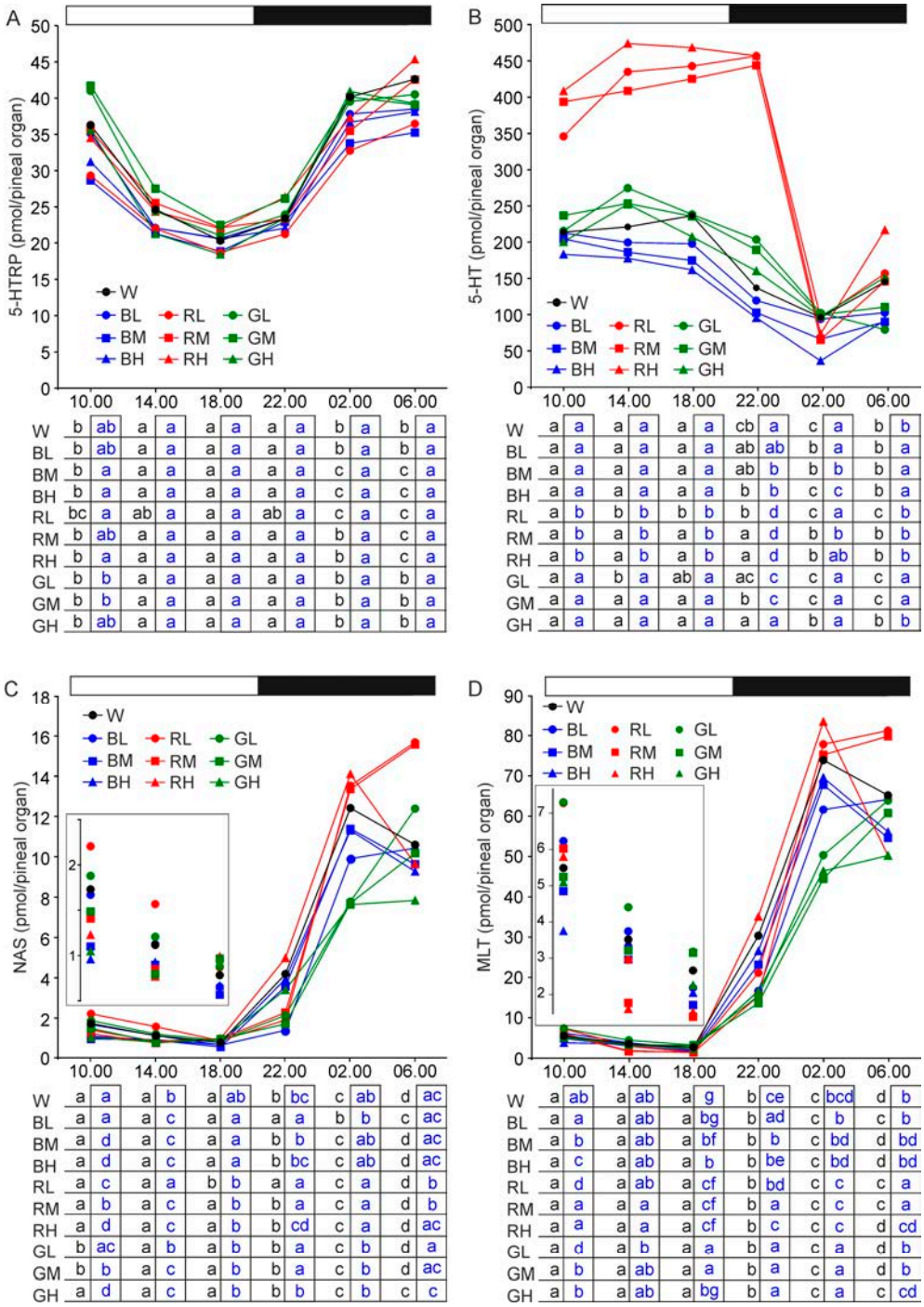


Figure 3. Content (means) of 5-hydroxytryptophan, 5-HTRP (**A**), serotonin, 5-HT (**B**), N-acetylserotonin, NAS (**C**), and melatonin, MLT (**D**) in the pineal organs of turkeys kept under white light (W) with intensity of 16 lx, blue light with intensities of 16 lx (BL), 32 lx (BM), and 64 lx (BH), red light with intensities of 16 lx (RL), 32 lx (RM), and 64 lx (RH), green light with intensities of 16 lx (GL), 32 lx (GM), and 64 lx (GH) during the photophase. For further explanation, see Figure 1.

2.2.4. N-Acetylserotonin

The content of N-acetylserotonin (NAS) changed significantly in a daily cycle course in all groups (Figure 3C). The nadir value varied from 0.56 to 0.98 pmol/pineal organ and occurred at 18.00, while the peak value varied from 7.89 to 15.69 pmol/pineal and occurred at 02.00 or 06.00, depending on the illumination conditions. The NAS content and its daily changes differed significantly between groups. On the first sampling point during the photophase, at 10.00, the NAS level was higher in animals kept under the 16 lx intensity of red light than blue light. It was also higher after exposure to light with lower intensity than to higher intensity, regardless of color. At 14.00, NAS level was lower than at 10.00 and it was the highest in animals kept under low intensity red light. The between group differences were less prominent at 18.00, except the low NAS level in turkeys kept under blue light. One hour after the onset of darkness, NAS content increased significantly in all groups and this increase was higher in turkey exposed to high intensity light than in those exposed to low intensity monochromatic light during the photophase. At 02.00, NAS content was significantly higher in animals kept under red light than under green light and low (16 lx) intensity blue light. NAS level declined significantly at 06.00 in animals kept under red light with intensity of 64 lx, blue light with intensities of 32 and 64 lx, and white light. In groups with lower intensity of daytime illumination, NAS content increased significantly between 02.00 and 06.00.

2.2.5. Melatonin

The daily changes in MLT content were nearly parallel to those for NAS level, except for higher amplitude of MLT rhythm (Figure 3D). The MLT levels were higher compared with NAS. At the nadir, the mean MLT content varied from 1.38 to 3.15, and at the peak from 50.2 to 83.4 pmol/pineal organ. The between-groups differences in MLT level were also similar to those described for NAS.

2.2.6. 5-Hydroxyindoleacetic Acid and 5-Hydroxytryptophol

The daily changes and the between groups differences in 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) and 5-hydroxytryptophol (5-HTOL) levels were similar to those described for 5-HT (Figure 4A,B). An exception was the lower proportion between peak and nadir of 5-HIAA and 5-HTOL rhythms compared with 5-HT rhythm in animals kept under red light. The differences in 5-HIAA and 5-HTOL contents between turkeys kept under red light and those from other groups were also smaller than those in 5-HT level.

2.2.7. 5-Methoxyindoleacetic Acid and 5-Methoxytryptophol

The 5-methoxyindoleacetic acid (5-MIAA) content showed a prominent daily rhythm, with the highest level from 10.00 to 18.00, in all groups of turkeys (Figure 4C). At 22.00, the level of 5-MIAA was significantly lower than at 10.00, 14.00, and 18.00. The lowest 5-MIAA level occurred at 02.00 or 06.00, depending on the illumination conditions.

The 5-MIAA content was significantly higher in turkeys kept under red light than in other animals at 14.00, 18.00, and 22.00. These differences were less prominent at 10.00. At 02.00, the highest 5-MIAA level was noted in turkeys kept under 16 lx and 32 lx green light, and the lowest in 64 lx red light and 64 lx blue light. Similar to 5-HT and 5-HIAA, the 5-MIAA content increased between 02.00 and 06.00 in turkeys kept under 32 lx and 64 lx blue light, 64 lx red light and white light, and slightly decreased in other animals.

The 5-methoxytryptophol (5-MTOL) content was almost 10-folds lower than that of 5-MIAA (Figure 4D). The daily changes in the 5-MTOL level were similar to those described for 5-MIAA, however the between group differences were more prominent. For illustration, the 5-MTOL level at 18.00 and 22.00 was significantly higher in turkeys kept under red light than under blue, white, and green light, and under blue light than under green light.

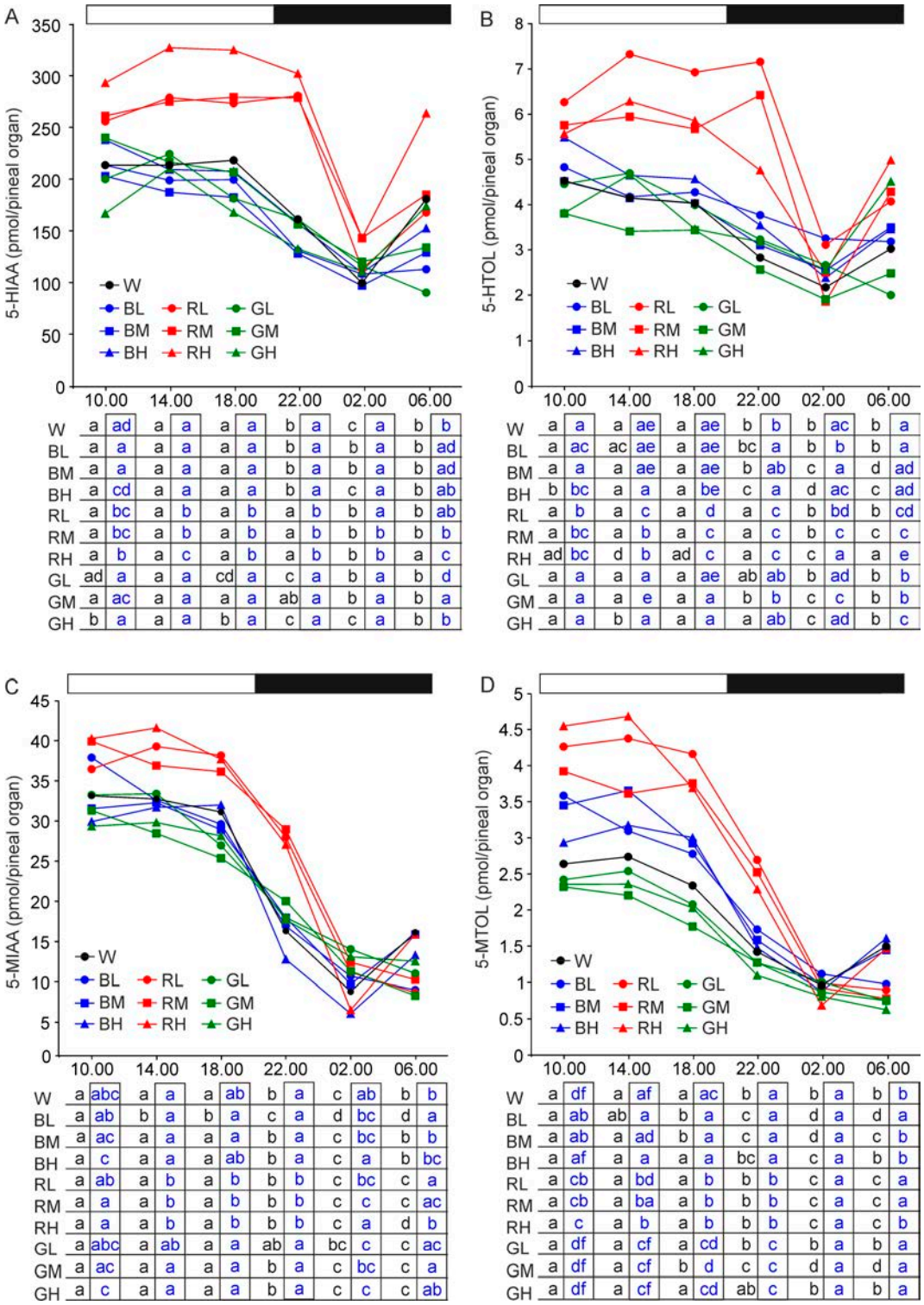


Figure 4. Content (means) of 5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA (**A**), 5-hydroxytryptophol, 5-HTOL (**B**), 5-methoxyindoleacetic acid, 5-MIAA (**C**), and 5-methoxytryptophol, 5-MTOL (**D**) in the pineal organs of turkeys kept under white light (W) with intensity of 16 lx, blue light with intensities of 16 lx (BL), 32 lx (BM), and 64 lx (BH), red light with intensities of 16 lx (RL), 32 lx (RM), and 64 lx (RH), green light with intensities of 16 lx (GL), 32 lx (GM), and 64 lx (GH) during the photophase. For further explanation, see Figure 1.

2.2.8. 5-Methoxytryptamine and 5-Methoxytryptophan

The 5-metoxytryptamine (5-MTAM) content showed a daily rhythm with significantly higher levels during the scotophase than during the photophase in turkeys kept under all light conditions (Figure 5). The 5-MTAM content did not change significantly in a course of the scotophase in animals reared under white, blue, and green light. However, in turkeys kept under red light, the 5-MTAM content increased during night and was significantly higher at 02.00 and 06.00 than at 22.00. Consequently, at 02.00 and 06.00, it was higher in red-exposed animals than in other animals exposed to monochromatic light. 5-Methoxytryptophan (5-MTRP) was undetectable in the turkey pineal organ.

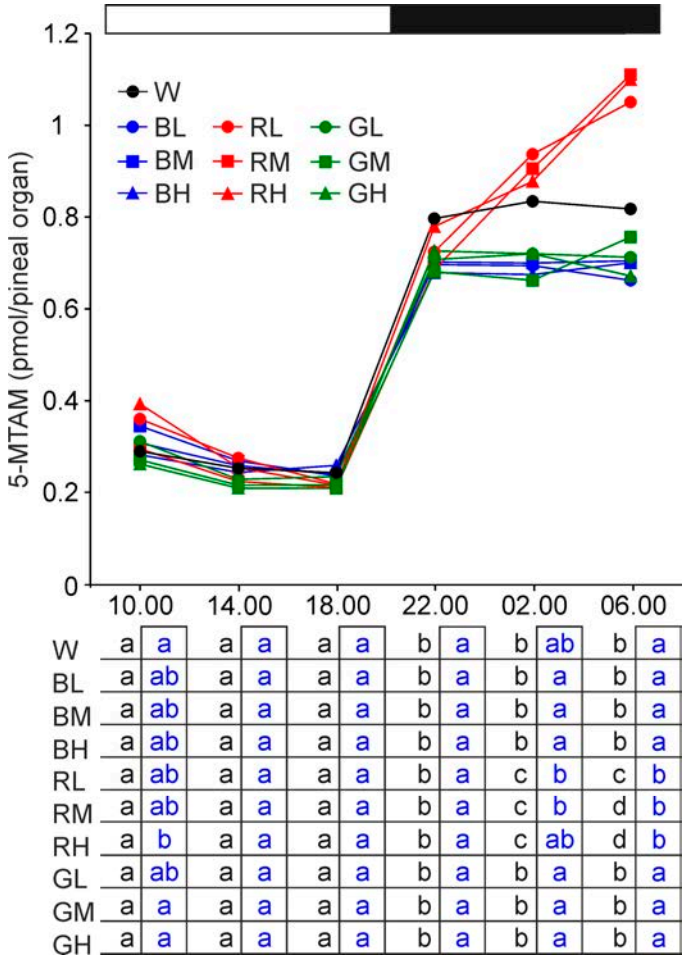


Figure 5. Content (means) of 5-metoxytryptamine (5-MTAM) in the pineal organs of turkeys kept under white light (W) with intensity of 16 lx, blue light with intensities of 16 lx (BL), 32 lx (BM), and 64 lx (BH), red light with intensities of 16 lx (RL), 32 lx (RM), and 64 lx (RH), green light with intensities of 16 lx (GL), 32 lx (GM), and 64 lx (GH) during the photophase. For further explanation, see Figure 1.

3. Discussion

3.1. Daily Rhythmicity in the Activities of Enzymes Governing Indole Metabolism in the Turkey Pineal Organ

Here, the activity of all four enzymes involved in MLT synthesis and the content of 11 indolic compounds related to this process were measured in the same pineal organ. Such simultaneous and multidimensional measurements were performed for the first time. The obtained results enabled a detailed analysis of changes in the pineal indole metabolism occurring in a daily cycle course.

Two enzymes, TPH and AA-NAT, showed daily rhythms of their activity in the turkey pineal organ. TPH activity was approximately 4 folds higher at 04.00 and 06.00 than at 14.00, 18.00, and 22.00, and this night-time increase obviously ensured delivery of 5-HT for intensive synthesis of NAS during darkness. The activity of TPH remained significantly elevated at 10.00 enabling renewal of 5-HT pool in pinealocytes.

In contrast to TPH, AA-NAT activity showed huge daily variations in the turkey pineal gland and these variations were responsible for daily rhythms in the content of all derivatives of TRP, except for 5-HTRP and 5-MTAM. In turkeys kept under white light, the peak value, occurring at 02.00 exceeded the nadir value, occurring at 18.00, approximately 25 folds. The daily changes in AA-NAT activity were reflected in the daily rhythms of NAS and MLT contents. The increase in AA-NAT activity at night resulted also in intensive utilization of 5-HT, and significant decrease in the level of this amine and the levels of the indoles derived from 5-HT oxidative deamination (5-HIAA, 5-HTOL, 5-MIAA, and 5-MTOL). The high amplitude daily fluctuations in the activity of AA-NAT and in the contents of NAS and MLT found in this study concur with our previous data showing the prominent rhythms in the secretion of MLT from the turkey pineal organ in superfusion culture [28] and in the MLT concentration in blood plasma [29].

The activity measurements of an enzyme in tissue homogenate may not reflect the real activity of that enzyme in living cells, therefore their results should be considered cautiously. However, the joint analysis of data concerning enzyme activities and contents of indoles leads to some important remarks. In the pineal organs of 4-week-old turkeys, the intracellular activity of AADC seems to be very high in relation to the substrate level. This idea is derived from the following data: (i) the AADC activity measured in the homogenate is almost 20 folds higher than the TPH activity assayed in vitro, (ii) the ratio of 5-HTRP content to 5-HT content is extremely low, and (iii) the amplitude of daily rhythm of 5-HTRP content is much lower than that of TPH activity rhythm. It should be also noted that decarboxylation into 5-HT is the only identified metabolic pathway of 5-HTRP in the turkey pineal organ, because there were no detectable amounts of 5-MTRP, a compound formed by the methylation of 5-HTRP.

Special attention should be paid to ASMT activity in the turkey pineal organ, since the NAS content was very low compared with MLT. Additionally, the amplitude of daily changes in NAS level was lower than that of MLT. In the studies performed on the pineal organs of other species, except the chicken, the NAS content was usually much higher than that of MLT, and the amplitude of NAS rhythm was prominently higher than that of MLT [36–38]. These relationships between NAS and MLT are commonly considered as evidence for the limiting role of ASMT in the pathway of MLT synthesis [38,39]. Our data suggest that ASMT activity is high enough to ensure the rapid conversion of NAS to MLT even at the nighttime peak, and this enzyme has a very weak or non-limiting effect on MLT synthesis in the pineal organs of 4-week-old turkeys.

In contrast to MLT synthesis, ASMT had a limiting effect on 5-MIAA and 5-MTOL formation at 02.00 and 06.00 in the investigated pineal gland, as shown by the more prominent nocturnal decrease in the 5-MIAA and 5-MTOL contents than in the 5-HIAA and 5-HTOL levels. This could be explained as the effect of very high nocturnal increase in NAS level and much higher affinity of ASMT to NAS than to 5-HIAA and 5-HTOL.

3.2. Metabolic Profile of Pineal Indoles

This study characterized for the first time the metabolic profile of MLT synthesis-related indoles in the turkey pineal organ. The previous investigations performed on the pineal organs of geese [36,37], ducks [35], and chicken [34] showed large interspecies differences in quantitative relationships between these indoles among birds. The most prominent of these involved 5-HT and the products of its oxidative deamination. The pineal organs of geese and ducks were characterized by high relative amounts of 5-HT, prominent daily changes in the level of this amine with a decline late in the night and low relative amounts of 5-HIAA. The goose pineal organ had the highest share of 5-HT, which represented 35–60% of

all studied indoles (the same indoles were assayed in all cited works). 5-HIAA comprised only 3.0–5.3% of the pineal indoles. In the duck pineal organ, 5-HT represented 15–35% of indoles, depending on the time of day, while 5-HIAA represented 8–15% of indoles. Contrarily, 5-HT represented less than 5% of all investigated indoles in the chicken pineal organ, while 5-HIAA represented 18–38% of the investigated indoles. The ratio of 5-HIAA to 5-HT levels was about 10 in chicken, but below 0.7 in ducks, and 0.1 in geese. The present study showed that 5-HT represented from 15.8% of the investigated indoles at 02.00 to 28.0% at 18.00 in turkeys kept under white light. The ratio of 5-HIAA/5-HT was close to 1 in the turkey pineal organ. Until now, we considered the high relative content of 5-HT as an attribute of the pineal organs of *Anseriformes* birds. This study shows similarities in the relative amount of 5-HT and 5-HIAA/5-HT ratio between the turkey and the duck, and prominent differences between the turkey and the chicken, two species belonging to the same order, *Galliformes*.

The prominent differences in the pineal indole profiles between the investigated avian species concerns also 5-MTAM. This amine was undetectable or hardly detectable in the chicken pineal organ [34], while it occurred at considerable levels in the pineal organs of the duck [35], the goose [36], and as shown here, the turkey.

The content of all investigated derivatives of TPR showed significant daily changes in the turkey pineal organ. The nocturnal increase in 5-HTRP level in turkeys was lower than in chicken [34] and close to that in ducks [35] and geese [36]. The important differences among species also concern the time of nocturnal increase in 5-HTRP level, which occurred later in the turkey than in other investigated birds. The 5-HT content showed a large decline in the second part of the scotophase in turkeys, geese, and ducks, while it suddenly increased at the end of night in chicken. The differences between peak and nadir of the daily rhythm of NAS and MLT were much higher in turkeys than in ducks [35] and goose [36], but lower than in chicken [34]. The rhythms of 5-HIAA and 5-HTOL followed that of 5-HT in all investigated species, however large interspecies differences concerned 5-MIAA and 5-MTOL. The daily rhythms of 5-MIAA and 5-MTOL in the duck pineal organ were almost parallel to the daily changes in their immediate precursors [35]. In contrast, the daily rhythms of 5-MIAA and 5-MTOL in the chicken pineal gland had no prior background on the changes in 5-HIAA and 5-HTOL levels [34]. It had been proposed that the extremely large increase in the NAS level at night, together with the much higher affinity of ASTM to this indoleamine than to 5-HIAA and 5-HTOL, decrease the synthesis of 5-MIAA and 5-MTOL. The proposed mechanism explains the occurrence of daily rhythm in 5-MIAA and 5-MTOL levels without analogous changes in the contents of 5-HIAA and 5-HTOL. In turkeys, the rhythms of 5-MIAA and 5-MTOL had higher amplitudes than those of 5-HIAA and 5-HTOL. Like in the chicken pineal organ, this phenomenon seems to have its source in competition among 5-hydroxyindoles for O-methylation by ASMT. Similar to ducks [35] and geese [36], the 5-MTAM level showed a daily rhythm with nocturnal increase in the pineal organ of turkeys. The mechanism responsible for its generation is unknown.

3.3. Effect of Monochromatic Light on Pineal Indole Metabolism

The obtained results showed prominent daily fluctuations in the pineal indole metabolism in birds kept during the photophase under blue, red, and green monochromatic light. First, it should be emphasized that high-amplitude rhythms in the AA-NAT activity and the NAS and MLT contents were found both in turkeys exposed to blue light and in animals exposed to red light, even at the lowest intensity. Melanopsin and pinopsin, two photopigments involved in the reception of light for the entrainment of biological rhythms, show very high sensitivity to blue light and very low sensitivity to red light [2,6,8]. Therefore, blue light is considered a crucial factor in the regulation of daily rhythmicity, and contrary, red light is believed to have very weak or no influence on the daily rhythmicity and it is commonly used as an equivalent of darkness in chronobiological experiments. Yadav et al. [40] demonstrated that the blue and red light periods of a daily cycle were interpreted by birds as day and night, respectively. We supposed that red light with intensity of 16 lx will be too insufficient for maintaining the daily rhythmicity in turkeys, and prominent decreases in

amplitude of day-night variations in AA-NAT activity as well as NAS and MLT contents were expected. Contrary to our hypothesis, the obtained data showed that the red illumination with intensity of 16 lx during the photophase is enough for preserving high amplitude daily rhythm in MLT synthesis in turkeys. It should be stressed that in our experiment, birds were kept under complete darkness during the scotophase, which may increase effectivity of dim light in the control of pineal rhythmicity. Recent studies show the significance of darkness at night in many aspects of animal physiology [41].

The monochromatic light significantly modified the pineal indole metabolism in turkeys and its effects were dependent on the color and intensity of the light. The prominent changes occurred in the course of daily rhythm of AA-NAT activity and, consequently, in MLT synthesis. The differences in light conditions affected: (i) the decline in AA-NAT activity after the photophase onset and the level of enzyme activity at the nadir, (ii) the increase in AA-NAT activity after the scotophase onset, and (iii) the time of the peak occurrence and the activity level at the peak. The decline in AA-NAT activity after the photophase onset was significantly higher in turkeys kept under blue light than under green and red light. Moreover, the inhibitory effect of light increased with the illumination intensity, independent of the light color. At the nadir, the AA-NAT activity was the lowest in blue-exposed birds. The increase in enzyme activity after the photophase onset was lower in the animals exposed to blue light than in the turkeys kept under red and green illuminations with the same intensity. The size of this rise increased with the monochromatic light intensity. The peak of AA-NAT activity occurred at 02.00 in turkeys kept under red light and blue light with intensity of 32 and 64 lx, but at 06.00 in birds kept under green light and 16 lx blue light. At the peak, the highest activity was found in turkeys kept under red light.

The red light significantly affected the performance of enzymes involved in 5-HT synthesis, increasing the activities of TPH and AADC. This effect was prominently reflected in the 5-HT content, which at 10.00, 14.00, 18.00, and 22.00 was approximately 2 folds higher in turkeys kept under red light than in other groups, and in the 5-HIAA, 5-HTOL, 5-MIAA, and 5-MTOL levels. The differences in 5-HIAA and 5-HTOL levels between red-exposed animals and other birds during the photophase were lower than those found in 5-HT level. It seems that the activity of monoamine oxidase is too low to produce more 5-HIAA and 5-HTOL. Interestingly, red light did not change the 5-HTRP level and this phenomenon could be explained by rapid transformation of 5-TRP into 5-HT. The red light affected the course of daily rhythm of 5-MTAM, increasing the level of this amine in the second part of the night.

The mechanisms by which the spectral light influences the pineal activity remain unknown. Three putative routes of color-dependent light action on the avian pineal organ should be considered: (i) via pinopsin- or melanopsin-positive structures in the pineal organ, (iii) via outer segments of retinal photoreceptor cells, and (ii) via melanopsin-containing processes of retinal ganglion cells. The first option is supported by the results of the in vitro studies showing that the entraining effect of light on MLT secretion is wavelength-related [42]. It should also be stressed that the pineal organ of 4-week-old turkeys comprises extremely well-developed rudimentary photoreceptor pinealocytes with the apical protrusions containing pinopsin [33]. Moreover, recent studies suggested that pinopsin is responsible for highly sensitive light reception in the retinas of lower vertebrates, which points to its ability to detect low-intensity light [43]. Regarding the second option, the retinal photoreceptor cells are good candidates because they are color selective and highly light sensitive. Moreover, they form synaptic contacts with melanopsin-containing ganglion cells. It has been demonstrated that monochromatic light affects the rhythmic expression of clock genes in retina photoreceptor cells in vitro [44]. For the third option, melanopsin-containing processes of retinal ganglion cells, the light spectral sensitivity of these cells needs verification in an in vivo model, to determine their ability to respond to red light.

It is well-documented that the use of monochromatic light during the photophase changes the circadian and daily rhythms in the expression of clock genes in the avian pineal organ [25,45–48]. In chicks reared under monochromatic light with intensity of 15 lx and then kept in continuous darkness, the transcription patterns of clock genes were significantly affected by the color of light [25]. The amplitudes and mesors of circadian rhythms were elevated for the positive clock genes (*Clock*, *Bmal1*)

and were reduced for the negative clock genes (*Per2*, *Cry*) in green light, and the opposite pattern was observed in red light. Compared with white light, blue light advanced the acrophases of the negative factors and delayed those of the positive elements. In contrast, red light advanced all the clock genes except *cClock* and *cPer2*, while green light delayed all the clock genes except *cBmal2*. The increased mRNA levels of the positive clock genes and the reduced mRNA levels of the negative clock gene were observed in chicks reared under green light but not in red light [25]. The published data on the effect of wavelength on the transcription of clock genes in chicken were subject to advanced statistical analysis by Yang et al. [45]. According to the results, clock gene transcription shows a circadian rhythm in long-wavelength light, while it is arrhythmic in short-wavelength light. *Clock* expression declines during the day and elevates during the night in birds treated with red light, shows an opposite pattern under green light, and is arrhythmic in blue light. Under the influence of green light, *Bmal1* expression elevates during the day and declines at night. However, in birds treated with red and blue light, *Bma1l* expression declines during the day and elevates at night.

Monochromatic light also affects AA-NAT gene expression in chicks kept under 12/12 L/D cycle [48]. It has been shown that green light enhances AA-NAT mRNA level, while red light decreases the level of this mRNA. The mesors and amplitudes of the daily rhythm of AA-NAT mRNA were higher in green light and lower in red light. Moreover, monochromatic light illumination affected the clock proteins in the chicken pineal gland. The protein levels of CLOCK and BMAL1 were elevated in green light and decreased in red light. Monochromatic light also affects the expression of opsins [48].

In contrast with the gene level, knowledge on the effects of monochromatic light on MLT synthetizing enzymes and indole levels is only fragmentary. It has been demonstrated that plasma MLT level during the subjective day under continuous darkness was significantly decreased in chicks reared in red light during the photophase, increased in green light, and was not changed in blue light [25]. Jin et al. [46] showed that green light during the photophase significantly increased the nocturnal plasma melatonin level in 7-day-old chicks. It has also been demonstrated that during the embryonic period, the rhythmic output of melatonin in the chick pineal gland is sensitive to the different monochromatic light wavelengths [47].

The photometric illuminance, expressed in lx, is commonly used as a measure of light intensity in the research of monochromatic light effects in animals, including the present one. The advantage of this measure is an easy comparison of results between studies and with zootechnical standards, because of the popularity. However, the big disadvantage of the photometric illuminance is its reference to the human eye sensitivity at daytime [49]. The spectral sensitivity of animals may differ from that in humans [49–51]. Such differences were reported in chickens and turkeys, therefore alternative units called chicken-lx and turkey-lx were proposed [50,51]. Due to differences between human and chicken spectral sensitivity, hens perceive an incandescent light source as 10–20% brighter than a fluorescent light source, when these are measuring the same lux-values [52]. In order to understand the biological effects of light, it is crucial to consider the perceived illuminance of light source by the particular species or even by the particular system in the body. It should be also noted that the measurement of photometric illuminance provided by white and color LED required a dedicated meter to avoid erroneous data. As an alternative for the photometric illuminance, Grubisic et al. [49] recommended measurement of the spectral irradiance (in $W/m^2 \times nm$), which is much more precise.

4. Materials and Methods

4.1. Birds and Experimental Design

The study was performed on females of the domestic turkey, Hybrid Converter strain (Hendrix Genetics, Boxmeer, The Netherlands). Due to technical reasons, the experiment was divided into 3 parts: red color, blue color, and green color. Each part started with transporting 1-day-old chicks from a commercial hatchery (Grelavi, SA, Olsztyn, Poland) to the chronobiological animal laboratory at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn,

Poland, where the turkeys were reared for 4 weeks in controlled temperature and humidity conditions according to zootechnical standards. The birds had free access to standard food and tap water.

The turkeys were kept under a cycle of 12/12 h light/dark (12L:12D). During the first 3 weeks, the light was provided by tungsten lamps (3200 K), which were automatically switched on at 09.00 and switched off at 21.00 of the daily time. The light intensity, measured at a distance of 20 cm from the floor, was 16 lx. After this period, birds were randomly divided into four separate rooms with different light conditions as described in Table 1. The light on and off times remained unchanged. The turkeys kept under white light were considered as the control.

Table 1. Light conditions during the last 7 days of the experiment.

Part of the Experiment	Animal Room	Light Source	Light Intensity
Red color	RL	GOQ 3 LED Red Dominant wavelength: 620–626 nm Luminous flux of module 24 lm Luminous intensity of LED: 1600–2200 mcd Half angle ± 60°	16 lx
	RM		32 lx
	RH		64 lx
	W	Tungsten lamps, 3200 K	16 lx
Blue color	BL	GOQ 3 LED Blue Dominant wavelength: 450–460 nm Luminous flux of module 21 lm Luminous intensity of LED: 600–1200 mcd Half angle ± 60°	16 lx
	BM		32 lx
	BH		64 lx
	W	Tungsten lamps, 3200 K	16 lx
Green color	GL	GOQ 3 LED Green Dominant wavelength: 520–530 nm Luminous flux of module 48 lm Luminous intensity of LED: 3000–4000 mcd Half angle ± 60°	16 lx
	GM		32 lx
	GH		64 lx
	W	Tungsten lamps, 3200 K	16 lx

The monochromatic light was provided by water and dust proof modules comprising three red, green, or blue light emitting diodes (GOQLED, Namyangju, Korea) with specifications presented in Table 1. The modules were mounted at equal distances from each other to white polystyrene plate with dimensions 100 × 200 cm (50 cm distance from the room wall on each side), which was suspended 2 m above the floor level. The light intensity was set up by the number of red, blue, and green modules mounted to the plate, and fine adjusted by regulating the supply voltage using the laboratory DC power supply unit (UTP 1305, Dongguan, Uni-Trend Technology, China). The light intensity was measured at a distance of 20 cm from the floor by a light meter dedicated to color LED light measurements (Multi-LED Light Meter TM-209M, Tenmars Electronics, Taipei, China).

The birds were kept in the new light conditions for 7 d. At the age of 4 weeks, six birds from each color/intensity group were sacrificed at 10.00, 14.00, 18.00, 22.00, 2.00, and 6.00. In each part of the experiment, four turkeys kept under white light were euthanized at the same time-points and the samples from these animals established a joint group (n = 12). The pineal organs were quickly removed and frozen at −75 °C. During the photophase, the pineal organs were collected under red light with intensity below 5 lx in the red part of the experiment, under green light with intensity below 5 lx in the green part of the experiment, and under blue light with intensity below 5 lx in the blue part of the experiment. An exception was the pineal organs of turkeys kept under white light, which were collected during the photophase under white light with intensity below 5 lx. During the scotophase, the euthanasia of animal was performed under complete darkness and the pineal organs were collected under red light with intensity not exceeding 3 lx in all parts of the experiment. All experimental procedures on birds were performed in accordance with Polish and EU law (AWG FVM UWM in Olsztyn opinion for project NCN ID 448523, 2 December 2019).

The results obtained in the animals kept under white light in the red, blue, and green parts of the experiment were compared with each other to check if there were any significant variations between these parts. This comparison showed no significant differences in activities of all studied enzymes and content of all studied indoles between the parts of the experiment.

4.2. Assay of Enzyme Activity and Indole Content

4.2.1. Chemicals

Methanol of gradient-grade high pressure liquid chromatography (HPLC) purity, ammonium iron (II) sulfate hexahydrate, and perchloric acid were provided by Merck Millipore (Billerica, MA, USA). Sodium acetate, sodium dihydrogen phosphate, sodium monohydrated phosphate, disodium EDTA, and acetic acid were purchased from J. T. Baker Chemicals (Center Valley, PA, USA). Tetrahydrobiopterin, dithiothreitol, 3-hydroxybenzylhydrazine dihydrochloride (NSD-1015), catalase from bovine liver, TRIS base, pyridoxal 5'-phosphate hydrate, pargyline, 5-tryptamine, acetyl-CoA sodium salt, S-adenosylmethionine, TRP, 5-HTRP, 5-HT, NAS, MLT, 5-HIAA, 5-MIAA, 5-MTOL, and 5 MTAM were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 5-HTOL and 5-MTRP were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Ultrapure water (18.2 MΩ, TOC ≤ 3 ppb), which was freshly prepared using a Milli-Q® IQ 7003/05 purification system (Merck Millipore, Billerica, MA, USA), was used in all procedures.

4.2.2. Sample Preparation for the Assays of Enzyme Activity and Indole Content

The frozen pineal glands were weighed and sonicated (5 × 2 s, 1 W) in 200 µL of cold water using a Vibra-Cell VC 70 ultrasonic processor equipped with a 2-mm probe (Sonics and Materials Inc., Newtown, CT, USA). Next, 80 µL of homogenate was added to an Eppendorf tube containing 20 µL of 1 mM perchloric acid, the mixture was vortexed, incubated for 15 min in an ice-bath and centrifuged at 30,000× *g* (4 °C) for 15 min (Allegra 64R, Coulter Beckman, Indianapolis, IN, USA). The supernatant was carefully transferred into autosampler vials and used in the assay of melatonin-synthesis related indoles. From the remaining part of the homogenate, 20 µL aliquots were added to Eppendorf tubes containing substrates used in the assays of TPH, AADC, AA-NAT, and ASMT. The time between the tissue sonication and beginning of incubation in the assays of enzymes did not extend beyond 30 s.

4.2.3. Content of Melatonin-Synthesis Related Indoles

The content of indoles in the pineal organ homogenates was measured by HPLC with fluorescence detection [35] using a Vanquish Duo U/HPLC system equipped with two gradient pumps, cooled dual split autosampler, column compartment and two fluorescence detectors (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The separation was performed on Hypersil Gold aQ columns with 3 µm particle size and dimensions of 150 × 4.6 mm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 30 °C. The mobile phase was prepared through on-line mixing of gradient-grade HPLC-purity methanol and a water solution of 5 mM sodium acetate and 0.01 mM disodium EDTA with pH 4.5 (by adding acetic acid). The initial concentration of methanol was 3% (*v*/*v*). Between the 7th and 20th min of the separation, the methanol content was linearly increased to 30% (*v*/*v*) and then maintained at a constant level. The flow rate of the mobile phase was 1 mL/min. The injection volume was 20 µL. The detection was performed at an excitation wavelength of 280 nm and an emission wavelength of 345 nm, at a constant temperature of 38 °C. The sensitivity of the detector was changed at the 15.25th min of the separation from level 6 to 8. The samples were stored in an autosampler at 10 °C for no longer than 8 h. The chromatograms were analyzed using Chromeleon 7.2.10 software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The limits of quantification (S/N ratio of 10:1 and RSD ≤ 15%) for all indoles was below 2 pg per injection. The intra-day precision (RSD of peak area) was below 2%, and the inter-day precision was below 3%.

4.2.4. Measurement of the Melatonin-Synthesis Pathway Enzymes Activities

Tryptophan Hydroxylase Activity

The activity of TPH was determined by measuring the accumulation of 5-HTP during incubation of the pineal homogenate with appropriate substrates and the AADC inhibitor [53]. Briefly, 20 µL of the homogenate was added to an Eppendorf tube containing 10 µL of 8 mM tryptophan, 10 µL of 3.2 mM tetrahydrobiopterin, 10 µL of 8 mM dithiothreitol, 10 µL of 8 mM ammonium iron (II) sulfate hexahydrate, 2.5 µL of catalase from bovine liver, 10 µL of 8 mM NSD 1015, and 7.5 µL of 1M TRIS acetate buffer. The tubes were incubated in a water bath at 38 °C for 30 min. The enzymatic reaction was stopped by adding 20 µL of 1 M perchloric acid. The tubes were kept in an ice-bath for 15 min and then centrifuged at 30,000× *g* (4 °C) for 15 min. To determine the blank values, the homogenates were added to the tubes containing 20 µL of 1 M perchloric acid and the above mentioned reagents. The tubes were incubated in an ice-bath for 30 min and centrifuged. Supernatants were carefully transferred into HPLC autosampler vials. The chromatographic analysis was performed as described for indoles, except that the detector sensitivity was set to level 2. The injection volume was 10 µL. The intra-day precision (RSD of peak area) and the inter-day precision were below 2%.

Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Activity

The activity of AADC was determined by measuring decarboxylation of 5-HTP into 5-HT in the presence of monoamine oxidase inhibitor [54]. The pineal homogenate (20 µL) was added to an Eppendorf tube containing 10 µL of 5 mM 5-HTP, 10 µL of 0.05 mM pyridoxal 5'-phosphate in phosphate buffer (0.2 M, pH 7.8), and 10 µL of 5 mM pargyline in the same buffer. After incubation at 38 °C for 30 min., the reaction was stopped by adding 10 µL of 1 M perchloric acid, the tubes were incubated in an ice-bath for 15 min, centrifuged, and the supernatant was transferred into an HPLC autosampler vial.

The chromatographic analysis was performed using the system, column, and mobile phase described in Section 4.2.3. The flow rate of the mobile phase was 1 mL/min. The methanol concentration was increased from 5% (*v/v*) to 10% (*v/v*) during the first 7 min of separation, kept at a constant level for 2 min, and then increased to 30% (*v/v*) during 11 min. After 10 min, the methanol level was stepwise decreased to the initial value. The injection volume was 2.5 µL. The detection parameters were as follows: an excitation wavelength 280 nm, an emission wavelength 345 nm, and temperature 38 °C. The detection was turned on at the 6th min of separation, and the detector sensitivity was set to level 1. The retention time of 5-HT was 6.4–6.5 min. The intra-day precision and the inter-day precision were below 2%.

Arylalkylamine N-Acetyltransferase Activity

The AA-NAT activity was determined by measuring the accumulation of N-acetyltryptamine [55]. The pineal homogenate (20 µL) was added to an Eppendorf tube containing 10 µL of 5 mM 5-tryptamine, 10 µL of 2.55 mM acetylo-CoA, and 10 µL of 0.2 mM phosphate buffer pH 6.8. The incubation and termination of the enzymatic reaction were performed as described above.

The chromatographic analysis was performed as described for AADC activity, except that the fluorescence detection was turned on at the 18th min of separation, and the detector sensitivity was set to level 4. The injection volume was 5 µL. The retention time of N-acetyl tryptamine was 25.9–26.0 min. The intra-day precision and inter-day precision were below 2%.

N-Acetylserotonin O-Methyltransferase Activity

The ASMT activity was determined by measuring the accumulation of MLT [56]. The pineal homogenate (20 µL) was added to an Eppendorf tube containing 10 µL of 2 mM N-acetylserotonin in phosphate buffer (0.2 M, pH 7.8) and 10 µL of 0.4 mM S-adenozynomethionine in phosphate

buffer (0.2 M, pH 7.8). The incubation and termination of the enzymatic reaction were performed as described above.

The chromatographic analysis was performed as described for AA-NAT activity. The injection volume was 5 µL. The retention time of N-acetyl tryptamine was 25.0–25.1 min. The intra-day precision and inter-day precision were below 2%.

4.3. Statistical Analysis

The data were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) with the light conditions and the sampling time as factors. Duncan's test was used as a post hoc procedure. A p-value < 0.05 was considered as significant. The analyses were performed using Dell Statistica 13 (Version 13.1 PL, Dell Inc., Tulsa, OK, USA).

5. Conclusions

The profile of pineal indole metabolism in 4-week-old turkeys is characterized by (i) high-amplitude rhythms in AA-NAT activity and the contents of NAS and MLT, (ii) equal relative amounts of 5-HT and 5-HIAA, and (iii) higher content of MLT than NAS. This profile differs markedly from that in the chicken by the intensity of 5-HT oxidative deamination and the mechanisms responsible for the generation of 5-MIAA and 5-MTOL rhythms, and from those in the goose and duck pineal organs by the amplitudes of NAS and MLT rhythms and the proportion of NAS to MLT. These data strongly support the idea that metabolism of pineal indoles shows important species-specific features.

The prominent daily rhythmicity is maintained in the pineal organs of turkeys kept during the photophase under red, blue, and green light, even at the intensity of 16 lx. However, the monochromatic light significantly modifies the pineal indole metabolism and its effects are dependent on the color and intensity of light. The pronounced changes occur during the course of daily rhythm of MLT synthesis. At the photophase onset, blue light has stronger inhibitor effects on MLT synthesis than green and red light, and the inhibitory effect of monochromatic light increases with its intensity, independent of wavelength. Exposition to blue light during the photophase results in slower increase in AA-NAT activity at night compared to red and green lights with the same intensity. The increase in MLT synthesis after the onset of darkness is also dependent on the intensity of monochromatic light during the photophase. The color and intensity of light affect the time of nocturnal peak occurrence and the amplitude of daily changes in the AA-NAT activity and contents of NAS and MLT. Moreover, red light significantly increases the synthesis of 5-HT, which results in higher levels of 5-HIAA, 5-HTOL, 5-MIAA, and 5-MTOL. Further studies are needed to explain the mechanisms of spectral-dependent action of light on the pineal indole metabolism.

Author Contributions: Conceptualization, B.L. and K.M.; methodology, B.L.; validation, B.L.; investigation, K.M., M.H., B.L.; writing-original draft preparation, K.M.; writing-review and editing, B.L.; visualization, K.M., B.L.; project administration, B.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The research and publication costs were supported by Minister of Science and Higher Education under the program entitled "Regional Initiative of Excellence" for the years 2019–2022, Project No. 010/RID/2018/19; the amount of funding was 12.000.000 PLN.

Acknowledgments: The authors would like to thank Magdalena Prusik and Natalia Szyryńska for their skillful technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

5-HIAA	5-hydroxyindoleacetic acid
5-HT	serotonin
5-HTOL	5-hydroxytryptophol
5-HTRP	5-hydroxytryptophan
5-MIAA	5-methoxyindoleacetic acid
5-MTAM	5-methoxytryptamine
5-MTOL	5-methoxytryptophol
5-MTRP	5-methoxytryptophan
AADC	aromatic L-amino acid decarboxylase
AA-NAT	arylalkylamine N-acetyltransferase
ASMT	N-acetylserotonin O-methyltransferase
HPLC	high pressure liquid chromatography
MLT	melatonin
NAS	N-acetylserotonin
TPH	tryptophan hydroxylase
TRP	tryptophan
BL	blue light 16 lx
BM	blue light 32 lx
BH	blue light 64 lx
GL	green light 16 lx
GM	green light 32 lx
GH	green light 64 lx
RL	red light 16 lx
RM	red light 32 lx
RH	red light 64 lx
W	white light 16 lx

Appendix A

Indole metabolism (Figure A1) in the pineal organ begins with the uptake of tryptophan (TRP) into pinealocytes. TRP is hydroxylated by tryptophan hydroxylase to 5-hydroxytryptophan (5-HTRP), which is decarboxylated by aromatic amino acid decarboxylase to serotonin (5-HT). This indoleamine is a starting point for three metabolic pathways. The first one is the transformation of 5-HT into melatonin (MLT). This process includes two steps: acetylation by arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT) to N-acetylserotonin (NAS), and methylation by N-acetylserotonin O-methyltransferase (ASMT) to MLT. The second one is oxidative deamination of 5-HT, which results in the formation of 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) and 5-hydroxytryptophol (5-HTOL). These indoles are methylated by ASMT to 5-methoxyindoleacetic acid (5-MIAA) and 5-methoxytryptophol (5-MTOL). Moreover, 5-HT can be methylated by ASMT to 5-methoxytryptamine (5-MTAM). The putative pathway is the methylation of 5-HTRP into 5-methoxytyptophan (5-MTRP)

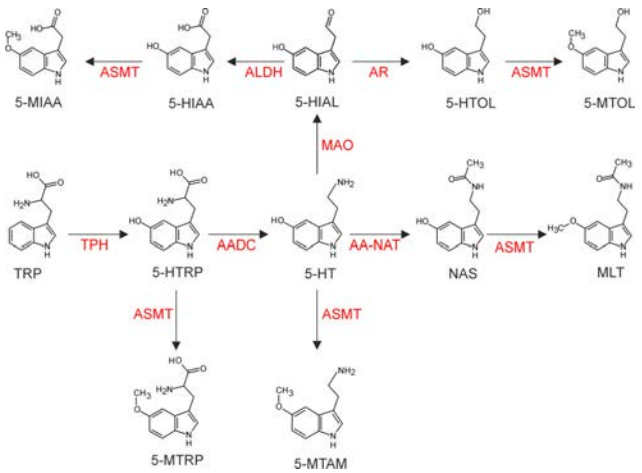


Figure A1. Metabolism of melatonin synthesis-related indoles in the pineal organ. Abbreviations: 5-HIAL, 5-hydroxyindole acetic aldehyde; ALDH, aldehyde dehydrogenase; AR, aldose reductase; MAO, monoamine oxidase; others—see the text above.

References

1. Gwinner, E.; Zeman, M.; Klaassen, M. Synchronization by low-amplitude light-dark cycles of 24-hour pineal and plasma melatonin rhythms of hatchling European starlings (*Sturnus vulgaris*). *J. Pineal Res.* **1997**, *23*, 176–181. [CrossRef]
2. Okano, T.; Takanaka, Y.; Nakamura, A.; Hirunagi, K.; Adachi, A.; Ebihara, S.; Fukada, Y. Immunocytochemical identification of pinopsin in the pineal glands of chicken and pigeon. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **1997**, *50*, 190–196. [CrossRef]
3. Petrusewicz-Kosińska, M.; Przybylska-Gornowicz, B.; Prusik, M.; Ziółkowska, N.; Lewczuk, B. Pinopsin and photoreception in the pineal organ of the domestic turkey during post-hatching development. *Micron* **2019**, *126*, 102749. [CrossRef]
4. Panda, S.; Sato, T.K.; Castrucci, A.M.; Rollag, M.D.; DeGrip, W.J.; Hogenesch, J.B.; Provencio, I.; Kay, S.A. Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* **2002**, *298*, 2213–2216. [CrossRef] [PubMed]
5. Okano, T.; Yoshizawa, T.; Fukada, Y. Pinopsin is a chicken pineal photoreceptive molecule. *Nature* **1994**, *372*, 94–97. [CrossRef] [PubMed]
6. Okano, T.; Fukada, Y. Phototransduction cascade and circadian oscillator in chicken pineal gland. *J. Pineal Res.* **1997**, *22*, 145–151. [CrossRef] [PubMed]
7. Holthues, H.; Engel, L.; Spessert, R.; Vollrath, L. Circadian gene expression patterns of melanopsin and pinopsin in the chick pineal gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *326*, 160–165. [CrossRef] [PubMed]
8. Torii, M.; Kojima, D.; Okano, T. Two isoforms of chicken melanopsins show blue light sensitivity. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 5327–5331. [CrossRef] [PubMed]
9. Gooley, J.J.; Lu, J.; Chou, T.C.; Scammell, T.E.; Saper, C.B. Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat. Neurosci.* **2001**, *4*, 1165. [CrossRef]
10. Hannibal, J. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res.* **2002**, *309*, 73–88. [CrossRef]
11. Jia, L.; Wang, Z.; Chen, Y. Distribution and cytoarchitecture of sympathetic neurons innervating the pineal gland in chick: A CTB-HRP study. *Anat. Histol. Embryol.* **2009**, *38*, 76–83. [CrossRef] [PubMed]
12. Cassone, V.M.; Forsyth, A.M.; Woodlee, G.L. Hypothalamic regulation of circadian noradrenergic input to the chick pineal gland. *J. Comp. Physiol. A Sens. Neural Bahav. Physiol.* **1990**, *167*, 187–192. [CrossRef]
13. Huber-Eicher, B.; Suter, A.; Spring-Stahli, P. Effects of colored light-emitting diode illumination on behavior and performance of laying hens. *Poultry Sci.* **2013**, *92*, 869–873. [CrossRef] [PubMed]
14. El Halawani, M.F. Light intensity requirement for breeder hen turkeys. *Gobbles* **2009**, *66*, 6–7.
15. Hassan, M.R.; Sultana, S.; Choe, H.S.; Ryu, K.S. Effect of monochromatic and combined light color on performance, blood parameters, ovarian, morphology, and reproductive hormones in laying hens. *Italian J. Anim. Sci.* **2013**, *12*, e56. [CrossRef]
16. Rozenboim, I.; Biran, I.; Uni, Z.; Robinzon, B.; Halevy, O. The effect of monochromatic light on broiler growth and development. *Poult. Sci.* **1999**, *78*, 135–138. [CrossRef]
17. Rozenboim, I.; Robinzon, B.; Rosenstrauch, A. Effect of light source and regimen on growing broilers. *Br. Poult. Sci.* **1999**, *40*, 452–457. [CrossRef]
18. Halevy, O.; Biran, I.; Rozenboim, I. Various light source treatments affect body and skeletal muscle growth by affecting skeletal muscle satellite cell proliferation in broilers. *Comp. Biochem. Physiol. A-Mol. Integr. Physiol.* **1998**, *120*, 317–323. [CrossRef]
19. Olanrewaju, H.A.; Purswell, J.L.; Maslin, W.R.; Collier, S.D.; Branton, S.L. Effects of color temperatures (kelvin) of LED bulbs on growth performance, carcass characteristics, and ocular development indices of broilers grown to heavy weights. *Poult. Sci.* **2015**, *94*, 338–344. [CrossRef]
20. Rodenboog, H. Sodium, green, blue, cool or warm-white light? *World Poult.* **2001**, *17*, 22–23.
21. Xie, D.; Wang, Z.X.; Dong, Y.L.; Cao, J.; Wang, J.F.; Chen, J.L.; Chen, Y.X. Effects of monochromatic light on immune response of broilers. *Poult. Sci.* **2008**, *87*, 1535–1539. [CrossRef] [PubMed]
22. Rozenboim, I.; Biran, I.; Chaiseha, Y.; Yahav, S. The effect of a green and blue monochromatic light combination on broiler growth and development. *Poult. Sci.* **2004**, *83*, 842–845. [CrossRef] [PubMed]
23. Yang, Y.; Yu, Y.; Pan, J.; Ying, Y.; Zhou, H. A new method to manipulate broiler chicken growth and metabolism: Response to mixed LED light system. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25972. [CrossRef] [PubMed]

24. Pan, J.; Yang, Y.; Yang, B.; Yu, Y. Artificial Polychromatic Light Affects Growth and Physiology in Chicks. *PLoS ONE* **2014**, *9*, 113595. [CrossRef]
25. Jiang, N.; Wang, Z.; Cao, J.; Dong, Y.; Chen, Y. Role of monochromatic light on daily variation of clock gene expression in the pineal gland of chick. *J. Photochem. Photobiol. B* **2016**, *164*, 57–64. [CrossRef]
26. Ma, S.; Wang, Z.; Cao, J.; Dong, Y.; Chen, Y. Effect of Monochromatic Light on Circadian Rhythm of Clock Genes in Chick Pinealocytes. *Photochem. Photobiol.* **2018**, *94*, 1263–1272. [CrossRef]
27. Ma, S.; Wang, Z.; Cao, J.; Dong, Y.; Chen, Y. BMAL1 but not CLOCK is associated with monochromatic green light-induced circadian rhythm of melatonin in chick pinealocytes. *Endocr Connect* **2019**, *8*, 57–68. [CrossRef]
28. Prusik, M.; Lewczuk, B. Roles of Direct Photoreception and the Internal Circadian Oscillator in the Regulation of Melatonin Secretion in the Pineal Organ of the Domestic Turkey: A Novel In Vitro Clock and Calendar Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4022. [CrossRef]
29. Prusik, M.; Lewczuk, B. Diurnal Rhythm of Plasma Melatonin Concentration in the Domestic Turkey and Its Regulation by Light and Endogenous Oscillators. *Animals* **2020**, *10*, 678. [CrossRef]
30. Ohshima, K.; Matsuo, S. Functional morphology of the pineal gland in young chickens. *Anat. Anz.* **1984**, *156*, 407–418.
31. Przybylska-Gornowicz, B.; Lewczuk, B.; Prusik, M.; Nowicki, M. Post-hatching development of the turkey pineal organ: Histological and immunohistochemical studies. *Neuro Endocrinol. Lett.* **2005**, *26*, 383–392. [PubMed]
32. Przybylska-Gornowicz, B.; Lewczuk, B.; Prusik, M.; Bulc, M. Pineal concretions in Turkey (Meleagris gallopavo) as a results of collagen mediated calcification. *Histol. Histopathol.* **2009**, *24*, 407–415. [PubMed]
33. Petrusewicz-Kosińska, M.; Przybylska-Gornowicz, B.; Ziółkowska, N.; Martyniuk, K.; Lewczuk, B. Developmental morphology of the turkey pineal organ. Immunocytochemical and ultrastructural studies. *Micron* **2019**, *122*, 8–20. [CrossRef] [PubMed]
34. Adamska, I.; Lewczuk, B.; Markowska, M.; Majewski, P.M. Daily profiles of melatonin synthesis-related indoles in the pineal glands of young chickens (*Gallus gallus domesticus* L.). *J. Photochem. Photobiol. B.* **2016**, *164*, 335–343. [CrossRef]
35. Lewczuk, B.; Ziółkowska, N.; Prusik, M.; Przybylska-Gornowicz, B. Diurnal profiles of melatonin synthesis-related indoles, catecholamines and their metabolites in the duck pineal organ. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 12604–12630. [CrossRef]
36. Ziółkowska, N.; Lewczuk, B.; Prusik, M. Diurnal and circadian variations in indole contents in the goose pineal gland. *Chronobiol. Int.* **2018**, *35*, 1560–1575. [CrossRef]
37. Hanuszewska, M.; Prusik, M.; Lewczuk, B. Embryonic Ontogeny of 5-Hydroxyindoles and 5-Methoxyindoles Synthesis Pathways in the Goose Pineal Organ. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3948. [CrossRef]
38. Liu, T.; Borjigin, J. N-acetyltransferase is not the rate limiting enzyme of melatonin synthesis at night. *J. Pineal Res.* **2005**, *39*, 91–96. [CrossRef]
39. Chattoraj, A.; Liu, T.; Zhang, L.S.; Huang, Z.; Borjigin, J. Melatonin formation in mammals: In vivo perspectives. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2009**, *10*, 237–243. [CrossRef]
40. Yadav, G.; Malik, S.; Rani, S.; Kumar, V. Role of light wavelengths in synchronization of circadian physiology in songbirds. *Physiol. Behav.* **2015**, *140*, 164–171. [CrossRef]
41. Rumanova, V.S.; Okuliarova, M.; Zeman, M. Differential Effects of Constant Light and Dim Light at Night on the Circadian Control of Metabolism and Behavior. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5478. [CrossRef] [PubMed]
42. Csernus, V.; Becher, P.; Mess, B. Wavelength dependency of light-induced changes in rhythmic melatonin secretion from chicken pineal gland in vitro. *Neuro Endocrinol. Lett.* **1999**, *20*, 299–304. [PubMed]
43. Sato, K.; Yamashita, T.; Kojima, K.; Sakai, K.; Matsutani, Y.; Yanagawa, M.; Yamano, Y.; Wada, A.; Iwabe, N.; Ohuchi, H.; et al. Pinopsin evolved as the ancestral dim-light visual opsin in vertebrates. *Commun. Biol.* **2018**, *1*, 156. [CrossRef] [PubMed]
44. Bian, J.; Wang, Z.; Dong, Y.; Cao, J.; Chen, Y. Effect of monochromatic light on the circadian clock of cultured chick retinal tissue. *Exp. Eye Res.* **2020**, *194*, 108008. [CrossRef]
45. Yang, Y.; Liu, Q.; Wang, T.; Pan, J. Wavelength-specific artificial light disrupts molecular clock in avian species: A power-calibrated statistical approach. *Environ. Pollut.* **2020**, *265*, 114206. [CrossRef]
46. Jin, E.; Jia, L.; Li, J.; Yang, G.; Wang, Z.; Cao, J.; Chen, Y. Effect of monochromatic light on melatonin secretion and arylalkylamine N-acetyltransferase mRNA expression in the retina and pineal gland of broilers. *Anat. Rec.* **2011**, *294*, 1233–1241. [CrossRef]

47. Drozdova, A.; Okuliarova, M.; Zeman, M. The effect of different wavelengths of light during incubation on the development of rhythmic pineal melatonin biosynthesis in chick embryos. *Animal* **2019**, *13*, 1635–1640. [CrossRef]
48. Jiang, N.; Cao, J.; Wang, Z.; Dong, Y.; Chen, Y. Effect of monochromatic light on the temporal expression of N-acetyltransferase in chick pineal gland. *Chronobiol. Int.* **2020**, *37*, 1140–1150. [CrossRef]
49. Grubisic, M.; Haim, A.; Bhusal, P.; Dominoni, D.M.; Gabriel, K.M.A.; Jechow, A.; Kupprat, F.; Lerner, A.; Marchant, P.; Riley, W.; et al. Light Pollution, Circadian Photoreception, and Melatonin in Vertebrates. *Sustainability* **2019**, *11*, 6400. [CrossRef]
50. Barber, C.L.; Prescott, N.B.; Jarvis, J.R.; Le Seuer, C.; Perry, G.C.; Wathes, D.M. Comparative study of the photopic spectral sensitivity of domestic ducks (Anas platyrhynchos domesticus), turkeys (Meleagris gallopavo gallopavo) and humans. *Br. Poult. Sci.* **2006**, *47*, 365–374. [CrossRef]
51. Lewis, P.D.; Morris, T.R. *Poultry Lighting: The Theory and Practice*; Northcot: Andover, UK, 2006; p. 176.
52. Mohammed, H.H. Assessment of The role of Light in Welfare of Layers. *SVU-Int. J. Vet. Sci.* **2019**, *2*, 36–50. [CrossRef]
53. Barbosa, R.; Scialfa, J.H.; Terra, I.M.; Cipolla-Neto, J.; Simonneaux, V.; Afeche, S.C. Tryptophan hydroxylase is modulated by L-type calcium channels in the rat pineal gland. *Life Sci.* **2008**, *82*, 529–535. [CrossRef] [PubMed]
54. Rahman, M.K.; Nagatsu, T.; Nagatsu, I.; Iizuka, R.; Narabayashi, H. Aromatic L-Animo decarboxylase activity in brains from normal human subjects and from patients with extrapyramidal diseases. *Biomed. Res.* **1981**, *2*, 560–566. [CrossRef]
55. Bradford, K.T.; Zawilska, J.; Iuvone, P.M. Arylalkylamine (serotonin) N-acetyltransferase assay using high-performance liquid chromatography with fluorescence or electrochemical detection of N-acetyltryptamine. *Anal. Biochem.* **1990**, *184*, 228–234.
56. Itoh, M.T.; Hattori, A.; Sumi, Y. Hydroxyindole-O-methyltransferase activity assay using high-performance liquid chromatography with fluorometric detection: Determination of melatonin enzymatically formed from N-acetylserotonin and S-adenosyl-L-methionine. *J. Chromatogr.* **1997**, *692*, 217–221. [CrossRef]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Changes in the Metabolic Profile of Melatonin Synthesis-Related Indoles during Post-Embryonic Development of the Turkey Pineal Organ

Kamila Martyniuk, Maria Hanuszewska-Dominiak and Bogdan Lewczuk *

Department of Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn, Poland
* Correspondence: lewczukb@uwm.edu.pl; Tel.: +48-(89)-523-39-49

Abstract: Research on age-dependent changes in pineal activity has been limited almost exclusively to melatonin (MLT). This study determined, for the first time, the alterations occurring in the metabolic profile of MLT synthesis-related indoles during the post-embryonic development period in birds. Turkeys reared under a 12 h light/dark cycle were euthanized at 2 h intervals for 24 h at the ages of 2, 7, 14, and 28 days and 10, 20, 30, and 45 weeks. The results showed prominent changes in the metabolic profile of indoles during development and could be distinguished in four stages. The first stage, from hatching to the age of 2 weeks, was characterized by a decrease in the 5-hydroxytryptophan concentration and an increase in the concentrations of serotonin (5-HT), MLT, 5-methoxyindoleacetic acid, and 5-methoxytryptamine (5-MTAM). During the second stage, around the age of 1 month, the concentrations of N-acetylserotonin (NAS) and MLT reached a maximum. The synthesis and degradation of 5-HT were also the highest. The third stage, around the age of 10 weeks, was characterized by decreased levels of 5-HT (approximately 50%) and 5-hydroxyindoleacetic acid and a high level of 5-MTAM. The last stage, covering the age of 20 to 45 weeks, was characterized by a large decrease in the synthesis, content, and degradation of 5-HT. Despite these changes, there were no prominent differences in the nocturnal levels of NAS and MLT between the third and fourth stages. The concentrations of all tryptophan derivatives showed daily fluctuations until the age of 45 weeks.

Keywords: pineal organ; melatonin; serotonin; indoles; development; turkey; birds

check for updates

Citation: Martyniuk, K.; Hanuszewska-Dominiak, M.; Lewczuk, B. Changes in the Metabolic Profile of Melatonin Synthesis-Related Indoles during Post-Embryonic Development of the Turkey Pineal Organ. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10872. https://doi.org/10.3390/ijms231810872

Academic Editors: Beatriz Caballero and Yaiza Potes

Received: 27 August 2022
Accepted: 14 September 2022
Published: 17 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The mammalian pineal gland matures after birth [1], and the melatonin (MLT) rhythm appears during the postnatal period in both humans [2] and rodents [3,4]. In humans, the nocturnal peak of blood MLT reaches its highest levels between the ages of 3 and 5 years, then decreases until puberty, and remains at a relatively stable level up to the age of 35–40 years [5,6]. Thereafter, it progressively decreases, being the lowest after the age of 60. Rodents have a similar pattern of MLT secretion [7–10]. In rats, the serum MLT concentration shows an early developmental rise after birth followed by a high-level period from 10 to 30 days and further age-related reduction [7,8]. In contrast to its levels in the blood, the MLT content in the pineal gland of rats increases until adulthood [8]. As in humans, the decreases in the pineal and blood levels of MLT with aging are pronounced in rodents [7–10].

Few studies have investigated the age-dependent changes in MLT secretion in birds. In domestic chickens, the daily rhythms of MLT synthesis have been reported during embryonic life [11]. Plasma MLT concentrations rose in chickens from embryonic day 19 to post-embryonic day 3 and oscillated around this level to post-embryonic day 21 [12] or increased to post-embryonic day 14 [13]. An age-dependent increase in the level of circulatory MLT was observed in broilers from hatching to 42 days of age; however, the rate of this increase varied with age [14]. Similarly, the rhythmic synthesis of MLT begins

during the embryonic life of the domestic goose [15]. A significant decline was reported in plasma MLT levels in old ring doves compared to the concentrations observed in mature and young animals [16]. Until now, studies on the levels of MLT in turkey blood have been focused on short life periods without considering possible changes in its levels at various stages of post-hatching development [17–19].

Research on age-dependent alterations in pineal activity has been limited almost exclusively to MLT. In the present study, we determined, for the first time, the changes occurring in the metabolic profile of MLT synthesis-related indoles during post-embryonic development. To achieve this goal, the activities of four enzymes involved in MLT synthesis and the content of ten indoles were measured in the same pineal organ.

This study was performed on domestic turkeys for three reasons. First, the domestic turkey is a perfect avian model for chronobiological research, with a high amplitude rhythm of MLT secretion and rapid, precise adaptation of this rhythm to changes in the light/dark cycle [20]. Second, the histology and ultrastructure of the pineal organ of turkeys are well characterized from day 1 to 1 year post-hatching life [21–23]. Morphological studies have shown that the pineal parenchyma is formed almost exclusively by rudimentary receptor pinealocytes up to the age of 4 weeks, and the involvement of secretory pinealocytes largely increases from the age of 20 weeks, changing the proportion between both types of cell [21,22]. This phenomenon enables the analysis of indole metabolism depending on the cellular composition of the parenchyma. Third, knowledge of domestic turkey physiology is important from a utilitarian point of view because of the great significance of turkeys as meat-producing animals [24,25]. Light is a critical factor that influences the health and production efficiency of poultry farms [26–35]. Many experiments have demonstrated the significance of MLT in mediating the effects of light on turkey productivity [26,27].

To characterize the changes in pineal indole metabolism during post-embryonic development, turkeys were reared from day 1 to 45 weeks under a 12 h light/dark cycle. The birds were euthanized at 2 h intervals for 24 h at the ages of 2, 7, 14, and 28 days and 10, 20, 30, and 45 weeks.

2. Results

2.1. Activities of Enzymes of the MLT Synthesis Pathway

Enzyme activity was expressed per 0.1 mg of the soluble protein content in the pineal homogenate. Two-way analysis of variance showed a significant effect of animal age on the activity of all MLT-synthesizing enzymes. Moreover, the effect of sampling time was significant in the analyses of data from tryptophan hydroxylase (TPH) and arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT) measurements. In the cases of both enzymes, significant interactions between animal age and sampling time were found.

2.1.1. Tryptophan Hydroxylase

The pineal activity of TPH (expressed per unit of the soluble protein content) increased within the first 2 weeks of post-hatching life (Figure 1A). During the scotophase, the TPH activity was significantly higher in 7-day-old turkeys than in 2-day-old turkeys and in 14-day-old birds than in 7-day-old birds. During the photophase, it was significantly higher in 14-day-old turkeys than in the younger birds. The activity of TPH in the pineal organs of turkeys aged 28 days was within the range defined by the levels found in the glands of birds aged 7 and 14 days. Compared to turkeys aged 28 days, TPH activity in birds aged 10, 20, 30, and 45 weeks was always significantly lower. Moreover, during the scotophase (from 22:00 h) and early photophase, it was significantly lower in the pineal organs of 45-week-old turkeys than in those of 10-week-old birds.

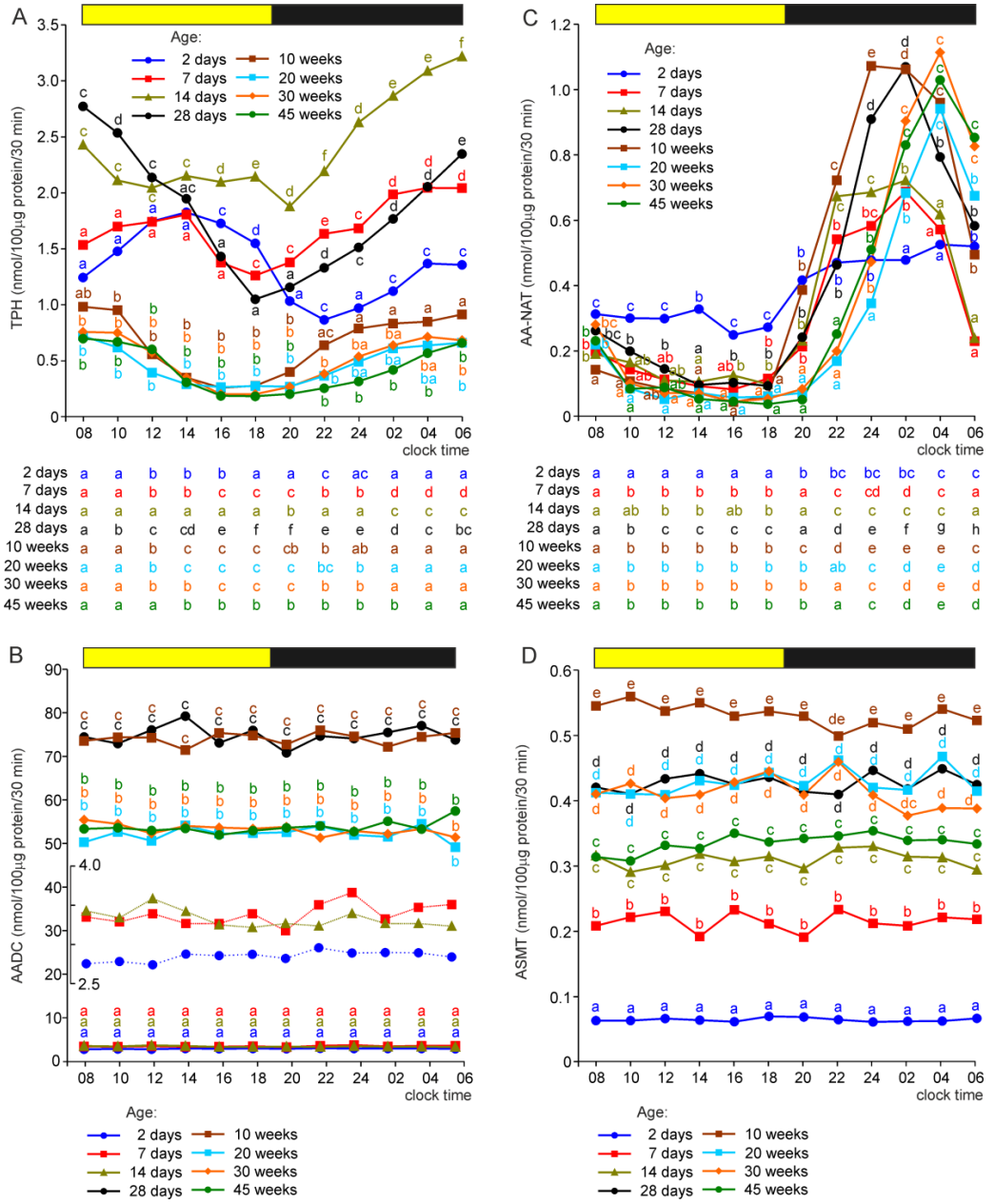


Figure 1. Activity (means) of tryptophan hydroxylase, TPH (**A**), aromatic amino acid decarboxylase, AADC (**B**), arylalkylamine N-acetyltransferase, AA-NAT (**C**), and N-acetylserotonin O-methyltransferase, ASMT (**D**) in the pineal organs of turkeys at the ages of 2, 7, 14, 28 days and 10, 20, 30, 45 weeks. The horizontal bar represents the periods of light and dark phases of the daily cycle. The letters on the charts show differences between age groups at each time-point in Duncan's test. The letters below the charts show differences between time-points within a group in Duncan's test. The same letters indicate means which are not significantly different. Insert in figure (**B**) shows AADC activity in the pineal organs of turkeys aged 2, 7, and 14 days at the limited *y*-axis scale.

The TPH activity in the pineal organs of all studied groups of turkeys changed daily, but the course of these changes differed depending on animal age (Figure 1A). In the pineal organs of birds aged 2 and 7 days, the enzyme activity increased gradually during the first half of the photophase, slowly decreased during the second half, and then increased during the scotophase. In the pineal organs of birds aged 14 days, the TPH activity was rather stable during the photophase and increased prominently during the scotophase. The activity of TPH in older animals decreased gradually during the photophase and increased

during the scotophase. The highest TPH activities were noted in these birds at 08:00, 10:00, 04:00, and 06:00 h and the lowest at 16:00 and 18:00 h.

2.1.2. Aromatic Acid Decarboxylase (AADC)

The activity of AADC showed exceptional changes during the post-hatching development of the turkey pineal organ (Figure 1B). The lowest activities of this enzyme were found in turkeys at the age of 2 days. The AADC activities were approximately 25% higher in the pineal organs of birds aged 7 and 14 days. A 20-fold increase in the AADC activity was observed between the ages of 14 and 28 days. The activity of AADC in 10-week-old turkeys was similar to that in 4-week-old birds. A significant, approximately 30%, decrease in the AADC activity was noted between the ages of 10 and 20 weeks. No significant differences were found in the enzyme activity between the animals aged 20, 30, and 45 weeks. AADC showed no significant daily variations in its activity.

2.1.3. Arylalkylamine N-Acetyltransferase

The effect of age on AA-NAT activity should be analyzed together with time-dependent changes in enzyme activity to avoid false conclusions (Figure 1C). In the pineal organs of turkeys of all age groups (except the youngest one), the activity of AA-NAT decreased at the beginning of the photophase and remained stable until the scotophase. AA-NAT activity increased after the onset of darkness, and this increase was slower in turkeys aged 20, 30, and 45 weeks than in younger birds. Consequently, the AA-NAT activity was lower in older animals than in younger ones at the beginning of the scotophase, and the nocturnal peak of AA-NAT activity occurred later in turkeys aged 20, 30, and 45 weeks than in younger birds. However, there were no differences in the peak activity of AA-NAT between the turkeys at 4–45 weeks. The nocturnal increase in AA-NAT activity was significantly lower in turkeys aged 2, 7, and 14 days than in older turkeys. It was also lower in 2-day-old birds than in 7- and 14-day-old turkeys. During the photophase, the AA-NAT activity was significantly higher in 2-day-old turkeys than in older birds.

2.1.4. Serotonin O-Methyltransferase (ASMT)

The pineal activity of ASMT was the lowest in turkeys at the age of 2 days. It was approximately four-fold higher in 7-day-old birds and five-fold higher in 14-day-old birds than in the youngest individuals (Figure 1D). The ASMT activity was also significantly higher in turkeys aged 28 days than in birds at the age of 14 days. A further increase in AMST activity occurred between the ages of 4 and 10 weeks, resulting in the highest activity level at the end of this period. ASMT activity was significantly lower in the pineal organs of turkeys at 20, 30, and 45 weeks than in birds aged 10 weeks. No significant daily fluctuations in ASMT activity were found in any of the investigated groups of turkeys.

2.2. Indoles Related to Melatonin Synthesis Pathway

The concentration of indoles was expressed per 0.1 mg of the soluble protein content of the pineal homogenate. Two-way analysis of variance showed significant effects of animal age and sampling time on the pineal concentrations of all tryptophan derivatives. Significant interactions between these two factors were also observed for these compounds.

2.2.1. Tryptophan (TRP)

The concentration of TRP (expressed per unit of the soluble protein content) in the pineal organ was significantly higher between 16:00 and 20:00 h in turkeys at the age of 28 days than in younger and older birds (Figure 2). No significant daily fluctuations were observed in TRP levels independent of animal age.

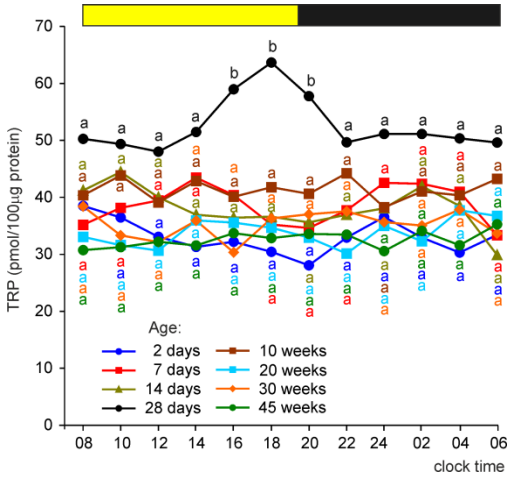


Figure 2. Concentration (means) of tryptophan in the pineal organs of turkeys at the ages of 2, 7, 14, 28 days and 10, 20, 30, 45 weeks. The horizontal bar represents the periods of light and dark phases of the daily cycle. The letters on the charts show differences between age groups at each time-point in Duncan's test. The same letters indicate means which are not significantly different.

2.2.2. 5-Hydroxytryptophan (5-HTRP)

The highest concentrations of 5-HTRP were found in the pineal organs of 2-day-old turkeys (Figure 3A). In the pineal organs of birds aged 7 days, 5-HTRP levels were significantly lower compared to those found in the youngest turkeys at all investigated time-points. Similarly, 5-HTRP concentrations were significantly lower in turkeys at the age of 14 days than in the birds aged 7 days (except at 04:00 and 06:00 h). More complex relationships were found when comparing the pineal concentrations of 5-HTRP in turkeys at the ages of 4 and 10 weeks with younger birds, mainly because of different courses of daily fluctuations. Generally, these concentrations were significantly lower at 16:00 and 18:00 h in 4- and 10-week-old turkeys than in younger ones but were similar or even higher at other time-points. The lowest concentrations of 5-HTRP were found in the pineal organs of turkeys at the ages of 20, 30, and 45 weeks. During the photophase, 5-HTRP concentrations were significantly lower in these turkeys than in birds at the ages of 2, 7, 14, and 28 days. During the scotophase (from 22:00 h), they were lower than those in turkeys at the ages of 2 and 28 days and 10 weeks.

Significant daily fluctuations in the concentration of 5-HTRP were found in all investigated groups of turkeys, but their courses and amplitudes differed markedly depending on the age of the animals (Figure 3A). In the pineal organs of 2-, 7-, and 14-day-old turkeys, 5-HTRP concentrations were significantly higher during the photophase than at 02:00, 04:00, and 06:00 h; however, the amplitudes of daily fluctuations decreased with the age of turkeys. In contrast, in older birds, the lowest levels of 5-HTRP were observed in the second half of the photophase. Among these animals, the highest amplitude of daily change was noted in 10-week-old turkeys.

2.2.3. Serotonin (5-HT)

The concentration of 5-HT measured during the photophase consequently increased in the course of post-hatching development from the age of 2 to 14 days (Figure 3B). Such changes were not noted for the levels measured during the scotophase. 5-HT concentration in the pineal organs of the 28-day-old turkey was similar to that in 14-day-old birds. The level of 5-HT was significantly lower in the pineal organs of turkeys aged 10 weeks than in those of 28-day-old turkeys. The lowest concentrations of 5-HT were observed in turkeys at the ages of 20, 30, and 45 weeks. From 08:00 to 20:00 h, they were more than two-fold lower than those at the age of 10 weeks.

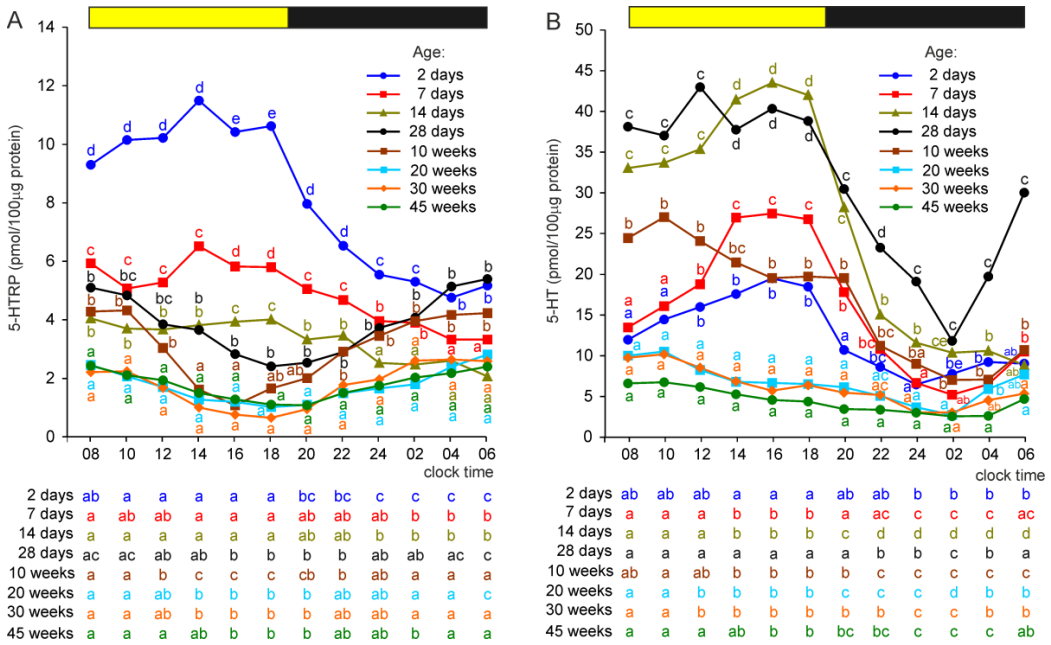


Figure 3. Concentrations (means) of 5-hydroxytryptophan, 5-HTRP (**A**), and serotonin, 5-HT (**B**), in the pineal organs of turkeys at the ages of 2, 7, 14, 28 days and 10, 20, 30, 45 weeks. The horizontal bar represents the periods of light and dark phases of the daily cycle. The letters on the charts show differences between age groups at each time-point in Duncan's test. The letters below the charts show differences between time-points within a group in Duncan's test. The same letters indicate means which are not significantly different.

The concentration of 5-HT showed significant daily changes in all investigated groups. In the pineal organs of turkeys at the ages of 2, 7, and 14 days, the concentration of 5-HT increased during the photophase to reach maximal values in the second half of this phase and then decreased during the scotophase (Figure 3B). The amplitude of daily fluctuations increased with the age of the birds. In 28-day-old turkeys, the level of 5-HT was rather stable during the photophase and decreased after the onset of the scotophase, reaching the minimum value at 02:00, and then quickly increased. The concentration of 5-HT in older birds was the highest at 08:00 and 10:00 h, followed by a gradual decrease to reach the minimum at 02:00 h, and then increased again.

2.2.4. N-Acetylserotonin (NAS)

The photophase concentrations of NAS were approximately 3–5-fold higher in 2-day-old turkeys than in older birds (Figure 4A). During the scotophase, NAS concentrations increased significantly in all groups of turkeys. In the initial phase of post-hatching development, the scotophase levels of NAS decreased with age; they were significantly lower in 7-day-old birds than in 2-day-old and in 14-day-old than in 7-day-old birds. In the next period of post-hatching development, the scotophase concentrations of NAS increased and were significantly higher in turkeys aged 4, 10, 20, 30 and 45 weeks than in 2-, 7-, and 14-day-old birds.

The daily profiles of NAS concentrations differed markedly between age groups. In turkey aged 2 days, the NAS level increased approximately two-fold within 4 h after the onset of darkness and then remained at a relatively stable level (Figure 4A). In older birds, the levels of NAS increased stepwise in the first part of the scotophase and then decreased. The peaks were reached earlier in turkeys aged 7, 14, and 28 days and 10 weeks than in older birds.

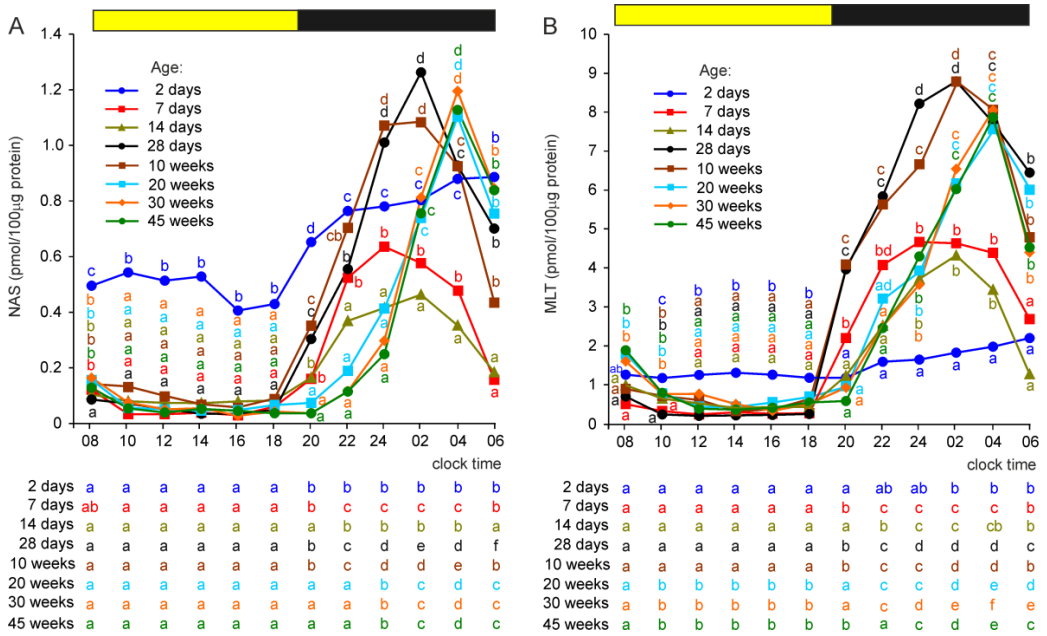


Figure 4. Concentrations (means) of N-acetylserotonin, NAS (**A**), and melatonin, MLT (**B**), in the pineal organs of turkeys at the ages of 2, 7, 14, 28 days and 10, 20, 30, 45 weeks. The horizontal bar represents the periods of light and dark phases of the daily cycle. The letters on the charts show differences between age groups at each time-point in Duncan's test. The letters below the charts show differences between time-points within a group in Duncan's test. The same letters indicate means which are not significantly different.

2.2.5. Melatonin

The concentration of MLT was significantly higher during the photophase between 10:00 and 18:00 h in turkeys aged 2 days than in older birds, but the differences were much smaller compared to those in the NAS level (Figure 4B). During the scotophase, between 22:00 and 04:00 h, MLT concentration was significantly lower in 2-day-old turkeys than in older birds. The levels of MLT in the pineal organs of birds aged 7 and 14 days were mostly similar and approximately two-fold higher than in 2-day-old turkeys and approximately two-fold lower compared to the peak values in birds aged 4–45 weeks. The daily profiles of MLT concentration were similar to those of the NAS levels.

2.2.6. 5-Hydroxyindole Acetic Acid (5-HIAA) and 5-Hydroxytryptophol (5-HTOL)

In contrast to 5-HT levels, the concentration of 5-HIAA was significantly higher in the pineal organs of turkeys at the age of 2 days than in 7- and 14-day-old birds (Figure 5A). The level of 5-HIAA in 28-day-old birds was similar to that in 2-day-old turkeys. In animals aged 10, 20, 30, and 45 weeks, the pineal concentrations of 5-HIAA were significantly lower than in turkeys aged 28 days.

The concentrations of 5-HIAA showed significant daily changes in all turkey groups, and their courses were similar to the age-specific daily fluctuations in the 5-HT level.

The pineal level of 5-HTOL decreased during development between 2 and 14 days of age, with a prominent drop between 2 and 7 days (Figure 5B). Next, it increased in turkeys at the ages of 4 and 10 weeks compared to the concentrations found in 14-day-old birds, but significant differences were not noted at all time-points because of the different course of the daily profile of 5-HTOL in these groups. The concentrations of 5-HTOL were significantly lower between 08:00 and 02:00 h in turkeys at the ages of 20, 30, and 45 weeks than in birds at the age of 10 weeks.

The concentrations of 5-HTOL significantly changed during the daily cycle. The course of these changes differed depending on the age of the birds and was similar to that of 5-HT levels.

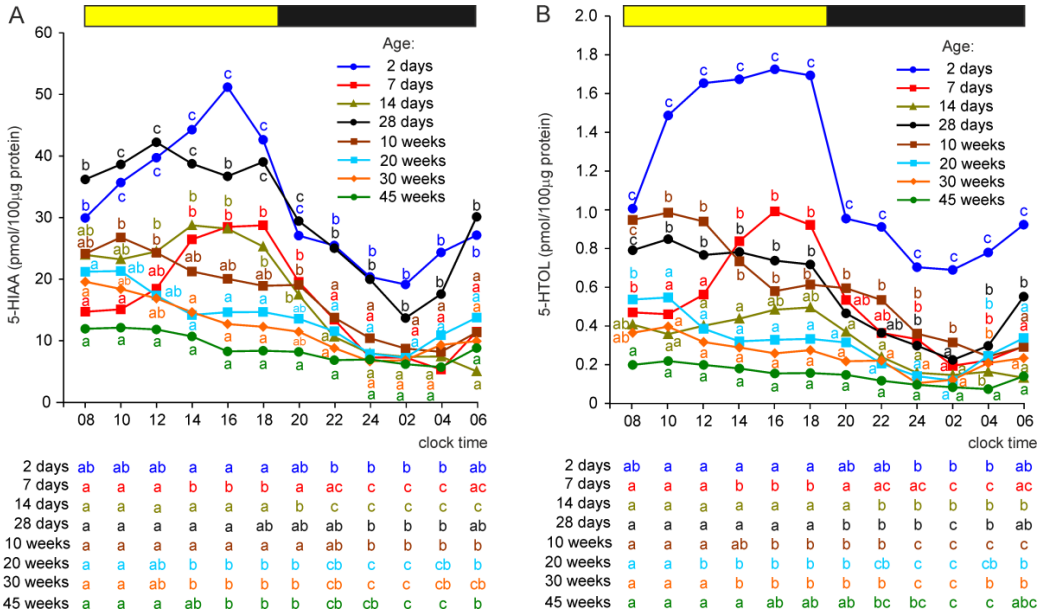


Figure 5. Concentrations (means) of 5-hydroxyindole acetic acid, 5-HIAA (**A**), and 5-hydroxytryptophol, 5-HTOL (**B**), in the pineal organs of turkeys at the ages of 2, 7, 14, 28 days and 10, 20, 30, 45 weeks. The horizontal bar represents the periods of light and dark phases of the daily cycle. The letters on the charts show differences between age groups at each time-point in Duncan's test. The letters below the charts show differences between time-points within a group in Duncan's test. The same letters indicate means which are not significantly different.

2.2.7. 5-Methoxyindole Acetic Acid (5-MIAA) and 5-Methoxytryptophol (5-MTOL)

In contrast to 5-HIAA, the lowest concentrations of its metabolite, 5-MIAA, were found in 2- and 7-day-old turkeys (Figure 6A). The concentration of 5-MIAA was higher in birds at the age of 14 days than in younger birds between 08:00 and 20:00 h. In turkeys aged 4 and 10 weeks, the pineal levels of 5-MIAA were significantly higher than in younger birds at all time-points. The levels of 5-MIAA were significantly lower in 20-, 30-, and 45-week-old turkeys compared to 10-week-old birds during the photophase but not during the scotophase.

The concentrations of 5-MIAA changed significantly during the daily cycle in all groups of turkeys (Figure 6A). The concentrations of 5-MIAA in the pineal organs of 2-day-old turkeys were significantly higher at 16:00 and 18:00 h than between 20:00 and 12:00 h. In birds aged 7 and 14 days, they were significantly higher between 08:00 and 20:00 h than between 22:00 and 04:00 h (or 06:00 h in 14-week-old birds). The highest levels of 5-MIAA in these birds were noted in the second half of the photophase. In contrast, in older birds, the concentrations of 5-MIAA were the highest in the first half of the photophase. In 28-day-old turkeys, 5-MIAA concentrations were significantly higher during the photophase than during the scotophase, with a peak at 12:00 h and a nadir at 02:00 h. Similar daily profiles of 5-MIAA levels, but with a peak at 10:00 h, were found in 10-, 20-, and 30-week-old turkeys. In turkeys aged 45 weeks, the levels of 5-MIAA were only slightly higher in the first half of the photophase than in the second one, and the lowest concentrations of 5-MIAA were observed at 02:00 and 04:00 h.

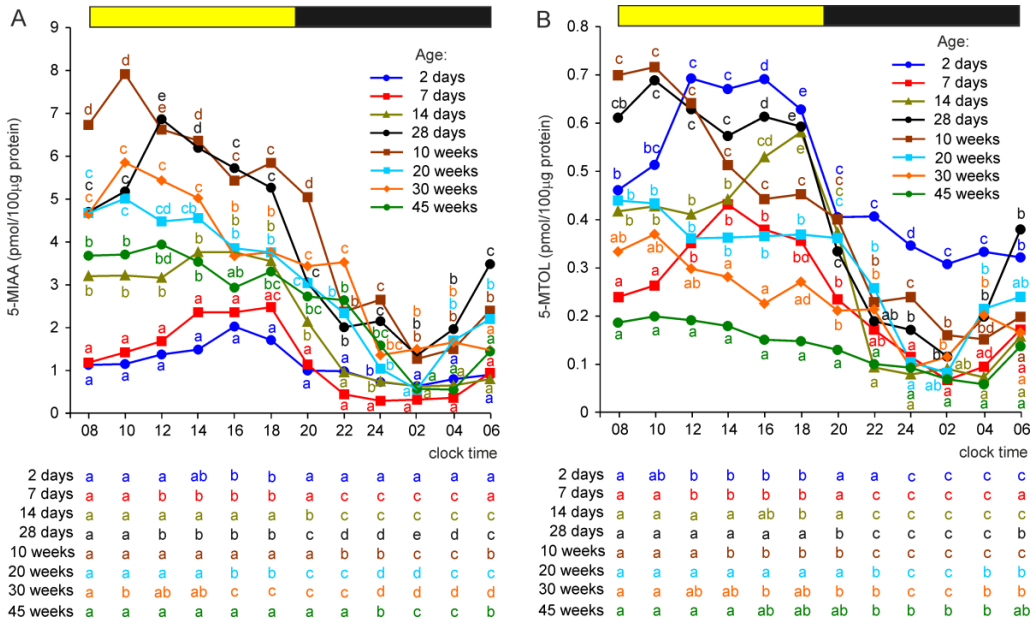


Figure 6. Concentrations (means) of 5-methoxyindole acetic acid, 5-MIAA (**A**), and 5-methoxytryptophol, 5-MTOL (**B**), in the pineal organs of turkeys at the ages of 2, 7, 14, 28 days and 10, 20, 30, 45 weeks. The horizontal bar represents the periods of light and dark phases of the daily cycle. The letters on the charts show differences between age groups at each time-point in Duncan's test. The letters below the charts show differences between time-points within a group in Duncan's test. The same letters indicate means which are not significantly different.

The concentration of 5-MTOL decreased during the initial days after hatching and was significantly lower in 7-day-old turkeys than in those at the age of 2 days at all time-points (Figure 6B). Subsequently, it increased and exhibited more prominent daily fluctuations. In turkeys at the ages of 14 and 28 days and 10 weeks, 5-MTOL concentrations reached the levels found in 2-day-old birds during the photophase; however, they were much lower than in 2-day-old turkeys during the scotophase. Compared with 10-week-old turkeys, the concentrations of 5-MTOL were significantly lower in birds at the ages of 20, 30, and 45 weeks during the entire photophase. Significant differences in the level of 5-MTOL were also noted between the birds aged 20 and 45 weeks during the photophase.

Daily fluctuations in 5-MTOL concentration, with higher levels during the photophase than in the scotophase, were noted in all investigated groups of turkeys (Figure 6B). The course of these fluctuations differed between the age groups. In 2-, 7-, and 14-day-old turkeys, 5-MTOL concentrations were higher in the second half than in the first half of the photophase, while in older animals the highest levels of 5-MTOL were noted shortly after the onset of the photophase. In all groups of turkeys, the level of this compound prominently declined after the onset of the scotophase.

2.2.8. 5-Methoxytryptamine (5-MTAM)

5-MTAM was undetectable in the pineal organs of 2-day-old turkeys. The level of 5-MTAM was greater than the quantification limit in birds aged 7 and 14 days, being higher in older animals, but did not show daily fluctuations (Figure 7). The nighttime increase in 5-MTAM concentration was noted for the first time in 28-day-old turkeys. The scotophase level of this amine was higher in turkeys at the age of 10 weeks than in birds aged 28 days. In turkeys aged 20, 30, and 45 weeks, the nocturnal peak levels of 5-MTAM were similar to those in 28-week-old birds but occurred later than in younger birds.

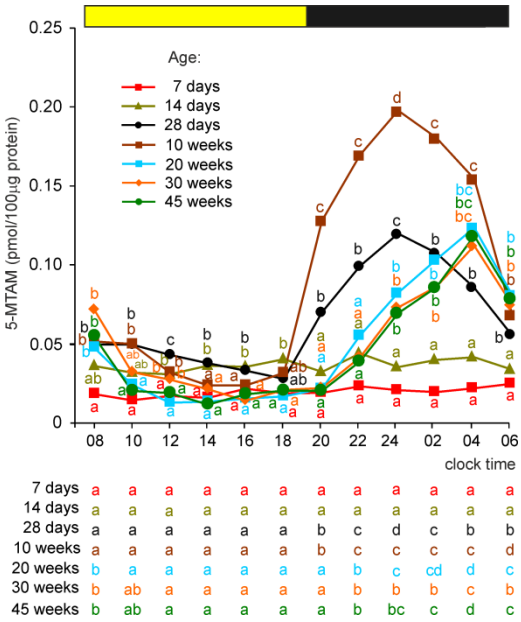


Figure 7. Concentration (means) of 5-methoxytryptamine, 5-MTAM, in the pineal organs of turkeys at the ages of 2, 7, 14, 28 days and 10, 20, 30, 45 weeks. The horizontal bar represents the periods of light and dark phases of the daily cycle. The letters on the charts show differences between age groups at each time-point in Duncan's test. The letters below the charts show differences between time-points within a group in Duncan's test. The same letters indicate means which are not significantly different. The concentration of 5-MTAM was undetectable in the pineal organs of turkeys aged 2 days.

3. Discussion

The present study reports for the first time that the metabolic profile of pineal indoles undergoes prominent changes during the post-embryonic development period of birds. Our experiment covered a period from hatching through sexual maturation (start of egg laying at the age of 24–25 weeks) to somatic maturity (age of 30 weeks) and also included 15 weeks of life thereafter. The phase of intensive growth (up to the age of 4 weeks) was analyzed in detail by collecting samples at the ages of 2, 7, 14, and 28 days.

Four stages could be distinguished in the course of post-embryonic changes in the metabolic profile of MLT synthesis-related indoles in the pineal organ of turkeys. The first stage covered the period from hatching to the age of 14 days and was characterized by large changes in the indole levels, including (i) a decrease in 5-HTRP concentration; (ii) an increase in 5-HT concentration; and (iii) an increase in the concentrations of MLT, 5-MIAA, and 5-MTAM. The decrease in the 5-HTPR level seems to be a result of its intensive utilization for 5-HT synthesis due to the increased activity of AADC. It occurs despite an approximately two-fold increase in nighttime activity of TPH between the ages of 2 and 14 days. The analysis of enzyme activity and indole content demonstrated that the increase in 5-HT concentration has two sources: (i) increased synthesis due to an elevation in the AADC activity and (ii) diminished degradation by oxidative deamination, as indicated by the decreased levels of 5-HIAA and 5-HTOL. The activity of monoamine oxidase (MAO) was not measured in our study; therefore, we cannot explain the mechanism responsible for the reduced degradation of 5-HT, and both the decreased activity of MAO and the development of 5-HT storage in a cell compartment unavailable for MAO should be considered. A study on the embryonic goose pineal organ showed that the unknown mechanism of 5-HT protection against degradation by MAO develops in embryonic life and is further improved in post-embryonic life [15]. The increase in 5-methoxyindole concentration is a result of a large, five-fold increase in the ASMT activity between the ages of 2 and 14 days. The apparent consequences of elevated ASMT activity are the decrease in NAS concentration and the increase in MLT concentration as well as the increase in 5-MIAA

concentration. In contrast to NAS and MLT, the concentration of 5-HIAA was 10-fold higher than 5-MIAA; therefore, methylation intensity has no effect on 5-HIAA levels. Surprisingly, the level of 5-MTOL decreased between the ages of 2 and 7 days and then increased. The decrease could be explained by a large drop in 5-HTOL concentration in this period and the very high affinity of 5-HTOL to ASMT. The synthesis of 5-MTAM (at detectable levels) started during the first stage of development, but it did show daily fluctuations.

The second stage of post-embryonic development of pineal indole metabolism was defined by the results obtained in turkeys at the age of 28 days. At this stage, the activity of AA-NAT and the concentrations of NAS and MLT reached their maximum values. The activity of AADC was more than 20-fold higher in 28-day-old birds than in 14-day-old ones and also reached the highest level in our study. The concentrations of 5-HT in turkeys aged 14 and 28 days were similar and the highest among the investigated groups of turkeys. The concentrations of 5-HIAA, 5-HTOL, 5-MIAA, and 5-MTOL were much higher in 28-day-old birds than in 14-day-old turkeys, pointing to more intensive synthesis and degradation of 5-HT in this stage than in the previous one. The concentration of 5-MTAM was markedly higher than in younger birds and showed prominent daily changes, with a peak at 24:00 h. The level of TRP was also the highest in birds aged 28 days.

The metabolic profile of pineal indoles in turkeys aged 10 weeks was proposed by us as the third stage of post-embryonic changes. It was characterized by almost 50% lower concentrations of 5-HT and 5-HIAA compared to those in 28-day-old birds. In contrast, the concentrations of 5-MIAA were similar, which suggests an increase in the methylation capacity. The levels of NAS and MLT also did not vary between turkeys aged 28 days and 10 weeks. The concentration of 5-MTAM reached its highest level in our experiment. Regarding enzymes, the activity of TPH was lower than in younger turkeys, while there were no differences in AADC and AA-NAT activities between stages two and three. The ASMT activity was the highest measured in the present study.

The fourth stage covered the period from the age of 20 to 45 weeks, in which the metabolic profile showed rather small changes. The most characteristic feature of this period was prominently reduced synthesis, content, and degradation of 5-HT compared to those in the previous stages. The activity of TPH and the concentration of 5-HTRP were the lowest in these birds. The activity of AADC was reduced by approximately 25% compared to that in 4-week-old turkeys, while 5-HT concentration was approximately five- to ten-fold lower in these birds. The concentrations of 5-HIAA and 5-HTOL were approximately two- to four-fold lower than those in 4-week-old turkeys. The decreases in the 5-MIAA and 5-MTOL levels were lesser than those of their substrates, probably because the activity of ASMT was reduced only by 20%. The reduction in 5-HT metabolism progressed slowly from 20 to 45 weeks of age. It should be noted that, despite the changes in 5-HT concentrations, there were no prominent differences in the activity of AA-NAT and the levels of NAS and MLT at the nocturnal peaks. The maximum concentration of 5-MTAM was lower than that in 4- and 10-week-old birds.

The structural changes in the pineal organ of turkeys occurring during the period of post-hatching development have been investigated by light and electron microscopy [21,22]. The results of these studies have enabled us to correlate changes in the profile of pineal indoles with those in the pineal histology and ultrastructure. The turkey pineal organ is characterized by a follicular organization of parenchyma throughout the entire period of post-hatching life; however, the developmental changes affect many aspects of pineal morphology [21,22,36,37]. From the perspective of the present study, the most important are age-dependent transformations in the follicular wall architecture. The inner part of the follicle wall, surrounding the follicular lumen, is formed by rudimentary photoreceptor pinealocytes and ependymal-like supporting cells. The outer part of the follicle wall is composed of secretory pinealocytes, astrocyte-like cells, and cell processes and their endings. Up to the age of 4 weeks, the outer part of the follicle is limited to very few cells located close to the basement membrane; therefore, the follicles are formed almost exclusively by rudimentary photoreceptor pinealocytes and ependymal-like supporting cells. The number

of cells in the outer part of the follicular wall is higher in 10-week-old turkeys but increased largely in 20-week-old birds. Next, the number of secretory pinealocytes and astrocyte-like cells continues to increase, causing a reversal in the proportion between the inner and outer parts of the follicle wall. Ultrastructural studies showed that rudimentary photoreceptor pinealocytes developed up to the age of 10 weeks and underwent regression after the age of 20 weeks [21,22]. The progressive processes in these cells were the most intensive during the first 4 weeks of post-embryonic life and included cell elongation, development of rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, increase in the number of mitochondria, and formation of a regular stratified distribution of organelles. The regression of rudimentary photoreceptor pinealocytes was visible as a shortage of cells and a decrease in the number of organelles.

The first stage of changes in indole metabolism distinguished in the present study, during which cells increase their capability of 5-HT and MLT synthesis, correlates with an early phase of post-embryonic development of rudimentary receptor pinealocytes, characterized mainly by an increase in the number of rough endoplasmic reticulum cisterns and mitochondria. The second and third stages of post-embryonic changes in indole metabolism coincide with the presence of highly developed rudimentary receptor pinealocytes with a stratified distribution of organelles, numerous cisterns of rough endoplasmic reticulum, well-developed Golgi apparatus surrounded by abundant clear and dense core vesicles, and numerous mitochondria in their upper parts. Based on the present results, it can be concluded that well-developed rudimentary receptor pinealocytes are characterized by very high synthesis and metabolism of 5-HT. The rudimentary receptor pinealocytes are slightly better developed during the third stage than during the second stage. Moreover, secretory pinealocytes are more abundant during the third stage than during the second stage. Therefore, lower 5-HT concentrations during the third stage could be attributed to the final maturation of rudimentary receptor pinealocytes or the presence of more secretory pinealocytes. The fourth stage of changes in indole metabolism correlates with a large increase in the number of secretory pinealocytes and regression of rudimentary receptor pinealocytes. It is reasonable to assume that the synthesis and degradation of 5-HT are reduced in secretory pinealocytes, while MLT synthesis is kept at a similar level to that in rudimentary receptor pinealocytes. The concentrations of 5-HT and 5-HIAA decrease between 20 and 45 weeks of age, and, at the same time, there is an increase in the number of secretory pinealocytes and the regression of rudimentary receptor pinealocytes.

Analyzing the results of morphological studies, it should be noted that, although the quantitative ratios of pinealocytes to supporting cells have not been established, double immunofluorescence staining for glial fibrillary acidic protein (supporting cells marker) and ASMT clearly shows that the proportion between these cell populations does not change noticeably from the age of 14 days to 56 weeks [22]. Supporting cells were negative for the immunochemical reactions of TPH and 5-HT. Attention should be paid to the intensive development of connective tissue around the follicles and in the pineal capsule after the age of 20 weeks [21]. Considering that the proportion of connective tissue to parenchyma increases during development, we expressed our data per soluble protein content in homogenate, not per tissue weight, because the collagen fibers were not dissolved during sonication. In this way, it was possible to reduce the effect of increased connective tissue content on the results.

From an endocrinological point of view, it would be interesting to know the changes in the total content of MLT in the pineal organ. The nocturnal peak value of MLT content increased with the age of animals up to the end of the experiment, most intensively between the ages of 2 and 10 weeks (Figure 8A). For comparison, the diurnal peak value of 5-HT content decreased markedly after the age of 10 weeks (Figure 8B).

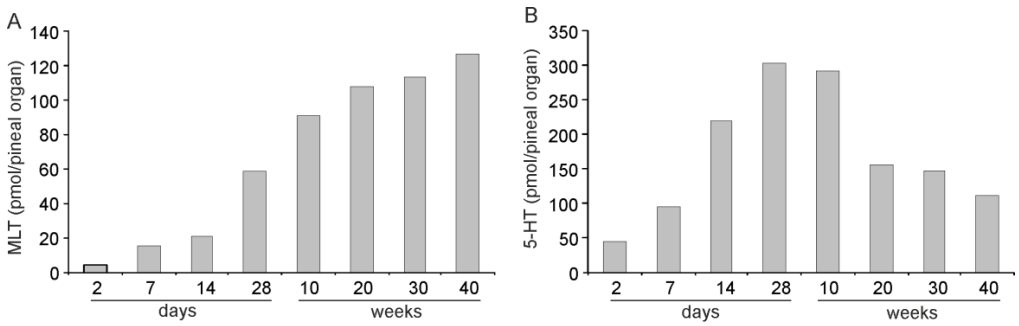


Figure 8. Contents (means) of melatonin, MLT (**A**), and serotonin, 5-HT (**B**), at their peak values in the pineal organs of turkeys at the ages of 2, 7, 14, 28 days and 10, 20, 30, 45 weeks.

The concentrations of all measured derivatives of TRP, except 5-MTMA, showed significantly daily fluctuations throughout the entire study period; however, the course of these fluctuations changed with the age of the turkeys. The data obtained from 2-day-old birds should be considered with a remark that newly hatched chicks were purchased from a commercial hatchery, where eggs were incubated without a strictly defined light/dark cycle. The use of laboratory-hatched chicks was not possible because of the large number of birds needed for the experiment. In all age groups, the daily fluctuations in indole concentrations were driven by alterations in TPH and AA-NAT activities. The course of daily changes in TPH activity changed prominently up to the age of 10 weeks and then stabilized. Generally, the morning decrease in TPH activity started later in young birds than in those aged 10 weeks and older. The nocturnal peaks of AA-NAT occurred with delay in turkeys aged 20, 30, and 45 weeks compared to that in the younger birds. There were also some differences in the shape of these peaks. The age-dependent changes in the daily profiles of 5-TPH, 5-HT, 5-HIAA, 5-HTOL, 5-MIAA, and 5-MTOL were highly variable because they were the results of alterations in the activity of both TPH and AA-NAT. In contrast, the changes in daily profiles of NAS and MLT followed the alteration in AA-NAT activity. The daily rhythm of 5-MTAM occurred from the age of 4 weeks. The mechanism of its generation is unknown. The nocturnal peak of 5-MTAM appeared 4 h later in turkeys aged 20, 30, and 45 days than in those aged 4 and 10 weeks.

The differences in the daily profiles of MLT synthesis enzymes and indoles between the turkeys at age 20–45 weeks and younger birds are most probably related to the increased number of secretory pinealocytes. It should be noted that pinopsin, a non-visual opsin, is present in the turkey pineal organ during the entire period of postnatal development, but its distribution shows prominent age-dependent changes, including a subsequent increase in pinopsin-positive processes in the outer part of the follicle wall and a reduction in the number and size of positive apical extensions [23]. These data suggest that secretory pinealocytes are photoreceptive. The studies performed in superfusion culture showed that the pineal organs of 45-week-old turkeys were less sensitive to light exposure at night than those of 10-week-old ones [23]. However, it should be underlined that the pineal organs of 45-week-old turkeys in vitro secrete melatonin in a well-entrained diurnal rhythm and adopt their secretory activity to a reversed light/dark cycle as fast as the pineal organs of 10-week-old turkeys and faster than the pineal organ of 15-week-old chickens [38], 12-week-old geese [39], and 9-month-old ducks [40]. The differences in daily profiles of indoles and enzymes involved in their synthesis between young and adult turkeys may also be related to the increased role of sympathetic regulation with the age of birds, as was suggested by the studies performed on domestic chickens [41]. Sympathetic innervation provides the signal from the suprachiasmatic nucleus that acts as a circadian oscillator controlled by the retina [42,43]. This signal can affect the rhythm generated by pinealocytes under the control of their light reception cascades.

4. Materials and Methods

4.1. Birds and Experimental Design

This study was performed on female domestic turkeys, Hybrid Converter strain (Hendrix Genetics, Boxmeer, The Netherlands), obtained from a commercial hatchery (Grelavi, SA, Olsztyn, Poland). One-day-old chicks were transported to the chronobiological animal laboratory at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland, where birds were reared for 45 weeks. The turkeys were kept under a 12 h light/dark cycle with a light intensity of 20 lx measured at the head level. The light was provided by tungsten lamps (3200 K), which were automatically switched on at 07:00 h and switched off at 19:00 h. The birds had free access to standard food and water. At the ages of 2, 7, 14, and 28 days, 5 turkeys were euthanized at 08:00, 12:00, 14:00, 16:00, 18:00, 20:00, 22:00, 24:00, 02:00, 04:00, and 06:00 h. At the ages of 10, 20, 30, and 45 weeks, 4 birds were sacrificed at the same time-points. The pineal organs were collected immediately and frozen at −75 °C. During the night, procedures were conducted in complete darkness using noctovision goggles. The experiment was performed as per Polish and EU law (Opinion of the Animal Welfare Board of the FVM, UWM in Olsztyn, 2 December 2019).

4.2. Assay of Enzyme Activity and Indole Content

4.2.1. Sample Preparation

Frozen pineal glands were weighed and sonicated (5 × 2 s, 1 W) in 200 µL of cold water using a Vibra-Cell VC 70 ultrasonic processor equipped with a 2 mm probe (Sonics and Materials Inc., Newtown, CT, USA) in an ice bath. Then, 80 µL of homogenate was added to an Eppendorf tube containing 20 µL of 1 mM perchloric acid, and the mixture was vortexed and incubated for 15 min in an ice bath. After centrifugation at 30,000× *g* (4 °C) for 15 min (Allegra 64R, Coulter Beckman, Brea, CA, USA), the supernatant was carefully transferred into autosampler vials and used in the assay of MLT synthesis-related indoles. From the remaining part of the homogenate, 20 µL aliquots were added to Eppendorf tubes containing substrates used in the assays of TPH, AADC, AA-NAT, and ASMT. The time between the tissue sonication and the beginning of incubation in the enzyme assays did not exceed 30 s.

4.2.2. Content of Melatonin Synthesis-Related Indoles

The indole content in the pineal organ homogenates was measured by HPLC with fluorescence detection [44] using a Vanquish Duo U/HPLC system equipped with two gradient pumps, a cooled dual split autosampler, column compartment, and two fluorescence detectors (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), as previously described [45].

4.2.3. Measurement of the Melatonin Synthesis Pathway Enzymes' Activities

TPH Activity

The activity of TPH was determined by measuring the accumulation of 5-HTP during incubation of the pineal homogenate with appropriate substrates and the AADC inhibitor [46] according to a previously described protocol [45].

AADC Activity

The activity of AADC was determined by measuring the decarboxylation of 5-HTP into 5-HT in the presence of a monoamine oxidase inhibitor [47] according to a previously described protocol [45].

AA-NAT Activity

The AA-NAT activity was determined by measuring the accumulation of N-acetyltryptamine [48] according to a previously described protocol [45].

ASMT Activity

ASMT activity was determined by measuring the accumulation of MLT [49] according to a previously described protocol [45].

4.3. Assay of Protein Content

The pineal homogenate was diluted in water and used to determine the protein content using the Quant-iT™ Protein Assay Kit.

4.4. Statistical Analysis

The data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) with age and sampling time as factors. Duncan's test was used as a post hoc test. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. The analyses were performed using Dell Statistica 13 (Version 13.1 PL, Dell Inc., Tulsa, OK, USA).

5. Conclusions

The concentration of MLT (expressed per unit of soluble protein content) at the nocturnal peak increased in the turkey pineal organ up to the age of 4 weeks and then remained at a rather constant level until the age of 45 weeks, when the study was finished. Because of pineal organ growth, the total content of MLT at the nocturnal peak increased with different intensities until the end of the experiment. However, the analysis of indoles other than MLT and enzymes involved in their synthesis revealed that, beyond this simple image of developmental changes, there are large transformations in the metabolism of pineal indoles.

Four stages could be distinguished in the course of the post-embryonic changes in the metabolic profile of MLT synthesis-related indoles. The first stage covers the period from hatching to the age of 2 weeks and is characterized by (i) the decrease in 5-HTRP concentration; (ii) the increase in 5-HT concentration; and (iii) the increase in the concentration of MLT, 5-MIAA, and 5-MTAM. During the second stage, around the age of 1 month, the activity of AA-NAT and the concentrations of NAS and MLT reach their maximal values. The synthesis and degradation of 5-HT at this stage are the highest among the investigated age groups of turkeys. The third stage, around the age of 10 weeks, is characterized by approximately 50% decreased concentrations of 5-HT and 5-HIAA. The levels of 5-MIAA are similar to those in the second stage, which is correlated with the highest activity of ASMT. The concentration of 5-MTAM also reaches the highest level. The last (fourth) stage covers a period from the age of 20 to 45 weeks and is characterized by extraordinarily decreased synthesis, content, and degradation of 5-HT. The changes in the metabolism of pineal indoles correlate with the development of rudimentary receptor pinealocytes (stages I and II) and secretory pinealocytes (stage IV). The obtained results have demonstrated that the concentrations of all measured derivatives of TRP show significant daily fluctuations up to the age of 45 weeks; however, the course of these fluctuations changed with the age of turkeys. The prominent shift in nocturnal peaks of AA-NAT, NAS, and MLT correlates with the predominance of secretory pinealocytes.

The obtained results show that the studies of indole metabolic profiles may provide many important data on developmental and aging processes occurring in the pineal gland, both in non-mammalian and mammalian species.

Author Contributions: Conceptualization, B.L. and K.M.; methodology, B.L.; validation, B.L.; investigation, K.M., M.H.-D. and B.L.; writing—original draft preparation, K.M.; writing—review and editing, B.L.; visualization, K.M. and B.L.; project administration, B.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The research and publication costs were supported by the Minister of Education and Science under the program entitled "Regional Initiative of Excellence" for the years 2019–2023, Project No. 010/RID/2018/19; the amount of funding was PLN 12.000.000.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Animal Welfare Board of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn (Opinion of 2 December 2019).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

5-HIAA	5-hydroxyindoleacetic acid
5-HT	serotonin
5-HTOL	5-hydroxytryptophol
5-HTRP	5-hydroxytryptophan
5-MIAA	5-methoxyindoleacetic acid
5-MTAM	5-methoxytryptamine
5-MTOL	5-methoxytryptophol
5-MTRP	5-methoxytryptophan
AADC	aromatic L-amino acid decarboxylase
AA-NAT	arylalkylamine N-acetyltransferase
ASMT	N-acetylserotonin O-methyltransferase
HPLC	high-pressure liquid chromatography
MLT	melatonin
NAS	N-acetylserotonin
TPH	tryptophan hydroxylase
TRP	tryptophan

References

1. Reiter, R.J. Intrinsic rhythms of the pineal gland and associated hormone cycles in body fluids. *Annu. Rev. Chronopharmacol.* **1988**, *4*, 77–105.
2. Attanasio, A.; Rager, K.; Gupta, D. Ontogeny of circadian rhythmicity of melatonin, serotonin, and N-acetylserotonin in humans. *J. Pineal Res.* **1986**, *3*, 251–256. [CrossRef] [PubMed]
3. Laakso, M.L.; Hätönen, A.A.T.; Mustanoja, S.M. Ontogeny of pineal melatonin rhythm in rats under 12:12 hr and 14:14 hr light: Dark conditions. *J. Pineal Res.* **1996**, *21*, 155–164. [CrossRef] [PubMed]
4. Sato, T.; Attanasio, A.; Wake, K.; Gupta, D. Rhythm development in pineal and circulating serotonin, N-acetylserotonine, and melatonin in Syrian Hamsters. *J. Pineal Res.* **1989**, *7*, 45–54. [CrossRef]
5. Waldhauser, F.; Kovács, C.S.; Reiter, E. Age-related changes in melatonin levels in humans and its potential consequences for sleep disorders. *Exp. Gerontol.* **1998**, *33*, 759–772. [CrossRef]
6. Zawilska, J.B.; Skene, D.J.; Arendt, J. Pchysiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol. Rep.* **2009**, *61*, 383–410. [CrossRef]
7. Tang, P.L.; Pang, S.F. The ontogeny of pineal and serum melatonin in male rats at mid-night and mid-dark. *J. Neural Transm.* **1988**, *72*, 43–53. [CrossRef]
8. Pang, S.F.; Tang, F.; Tang, P.L. Negative correlation of age and the levels of pineal melatonin, pineal N-acetylserotonin, and serum melatonin in male rats. *J. Exp. Zool.* **1984**, *229*, 41–47. [CrossRef]
9. Reiter, R.J.; Richardson, B.A.; Johnson, L.Y.; Ferguson, B.N.; Dinh, D.T. Pineal melatonin rhythm: Reduction in aging Syrian hamsters. *Science* **1980**, *210*, 1372–1373. [CrossRef]
10. Pang, S.F.; Tang, P.L. Decreased serum and pineal concentrations of melatonin and N-acetylserotonin in aged male hamsters. *Horm. Res.* **1983**, *17*, 228–234. [CrossRef]
11. Zeman, M.; Herichová, I. Circadian melatonin production develops faster in birds than in mammals. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2011**, *172*, 23–30. [CrossRef] [PubMed]
12. Herichová, I.; Zeman, M.; Macková, M.; Griac, P. Rhythms of the pineal N-acetyltransferase mRNA and melatonin concentrations during embryonic and post-embryonic development in chicken. *Neurosci. Lett.* **2001**, *298*, 123–126. [CrossRef]
13. Jin, E.; Jia, L.; Li, J.; Yang, G.; Wang, Z.; Cao, J.; Chen, Y. Effect of monochromatic light on melatonin secretion and arylalkylamine N-acetyltransferase mRNA expression in the retina and pineal gland of broilers. *Anat. Rec.* **2011**, *294*, 1233–1241. [CrossRef]
14. Guo, Q.; Dong, Y.; Cao, J.; Wang, Z.; Zhang, Z.; Chen, Y. Developmental changes of melatonin receptor expression in the spleen of the chicken, Gallus domesticus. *Acta Histochem.* **2015**, *117*, 559–565. [CrossRef]
15. Hanuszewska, M.; Prusik, M.; Lewczuk, B. Embryonic ontogeny of 5-hydroxyindoles and 5-methoxyindoles synthesis pathways in the goose pineal organ. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3948. [CrossRef] [PubMed]

16. Paredes, S.D.; Terrón, M.P.; Cubero, J.; Valero, V.; Barriga, C.; Reiter, R.J. Comparative study of the activity/rest rhythms in young and old ringdove (Streptopelia risoria): Correlation with serum levels of melatonin and serotonin. *Chronobiol. Int.* **2006**, *23*, 779–793. [CrossRef]
17. Zawilska, J.B.; Lorenc, A.; Berezińska, M.; Vivien-Roels, B.; Pévet, P.; Skene, D.J. Diurnal and circadian rhythms in melatonin synthesis in the turkey pineal gland and retina. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2006**, *145*, 162–168. [CrossRef] [PubMed]
18. Zawilska, J.B.; Lorenc, A.; Berezińska, M.; Vivien-Roels, B.; Pévet, P.; Skene, D.J. Daily oscillation in melatonin synthesis in the Turkey pineal gland and retina: Diurnal and circadian rhythms. *Chronobiol. Int.* **2006**, *23*, 341–350. [CrossRef]
19. Prusik, M.; Lewczuk, B. Diurnal rhythm of plasma melatonin concentration in the domestic turkey and its regulation by light and endogenous oscillators. *Animals* **2020**, *10*, 678. [CrossRef]
20. Prusik, M.; Lewczuk, B. Roles of direct photoreception and the internal circadian oscillator in the regulation of melatonin secretion in the pineal organ of the domestic turkey: A novel in vitro clock and calendar model. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4022. [CrossRef]
21. Przybylska-Gornowicz, B.; Lewczuk, B.; Prusik, M.; Nowicki, M. Post-hatching development of the turkey pineal organ: Histological and immunohistochemical studies. *Neuro Enocrinol. Lett.* **2005**, *26*, 383–392.
22. Petrusewicz-Kosińska, M.; Przybylska-Gornowicz, B.; Ziółkowska, N.; Martyniuk, K.; Lewczuk, B. Developmental morphology of the turkey pineal organ. Immunocytochemical and ultrastructural studies. *Micron* **2019**, *122*, 8–20. [CrossRef] [PubMed]
23. Petrusewicz-Kosińska, M.; Przybylska-Gornowicz, B.; Prusik, M.; Ziółkowska, N.; Lewczuk, B. Pinopsin and photoreception in the pineal organ of the domestic turkey during post hatching development. *Micron* **2019**, *126*, 102749. [CrossRef]
24. Magdelaine, P.; Spiess, M.P.; Valceschini, E. Poultry meat consumption trends in Europe. *World Poultry Sci. J.* **2008**, *64*, 53–64. [CrossRef]
25. Windhorst, H.-W. Changing regional patterns of turkey production and turkey meat trade. *World Poultry Sci. J.* **2006**, *62*, 97–114. [CrossRef]
26. Siopes, T.D.; Underwood, H.A. Pineal gland and ocular influences on turkey breeder hens. 1. Reproductive performance. *Poult. Sci.* **1987**, *66*, 521–527. [CrossRef]
27. Siopes, T.D. Pineal gland and ocular influences on turkey breeder hens. 2. Body weight, feed intake, and egg characteristics. *Poult. Sci.* **1987**, *66*, 528–534. [CrossRef]
28. Denbow, D.M.; Leighton, A.T.; Hulet, R.M. Effect of light sources and light intensity on growth, performance, and behaviour of female turkeys. *Br. Poult. Sci.* **1990**, *31*, 439–443. [CrossRef]
29. Classen, H.L.; Riddell, C.; Robinson, F.E.; Shand, P.J.; McCurdy, A.R. Effect of lighting treatment on the productivity, health, behaviour and sexual maturity of heavy male turkeys. *Br. Poult. Sci.* **1994**, *35*, 215–225. [CrossRef]
30. Clark, W.D.; Classen, H.L. The effects of continuously or diurnally fed melatonin on broiler performance and health. *Poult. Sci.* **1995**, *74*, 1900–1904. [CrossRef]
31. Rozenboim, I.; Biran, I.; Uni, Z.; Robinzon, B.; Halevy, O. The effect of monochromatic light on broiler growth and development. *Poult. Sci.* **1999**, *78*, 135–138. [CrossRef] [PubMed]
32. Rodenboog, H. Sodium, green, blue, cool or warm-white light? *World Poult.* **2001**, *17*, 22–23.
33. El Halawani, M.F. Light intensity requirement for breeder hen turkeys. *Gobbles* **2009**, *66*, 6–7.
34. Deep, A.; Schwean-Lardner, K.; Crowe, T.G.; Fancher, B.I.; Classen, H.L. Effect of light intensity on broiler production, processing characteristics and welfare. *Poult. Sci.* **2010**, *89*, 2326–2333. [CrossRef] [PubMed]
35. Siopes, T.D. Initiation of egg production by turkey breeder hens: Sexual maturation and age at lighting. *Poult. Sci.* **2010**, *89*, 1490–1496. [CrossRef] [PubMed]
36. Vollrath, L. The Pineal Organ. In *Handbuch Der Mikroskopischen Anatomie Des Menschen VI/7*; Springer: Berlin, Germany, 1981.
37. Menaker, M.; Oksche, A. The avian pineal organ. *Avian Biol.* **1974**, *4*, 79–118.
38. Csernus, V.; Becher, P.; Mess, B. Wavelength dependency of light-induced changes in rhythmic melatonin secretion from chicken pineal gland in vitro. *Neuro Endocrinol. Lett.* **1999**, *20*, 299–304.
39. Ziółkowska, N.; Lewczuk, B.; Prusik, M. Diurnal and circadian variations in indole contents in the goose pineal gland. *Chronobiol. Int.* **2018**, *25*, 1–16. [CrossRef]
40. Prusik, M.; Lewczuk, B.; Ziółkowska, N.; Przybylska-Gornowicz, B. Regulation of melatonin secretion in the pineal organ of the domestic duck—An in vitro study. *Pol. J. Vet. Sci.* **2015**, *18*, 635–644. [CrossRef]
41. Zawilska, J.B.; Berezińska, M.; Stasikowska, O.; Lorenc, A.; Skene, D.J.; Nowak, J.Z. Posthatching developmental changes in noradrenaline content in the chicken pineal gland. *J. Pineal. Res.* **2005**, *38*, 123–129. [CrossRef]
42. Cassone, V.M.; Forsyth, A.M.; Woodlee, G.L. Hypothalamic regulation of circadian noradrenergic input to the chick pineal gland. *J. Comp. Physiol. A* **1990**, *167*, 187–192. [CrossRef] [PubMed]
43. Prusik, M.; Lewczuk, B. Regulation of melatonin secretion in the avian pineal gland. *Med. Weter.* **2008**, *64*, 617–736. (In polish)
44. Lewczuk, B.; Ziółkowska, N.; Prusik, M.; Przybylska-Gornowicz, B. Diurnal profiles of melatonin synthesis-related indoles, catecholamines and their metabolites in the duck pineal organ. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 12604–12630. [CrossRef] [PubMed]
45. Martyniuk, K.; Hanuszewska, M.; Lewczuk, B. Metabolism of Melatonin Synthesis-Related Indoles in the Turkey Pineal Organ and Its Modification by Monochromatic Light. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9750. [CrossRef]
46. Barbosa, R.; Scialfa, J.H.; Terra, I.M.; Cipolla-Neto, J.; Simonneaux, V.; Afeche, S.C. Tryptophan hydroxylase is modulated by L-type calcium channels in the rat pineal gland. *Life Sci.* **2008**, *82*, 529–535. [CrossRef]

47. Rahman, M.K.; Nagatsu, T.; Nagatsu, I.; Iizuka, R.; Narabayashi, H. Aromatic L-Animo decarboxylase activity in brains from normal human subjects and from patients with extrapyramidal diseases. *Biomed. Res.* **1981**, *2*, 560–566. [CrossRef]
48. Bradford, K.T.; Zawilska, J.; Iuvone, P.M. Arylalkylamine (serotonin) N-acetyltransferase assay using high-performance liquid chromatography with fluorescence or electrochemical detection of N-acetyltryptamine. *Anal. Biochem.* **1990**, *184*, 228–234.
49. Itoh, M.T.; Hattori, A.; Sumi, Y. Hydroxyindole-O-methyltransferase activity assay using high-performance liquid chromatography with fluorometric detection: Determination of melatonin enzymatically formed from N-acetylserotonin and S-adenosyl-l-methionine. *J. Chromatogr.* **1997**, *692*, 217–221. [CrossRef]