Olsztyn, 05.11.2021 r.

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

Opinia o pracy doktorskiej lek. wet. Marii Hanuszewskiej-Dominiak pt. „Rozwój zarodkowy szlaku syntezy melatoniny w szyszynce gęsi"

Pracę doktorską lek. wet. Marii Hanuszewskiej-Dominiak stanowi cykl dwóch artykułów oryginalnych:

1. Hanuszewska M., Prusik M., Lewczuk, B. Embryonic Ontogeny of 5-Hydroxyindoles and 5-Methoxyindoles Synthesis Pathways in the Goose Pineal Organ. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, 20 (16), 3948
2. Hanuszewska-Dominiak M., Martyniuk K., Lewczuk B. Embryonic Development of Avian Pineal Secretory Activity – A Lesson from the Goose Pineal Organs in Superfusion Culture. *Molecules* 2021, 26 (21), 6329

opublikowanych w czasopismach o sumarycznym IF = 8,967 (w roku publikacji, aktualnie 10,334) i liczbie punktów MEiN wynoszącej 240.

Badania zostały wykonane w ramach projektu NCN PRELUDIUM 16 pt. „Rozwój szyszynki gęsi domowej w okresie zarodkowym – aspekty strukturalne i funkcjonalne" (UMO-2018/31/N/NZ4/01248), którego kierownikiem jest Doktorantka.

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

Aktualny stan wiedzy o aktywności wydzielniczej szyszynki ptaków w okresie rozwoju zarodkowego jest wynikiem badań wykonanych prawie wyłącznie na embrionach kury domowej. Istotne różnice międzygatunkowe w budowie i fizjologii szyszynki ptaków wskazują na potrzebę prowadzenia badań porównawczych, w tym dotyczących rozwoju zarodkowego gruczołu.

Celem badań było poznanie ontogenezy szlaku syntezy melatoniny (MLT) i powiązanych z nim szlaków przemian związków indolowych powstających w wyniku oksydatywnej deaminacji serotoniny (5-HT) oraz prześledzenie mechanizmów regulujących wydzielanie MLT w szyszynce gęsi domowej w okresie rozwoju zarodkowego.

Badania przeprowadzono w warunkach *in vivo* i *in vitro* na szyszynkach zarodków gęsi domowej pobranych pomiędzy 14 a 28 dniem inkubacji jaj. Pierwszy etap badań *in vivo* obejmował charakterystykę ontogenezy szlaków przemian 5-hydroksyindoli i 5-metoksyindoli poprzez pomiar ich zawartości w szyszynkach w różnych fazach cyklu dobowego. Oznaczenia związków indolowych wykonano metodą HPLC z rozdziałem w gradiencie stężeń oraz detekcją fluorescencyjną. Badania tego typu zostały po raz pierwszy przeprowadzone w szyszynce zarodków. Drugi etap badań *in vivo* miał na celu poznanie ontogenezy toru syntezy i metabolizmu katecholamin w szyszynce. Ich zawartość w homogenatach szyszynek oznaczono metodą HPLC z detekcją elektrochemiczną.

Doświadczenia *in vitro* wykonano w przepływowej hodowli narządowej w celu poznania mechanizmów regulujących aktywność wydzielniczą szyszynki gęsi w okresie embrionalnym. Poziom MLT we wszystkich zgromadzonych próbkach medium oznaczano metodą RIA. Aby dokładniej scharakteryzować zmiany w metabolizmie indoli związane z wiekiem zarodków i zachodzące w trakcie hodowli w wybranych próbkach medium oznaczono zawartość 5-hydroksyindoli i 5-metoksyindoli metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną. Badania uwalniania przez szyszynkę zarodków ptaków związków indolowych innych niż MLT mają charakter nowatorski.

W badaniach *in vivo* wykazano, że zarodkowa ontogeneza szlaków syntezy 5-hydroksyindoli i 5-metoksyindoli w szyszynce gęsi składa się z trzech faz. W pierwszej fazie szyszynka produkuje i metabolizuje 5-HT, ale brakuje jej zdolności do przeprowadzania acetylacji 5-HT i metylacji 5-hydroksyindoli. Proces acetylacji 5-HT rozpoczyna się w drugiej fazie, która ma swój początek w okolicach 16 dnia inkubacji jaj. Podczas trzeciej fazy, począwszy od 18 dnia inkubacji, dochodzi do wytwarzania 5-metoksyindoli, w tym MLT. Stwierdzono również, że szyszynka zarodków gęsi charakteryzuje się wysoką zawartością 5-HT w porównaniu do 16-dniowych kurcząt, jednak znacznie niższą niż w narządach 14-tygodniowej gęsi. Sugeruje to, że specyficzny dla gatunku typ metabolizmu indolu jest determinowany podczas życia embrionalnego i ostatecznie kształtuje się po wykluciu. Rytmiczność dobowa rozwija się bardzo wcześnie w szyszynkach embrionów gęsi, gdy jaja są inkubowane w 12-godzinnym cyklu świetlnym. Zawartość 5-hydroksytryptofanu (5-HTRP), 5-HT i kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA) w szyszynce wykazuje istotne wahania dobowe w zarodkach 14-dniowych i jest wyższa w nocy niż w dzień. Istotne dobowe wahania zawartości

N-acetyloserotoniny (NAS), MLT i kwasu 5-metoksyindolooctowego (5-MIAA) występują począwszy od 20 dnia rozwoju. Przebieg i amplitudy rytmów dobowych zmieniają się w trakcie rozwoju.

Analiza wyników uzyskanych w doświadczeniach *in vitro* wskazuje, że rytmiczne uwalnianie 5-HTRP z szyszynki zachodzi kilka dni przed wykształceniem się rytmu dobowego uwalniania NAS, MLT i 5-MIAA, co jest zgodne z wynikami badań *in vivo*. Wydzielanie MLT w hodowli wzrasta wraz z wiekiem zarodków, najintensywniej po 22 dniu życia, co skutkuje zmianami w proporcjach ilościowych pomiędzy indolami uwalnianymi do medium. Stwierdzono, że izolacja embrionalnych szyszynek z ich naturalnej niszy indukuje rozwój biosyntezy MLT i jej rytmiczności dobowej. Modyfikacje zachodzące w trakcie hodowli są podobne do zmian zależnych od wieku. Obserwacje takie poczyniono po raz pierwszy i są one bardzo istotne w kontekście analizy wyników uzyskanych w długoterminowych hodowlach komórek szyszynki ptasich zarodków, takich jak hodowle jednowarstwowe. W odniesieniu do mechanizmów regulacyjnych badania wykazały, że sekrecja MLT jest zależna od cyklu dobowego światło – ciemność we wszystkich badanych grupach wiekowych, aczkolwiek należy podkreślić, że 6-godzinna ekspozycja na światło w czasie fazy ciemnej doby nie wpływa na wydzielanie MLT. Aktywność endogennego oscylatora ujawnia się w regulacji sekrecji MLT w szyszynkach zarodków w wieku 24 dni i starszych, ale nie jest w stanie generować rytmu już po jednym cyklu. W niniejszych badaniach po raz pierwszy wykazano silne hamujące działanie noradrenaliny (NE) na wydzielanie MLT przez komórki szyszynki zarodków, zarówno podczas fazy jasnej, jak i fazy ciemnej. Stwierdzono, że poddanie eksplantów działaniu NE w trakcie kolejnych faz jasnych skutkuje występowaniem rytmu wydzielania MLT o dużej amplitudzie. Wzrost zawartości NE i jej metabolitu – kwasu wanililomandarynowy w ostatnich dniach życia zarodkowego sugeruje, że adrenergiczna regulacja aktywności szyszynki, może rozwijać się przed lub wkrótce po wykluciu. Uzyskane wyniki wskazują, że potrzebę weryfikacji dotychczasowych poglądów na temat ontogenezy szyszynki ptaków. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że po raz pierwszy w badaniach szyszynki ptaków stwierdzono, że NE indukuje bardzo duży wzrost uwalniania 5-HT.

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

prof. dr hab. Bogdan Lewczuk