UNIWERSYTET WARSZAWSKI

Wydział Biologii
Instytut Biologii Funkcjonalnej i Ekologii

WYDZIAŁ BIOLOGII · UNIWERSYTET WARSZAWSKI ·

dr hab. Paweł Majewski
Zakład Fizjologii Zwierząt,
ul. Miecznikowa 1, 02-093 Warszawa
tel. 22 5541030, pm.majewski@uw.edu.pl

Warszawa, 18 lutego 2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. wet. Marii Hanuszewskiej-Dominiak pt. „Rozwój zarodkowy szlaku syntezy melatoniny w szyszynce gęsi"

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

Cel pracy dotyczy poznania ontogenezy szlaku biosyntezy melatoniny i innych związków powstających z serotoniny takich jak 5-hydroksy- i 5-metoksyindole w szyszynce gęsi domowej oraz określenia mechanizmów regulujących wydzielanie melatoniny u tego gatunku. Badania przeprowadzono zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*. Badania *in vivo* dotyczyły określenia poziomu indoli oraz poziomu katecholamin i ich metabolitów, w kolejnych stadiach rozwoju postembrionalnego, zarówno w fazie jasnej i ciemnej doby. Część badań *in vitro* zaplanowano i przeprowadzono tak, aby określić mechanizmy regulacji aktywność wydzielniczej szyszynki przez światło i noradrenalinę, głównego neurotransmitera regulującego aktywność biosyntetyczną szyszynek zwierząt kręgowych. Z punktu widzenia chronobiologicznego wyjątkowo wartościowe są badania rytmiki poziomu indoli przeprowadzonych zarówno w układzie *in vivo* jaki i *in vitro*, w wielu punktach czasowych doby.

Obecny stan wiedzy dotyczący aktywności wydzielniczej szyszynki ptaków, jest wynikiem badań prowadzonych głównie w trakcie rozwoju embrionalnego i postembrionalnego kury domowej, gatunku będącego organizmem modelowym, na co zwraca uwagę w rozprawie Doktorantka. Elementy zegara biologicznego u różnych gatunków ptaków, takich jak szyszynka czy siatkówka oka, mają różny udział w biosyntezie melatoniny uwalnianej do krwioobiegu, a szyszynka, u tej gromady kręgowców, wykazuje różnice w budowie anatomicznej, histologicznej, dominacji produkcji poszczególnych związków indolowych, czy regulacji uwalniania melatoniny. Biorąc pod uwagę wymienione różnice oraz duży wkład badań prowadzonych na ptakach w wiedzę o funkcjonowania zegara biologicznego, istnieje potrzeba ich kontynuacji, między innymi podczas rozwoju embrionalnego przedstawicieli tej gromady kręgowców. Tematyka przedstawionej do oceny pracy doktorskiej doskonale wpisuje się we

wspomniany kierunek badań i skupia się na interesującym problemie naukowym, który został całościowo zbadany przez Doktorantkę. W kontekście badań obecnie prowadzonych przez inne zespoły badawcze, na innych gatunkach zwierząt, przedstawiona do recenzji praca, prezentuje naukowo bardzo aktualne zagadnienie i znacznie rozszerza wiedzę dotyczącą ontogenezy szlaków biosyntezy melatoniny i mechanizmów regulujących jej wydzielania u ptaków. Najważniejsze jednak jest to, że dzięki przeprowadzonym badaniom wzrosły możliwości interpretacji danych już istniejących.

Rozprawę doktorską przygotowano na podstawie dwóch spójnych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach z dziedziny nauk biologicznych: *International Journal of Molecular Science* oraz *Molecules*. Kopie tych artykułów zostały dodane do rozprawy. Należy podkreślić, że czasopisma te uważane są przez środowisko naukowe za bardzo dobre, a w punktacji Ministerstwa Edukacji i Nauki mają po 100 punktów. Sumaryczny, pięcioletni współczynnik ich przebicia (IF) wynosi prawie 10, co świadczy o wysokim poziomie opublikowanych badań. Z oświadczeń współautorów tych publikacji wynika, że Doktorantka w dużej mierze opracowała koncepcję opublikowanych badań, wykonała większość oznaczeń, analiz otrzymanych wyników oraz przygotowała publikacje, które były dyskutowane ze współautorami i podlegały korekcie ze strony Promotora Doktorantki. Świadczy to o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki.

Główna część rozprawy doktorskiej to omówienie publikacji. Poza nim przedstawiono streszczenie osiągnięcia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów oraz wspomniane oświadczenia współautorów artykułów. Omówienie publikacji jest dosyć obszerne i zawiera według ogólnie przyjętego układu: wstęp, przedstawienie głównego i szczegółowych celów badań, materiałów i metod, wyników, dyskusję, wnioski oraz piśmiennictwo. Należy zauważyć, że omówienie publikacji jest wyczerpujące, dokładne i bardzo dobrze napisane. Nie mam więc w stosunku do niego żadnych zastrzeżeń i nie znajduję poważniejszych niedoskonałości. W rozprawie, poza przedstawieniem źródła finansowania przeprowadzonych badań, nie przedstawiono informacji dotyczących pozostałych osiągnięć naukowych Doktorantki takich jak, udział w innych projektach naukowych, autorstwa innych publikacji, czy doniesień konferencyjnych. Liczę, że informacje te zostaną przedstawione w trakcie obrony pracy doktorskiej.

We wstępie omówienia publikacji Doktorantka wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z przeprowadzonymi badaniami, opisując między innymi: znaczenie szyszynki i jej hormonu melatoniny w funkcjonowaniu zegara biologicznego zwierząt kręgowych, lokalizację i budowę histologiczną szyszynki ptaków, funkcję melatoniny szyszynkowej jako zegara i kalendarza, synchronizowane przez melatoninę procesy fizjologiczne, szlak biosyntezy tego hormonu oraz 5-hydroksy- i 5 metoksyindoli. W ostatniej części wstępu Doktorantka uzasadnia podjęcie badań na szyszynkach gęsi, które są przekonujące.

Kolejną częścią omówienia publikacji, jest przedstawienie materiałów i metod pracy. Opis ten jest przejrzysty, wyczerpujący i zrozumiały. Zostały przybliżone zastosowane układy eksperymentalne, poczynając od warunków inkubacji jaj, przebiegu czterech głównych doświadczeń, ze zwróceniem szczegółowej uwagi na procedury analityczne, wykorzystane odczynniki i zastosowaną analizę statystyczną wyników. W podrozdziale tym znalazły się graficzne schematy doświadczeń i użytego do

oznaczeń zestawu sprzętowego, których nie ma w publikacjach wchodzących w skład rozprawy. Schematy te znacznie ułatwiają zrozumienie zastosowanych procedur badawczych. W podrozdziale tym omówiono dwa typy badań *in vivo* i *in vitro*, przedstawiając ich przebieg w sposób odmienny niż w opublikowanych artykułach, mianowicie łącząc omówienie wszystkich wyników *in vivo* prezentowanych w dwóch publikacjach i oddzielnie badań *in vitro*. Podejście to jest całkowicie uzasadnione i ułatwia analizę wszystkich wyników otrzymanych w obu układach eksperymentalnych. Należy stwierdzić, że analizy badanych związków wykonane metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną lub elektrochemiczną jak również radioizotopowe oznaczania poziomu melatoniny są najlepszymi obecnie stosowanymi metodami. O kunszcie metodycznym tych oznaczeń świadczy szeroka współpraca Katedry Histologii i Embriologii pod kierownictwem Pana prof. Bogdana Lewczuka z innymi ośrodkami naukowymi. Tak więc, poprawność i oryginalność metodyczną stawianego problemu badawczego oceniam wysoko, a układ doświadczalny, według mojej oceny, zagwarantował osiągnięcie zamierzonych celów badawczych.

Wyniki z przeprowadzonych badań omówiono zgodnie z kolejnością opisu doświadczeń przedstawionych w materiałach i metodach. W wyniku przeprowadzenia doświadczeń *in vivo* Doktorantka otrzymała wiele interesujących danych. Zaliczam do nich to, że zawartość tryptofanu w szyszynkach gęsi nie zmienia się znacząco podczas rozwoju embrionalnego jak i w ciągu doby, co potwierdza tezę, że jest to charakterystyczne dla ptaków. Otrzymane wyniki, ponadto ujawniły, że embrionalny rozwój aktywności biosyntetycznej szyszynki można podzielić na trzy fazy, związane ze stopniem rozwoju embrionu. Pierwszą, obserwowaną u zwierząt najmłodszych, podczas której szyszynka produkuje i metabolizuje serotoninę ale brakuje jej zdolności do przeprowadzania acetylacji serotoniny i metylacji 5-hydroksyindoli. Drugą, w której następuje rozpoczęcie procesu acetylacji serotoniny do N-acetyloserotoniny. Trzecią, w której następuje już wytwarzanie 5-metoksyindoli oraz melatoniny. Według mojej wiedzy jest to pierwsza tego typu obserwacja, która była możliwa do uchwycenia dzięki, kompleksowemu, wyjątkowo szczegółowemu podejściu do badanego zagadnienia, nie spotykanego w innych tego typu badaniach. To co jest równie cenne i nie było dotychczas prezentowane to obserwacja, że poziom w szyszynkach 5-hydroksy- i 5-metoksyindoli wzrasta wraz z rozwojem embrionów, a ich okołodobowa rytmiczna biosynteza rozwija się w nich bardzo wcześnie. Dopełniając obraz zaprezentowanych wyników, należy nadmienić, że wykazały one istotne dobowe wahania zawartości N-acetyloserotoniny, melatoniny i kwasu 5-metoksyindolo-octowego pojawiające się w późniejszym etapie rozwoju embrionalnego. Należy stwierdzić, że otrzymane wyniki wzmacniają twierdzenie, że u ptaków istnieje specyficzny gatunkowo typ metabolizmu indoli, który ostatecznie kształtuje się u nich w okresie postembrionalnym. Z kolei, wyniki analiz poziomu katecholamin i ich metabolitów, w fazie jasnej i ciemnej doby, wykazały wzrost ich poziomu w szyszynkach wraz z rozwojem embrionów, a co jeszcze bardziej interesujące, nie zaobserwowano jakichkolwiek różnic w stężeniu tych związków między fazą jasną i ciemną doby. Słusznym wnioskiem, wyciągniętym przez Doktorantkę z tych badań jest to, że adrenergiczna regulacja szyszynki rozwija się u tego gatunku w okresie postembrionalnym.

Badania *in vitro,* opisane w drugiej części omówienia publikacji, dotyczą wydzielania przez szyszynki do medium hodowlanego melatoniny, jej prekursorów oraz 5-hydroksy- i 5-metoksyindoli. Szyszynki w tej części badań wyizolowane zostały, podobnie jak w badaniach *in vivo*, w różnych stadiach rozwoju embrionalnego gęsi i hodowane były w różnych wariantach oświetlenia oraz w obecności noradrenaliny w medium hodowlanym. Należy zauważyć, że detekcję uwalnianych przez szyszynkę do medium produktów przemian tryptofanu, ze względu na częściowo niewykrywalny ich poziom, przeprowadzono na mniejszej ich liczbie niż w badaniach *in vivo*. Badania te jako pierwsze określają poziom 5-hydroksytryptaminy, serotoniny, N-acetyloserotoniny oraz kwasu 5-metoksyindolooctowego uwalnianych przez szyszynki ptaków w hodowli przepływowej. Jest to jeden z elementów związany z protokołem eksperymentalnym, wskazującym na oryginalność przeprowadzonych badań. Do pozostałych ważnych wyników tej części doświadczeń zaliczam potwierdzenie większości obserwacji z doświadczeń *in vivo* dotyczących występowania w rozwoju embrionalnym rytmiczności biosyntezy badanych indoli w szyszynce gęsi. Badania mechanizmów regulujących wydzielanie melatoniny wykazały między innymi, że rytmiczne wielodniowe jej uwalnianie obserwowane jest w warunkach standardowego oświetlenia. Poddanie szyszynek wielogodzinnej ekspozycji na światło podczas fazy ciemnej nie hamuje uwalniania przez nie melatoniny, podobnie jak ma to miejsce w części badaniach przeprowadzonych na innych gatunkach ptaków. Ponadto, stwierdzono, że podobnej wielodniowej rytmiki uwalniania tego hormonu nie wykazują szyszynki hodowane w stałej ciemności. Wskazuje to, jak zauważa słusznie doktorantka, na ograniczony wpływ zegara molekularnego na szlak biosyntezy melatoniny w okresie embrionalnym gęsi i dominację regulacji biosyntetycznej szyszynki przez światło. W przeprowadzonych badaniach po raz pierwszy wykazano również, że noradrenalina hamuje szyszynkową sekrecję melatoniny, zarówno w fazie jasnej jak i ciemnej oraz stymuluje uwalnianie serotoniny i ogólnie zaburza metabolizm indoli. Bardzo ciekawą wspomnianą już przeze mnie obserwacją jest to, że na aktywność biosyntetyczną szyszynek w ograniczony sposób ma wpływ zegara molekularny. Dyskutując to zagadnienie Doktorantka stwierdza, że w kontekście dostępnych danych literaturowych fotorecepcja szyszynki ptaków z rzędu blaszkodziobych zachodzi prawdopodobnie za pośrednictwem światłoczułego pigmentu melanopsyny, która jest funkcjonalnie związana z regulacją ekspresji genów. Nie do końca rozumiem to stwierdzenie, będące jak sądzę skrótem myślowy, ale według mnie, możliwa jest interpretacja, dotycząca wrażliwości szyszynek gęsi i kaczek na długotrwałą ekspozycję na światło w fazie ciemnej, przy założeniu, że ekspresja tego fotopigmentu ma okołodobowy rytm, ze wzrostem w ciągu fazie jasnej doby. Istnieje możliwość, że gen kodujący melanopsynę jest kodowany przez gen kontrolowany przez zegar molekularny, a potencjalny profil jego okołodobowej ekspresji powstaje na bardzo wczesnym etapie rozwoju embrionalnego ptaków. Tak, więc niezwykle interesującym byłoby przeprowadzenie kompleksowych badań porównawczych, dotyczących regulacji ekspresji tego genu, w tym udziału w niej elementów zegara molekularnego.

W każdej z części opisu jak i w publikacjach wchodzących w skład rozprawy, Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością literatury związanej z podejmowaną problematyką badawczą. Bardzo dojrzale dyskutuje otrzymane wyniki z dostępnymi danymi literaturowymi, a zastosowanie bogatego układu eksperymentalnego z wieloma zmiennymi, dostarcza dużą liczbę interesujących

wyników. Z tego względu, dość szeroko je przedstawiłem w mojej recenzji, aby podkreślić dużą wartość naukową przeprowadzonych badań.

Podsumowując, stwierdzam, że przeprowadzone przez Doktorantkę badania są badaniami podstawowymi i znacząco wzbogacają dziadzinę wiedzy jaką jest chronobiologia. Wyjątkowo wyczerpująco przedstawiają ontogenezę rozwoju aktywności biosyntetycznej szyszynki u kolejnego gatunku ptaków. Co wydaje mi się najważniejsze, wykazały, że rytmiczne zmiany w metabolizmie indoli w szyszynce rozwijają się podczas rozwoju embrionalnego gęsi, oraz potwierdziły występowanie znacznych różnic w proporcjach tych związków w szyszynkach różnych gatunków ptaków. Potwierdziły, że okołodobowe zmiany poziom melatoniny szyszakowej u ptaków, nie wynikają jedynie z aktywność acetylotransferazy serotoninowej, enzymu uznawanego za kluczowy w generowaniu okołodobowego rytmu biosyntezy tego hormonu. Wskazały duże znaczenie światła w regulacji aktywności biosyntetycznej embrionalnych szyszynek oraz to, że adrenergiczna regulacja ich aktywności u ptaków rozwija się pod koniec okresu embrionalnego. Oczywiście, wszystkie pozostałe obserwacje dotyczące mechanizmu biosyntezy melatoniny podczas rozwoju embrionalnego, rozszerzają znacznie wiedzę w tym zakresie i uzmysławiają konieczność dalszego prowadzenia tego typu badań.

Pragnę podkreślić, że lektura rozprawy była dla mnie bardzo interesująca, a w swojej recenzji nie wymieniłem wszystkich istotnych wyników i odkryć Doktorantki. W trakcie czytania nasunęło mi się kilka pytań, dlatego oczekuję, że w trakcie obrony Doktorantka na nie odpowie. Czy biosynteza 5-hydroksy- i 5 metoksyindoli w szyszynce ma jakieś znaczenie fizjologiczne? Czy zmiany w biosyntezie 5-hydroksy- i 5 metoksyindoli w szyszynce wpływają znacząco na poziom syntetyzowanej przez nią melatoniny? Czy na podstawie prezentowanych w rozprawie wyników badań wskazać enzymy uczestniczące w biosyntezie indoli, których ekspresja kontrolowana jest przez zegar molekularny?

Wniosek końcowy

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