UNIWERSYTET PRZYRODNICZY w Lublinie | WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

ZAKŁAD HISTOLOGII I EMBRIOLOGII
KATEDRA ANATOMII I HISTOLOGII ZWIERZĄT
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej
UNIWERSYTETU PRZYRODNICZEGO W LUBLINIE

Lublin, dnia 02.02.2022 r.

OCENA
Pracy doktorskiej lek. wet. Marii Hanuszewskiej-Dominiak wykonanej w Katedrze Histologii i Embriologii, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

Tytuł pracy: ***„Rozwój zarodkowy szlaku syntezy melatoniny w szyszynce gęsi"***

Promotor: *prof. dr hab. Bogdan Lewczuk*
Promotor pomocniczy: *dr n. wet. Magdalena Prusik*

Podstawa formalna

Zgodnie z Uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 19 listopada 2021 r. zostałam powołana na recenzenta w/w rozprawy doktorskiej.

Szyszynka jest bardzo ważnym gruczołem dokrewnym kręgowców, położonym w nadwzgórzu, wytwarza melatoninę (MLT) regulującą przede wszystkim rytm dobowy organizmu. Ten związek indolowy wpływa na cykliczność wielu fizjologicznych procesów w tym rozrodczość, aktywność lokomotoryczną, a także orientację przestrzenną podczas lotów ptaków. Obecnie wiadomo, że szyszynki ptaków domowych charakteryzują się istotnymi różnicami pod względem budowy anatomicznej i histologicznej, profili związków indolowych oraz mechanizmów regulujących wydzielanie MLT. Stąd istnieje zapotrzebowanie prowadzenia badań porównawczych, w tym dotyczących rozwoju zarodkowego gruczołu. Obecna wiedza na temat szyszynki ulega znacznemu wzbogaceniu i wiadomo, że jej histologiczna struktura w rozwoju powylęgowym ptaków podlega specyficznym, gatunkowym zmianom. Natomiast dane o rozwoju szyszynki ptaków w okresie zarodkowym są nieliczne i opierają się głównie na wynikach badań przeprowadzonych *in vitro* na embrionach kury domowej i przepiórki japońskiej. Dotychczas ustalono, że proces syntezy MLT w szyszynce ptaków rozpoczyna się już w życiu zarodkowym i zachodzi rytmicznie, gdy jaja inkubowane są w następujących po sobie dobowych fazach

światło/ciemność. Regulacja wydzielania MLT w szyszynce ptaków jest bardzo złożonym procesem. Gruczoł ten odbiera bezpośrednio bodźce świetlne, co powoduje zmniejszenie wydzielania MLT i przesunięcie fazy rytmu. Ponadto w szyszynce funkcjonuje endogenny generator rytmu. Jej aktywność kontrolowana jest także przez oscylator znajdujący się w jądrze nadskrzyżowaniowym podwzgórza, którego aktywność reguluje światło odbierane przez siatkówkę oka.

Dotychczasowe doświadczenia, prowadzone głównie w Katedrze Histologii i Embriologii UWM w Olsztynie, znacznie wzbogaciły światową wiedzę odnośnie jej budowy i funkcji w ontogenezie różnych gatunków ptaków. Uzyskane wyniki wskazują na gatunkową specyficzność metabolizmu związków indolowych w tym gruczole. Jednakże w dalszym ciągu nie wszystkie aspekty odnośnie przemian biochemicznych prowadzących do syntezy MLT i funkcji szyszynki są w pełni poznane. Dlatego wciąż powstają nowe opracowania na jej temat. Przykładem tego może być niniejsza praca doktorska przedstawiająca rozwój zarodkowy szlaku syntezy MLT w szyszynce gęsi. Dysertacja ta jest nowoczesną formą rozprawy doktorskiej i ma charakter poznawczy.

Ocena formalna

Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest cykl dwóch oryginalnych artykułów naukowych opublikowanych w prestiżowych czasopismach International Journal of Molecular Sciences i Molecules o łącznej punktacji ministerialnej **280** i współczynniku oddziaływania IF - **8,967**. Należy podkreślić, że te parametry bibliometryczne są bardzo wysokie i znacznie przekraczają wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim. Cykl publikacyjny, zaopatrzony jest w opracowanie zbiorcze wykonane w klasycznym ujęciu, przedstawiające kolejno streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wstęp, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski i piśmiennictwo. Doktorantka jest pierwszym autorem tych publikacji i jak wynika z dołączonych do opracowania oświadczeń współautorów Jej udział w ich powstaniu był znaczący, polegał na opracowaniu koncepcji i przeprowadzeniu badań, analizie wyników, sformułowaniu wniosków i przygotowaniu manuskryptów do druku. Należy podkreślić, że rozprawa doktorska ma charakter nowatorski. Praca powstała w ramach projektu PRELUDIUM 16 pt. „Rozwój szyszynki gęsi domowej w okresie zarodkowym – aspekty strukturalne i funkcjonalne" (nr umowy: UMO-2018/31/N/NZ4/01248) finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki oraz programu Ministerstwa Edukacji i Nauki pod nazwą „Regionalna Inicjatywa Doskonałości" w latach 2019-2022 (nr projektu 010/RID/2018/19).

Ocena merytoryczna

Wstęp wprowadza czytelnika w tematykę badawczą w oparciu o aktualny stan wiedzy na temat budowy szyszynki i postnatalnych zmian u różnych gatunków ptaków. Miąższ tego gruczołu stanowią właściwe komórek szyszynki - pinealocyty, glejowe komórki podporowe oraz mniej liczne neurony. Pinealocyty dzięki obecności barwników pinopsyny i melanopsyny są bezpośrednio wrażliwe na światło. Komórki

te aktywnie wychwytują z krwi tryptofan przekształcany w 5-hydroksytryptofan, ten w serotoninę (5-HT), z której wytwarzana jest MLT uwalniana bezpośrednio do krwi w rytmie dobowym charakteryzującym się wysokim poziomem sekrecji w nocy i niskim w dzień. Doktorantka zaznacza, że szyszynka ptaków, wykazuje różnice gatunkowe dotyczące profili zawartości związków indolowych, amplitudy i przebiegu rytmów dobowych poziomów tych związków oraz roli poszczególnych mechanizmów regulujących rytm sekrecji MLT. Obecnie wiadomo, że proces syntezy MLT rozpoczyna się w okresie embrionalnym i przebiega rytmicznie podczas inkubacji jaj w warunkach następujących po sobie dobowych faz światła i ciemności. Dotychczas badania prowadzone były prawie wyłącznie u kury najczęściej w warunkach *in vitro*. Szyszynka gęsi ze względu na szczególne cechy morfologiczne i biochemiczne, które Doktorantka podkreśla, jest odpowiednim modelem do badań stanowiących przedmiot niniejszej rozprawy.

Głównym celem pracy było poznanie ontogenezy szlaku syntezy MLT i powiązanych z nim szlaków przemian związków indolowych oraz scharakteryzowanie mechanizmów regulujących wydzielanie MLT w szyszynce gęsi domowej w okresie rozwoju zarodkowego. Szczegółowe cele badań obejmowały scharakteryzowanie w szyszynkach zarodków gęsi domowej: ontogenezy szlaków metabolicznych związanych z syntezą 5-HT i jej dalszymi przemianami w MLT oraz pochodne powstające w wyniku oksydacyjnej deaminacji, poprzez określenie ich zawartości, występowania rytmów dobowych zawartości związków indolowych związanych z syntezą MLT w warunkach cyklu świetlnego 12L:12D, mechanizmów regulujących wydzielanie MLT w hodowli narządowej przepływowej i zawartości katecholamin i ich metabolitów w okresie zarodkowym. Należy podkreślić, że jest to nowatorskie, wieloaspektowe ujęcie tematyki badawczej.

Każdy z podrozdziałów „Materiał i metody" zawiera szczegółowy opis przeprowadzenia badań wykonanych w warunkach *in vivo* i *in vitro* na szyszynkach zarodków gęsi domowej pobranych między 14 a 28 dniem inkubacji jaj w odstępach dwudniowych. Do badań *in vivo* pobierano gruczoły o różnych godzinach cyklu świetlnego 12L:12D. Z każdej grupy wiekowej uzyskano po 5 gruczołów do dwóch doświadczeń. W pierwszym etapie oznaczano zawartość 9 związków indolowych, związanych ze szlakiem syntezy MLT oraz dobowe wahania zawartości 5-hydroksyindoli i 5-metoksyindoli w szyszynkach z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z rozdziałem w gradiencie stężeń i detekcją fluorescencyjną. W drugim etapie badań oznaczano zawartość katecholamin i ich metabolitów w szyszynkach metodą HPLC z detekcją elektrochemiczną w celu poznania ontogenezy toru syntezy i metabolizmu katecholamin.

Eksperymenty *in vitro* wykonano w hodowli narządowej przepływowej w celu poznania mechanizmów regulujących aktywność wydzielniczą gruczołu. Szyszynki pochodziły od embrionów w wieku od 18 do 28 dni. Hodowle przeprowadzono w różnych warunkach oświetlenia, również z dodatkiem noradrenaliny do medium. Wyniki z doświadczeń skompletowano z 4 szyszynek z każdej badanej grupy. Poziom MLT we wszystkich zgromadzonych próbkach oznaczano metodą radioimmunologiczną. W wybranych próbkach medium określano zawartość 5-hydroksyindoli i 5-metoksyindoli metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną w celu scharakteryzowania zmian w metabolizmie indoli związanych z wiekiem zarodków

i zachodzących podczas w hodowli. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej wykorzystując odpowiednie testy. Uwzględniając powyższe informacje stwierdzam, że były to nowoczesne i dobrze dobrane metody pozwalające na realizację celów badań i jednocześnie gwarantujące wiarygodność uzyskanych wyników.

Należy podkreślić, że rozdział „Materiał i metody" wzbogacają, kolorowe ryciny doświadczeń prowadzonych *in vivo* i *in vitro* oraz przejrzysty schemat zestawu do przepływowej hodowli narządowej szyszynek ptaków.

Wyniki zostały bardzo szczegółowo opisane i przedstawione na 23 rycinach.

Badania *in vivo*, pozwoliły stwierdzić trzy fazy rozwoju szlaku syntezy MLT w zarodkowej szyszynce gęsi: W pierwszej szyszynka 14-dniowych zarodków produkuje i metabolizuje 5-HT, ale nie posiada mierzalnej zdolności do acetylacji tej aminy i metylacji 5-hydroksyindoli. W drugie fazie rozwoju około 16 dnia rozpoczyna się acetylacja 5-HT i zapoczątkowane jest wytwarzanie N-acetyloserotoniny. Od 18 dnia inkubacji jaj, podczas trzeciej fazy metabolizmu związków indolowych, dochodzi do zainicjowania metylacji 5-hydroksyindoli i po raz pierwszy w szyszynkach gęsi wykryto bardzo niskie poziomy 5-metoksyindoli tj. kwasu 5-metoksyindolooctowego i MLT. Poziomy 5-hydroksyindoli i 5-metoksyindoli znacząco wzrastają z wiekiem zarodków i są najwyższe w szyszynkach u 26 - 28-dniowych zarodków gęsi. U 14-dniowych zarodków w szyszynce stwierdzono rytmiczność dobową zawartości 5-hydroksytryptofanu, 5-HT i kwasu hydroksyindolooctowego. Od 20 dnia rozwoju wykazano istotne dobowe wahania zawartości N-acetyloserotoniny, MLT i kwasu 5- metoksyindolooctowego. Podczas rozwoju gruczołu przebieg i amplitudy rytmów dobowych ulegają zmianom. Doktorantka wykazała gatunkowo specyficzny profil metabolizmu związków indolowych, który jest determinowany w ontogenezie embrionalnej szyszynki gęsi. Dodatkowo stwierdziła zmiany zawartości katecholamin i ich metabolitów bez dobowych wahań w szyszynce zarodków gęsi. Zawartość noradrenaliny i jej głównego metabolitu kwasu wanililomandarynowego wzrasta w ostatnich dniach rozwoju bez dobowych wahań ich zwartości.

Wyniki uzyskane z doświadczeń *in vitro* w hodowli narządowej przepływowej ujawniły, że szyszynka 18-dniowych zarodków gęsi, wydziela mierzalne ilości MLT. Jej sekrecja zwiększa się stopniowo z wiekiem zarodków, a gwałtowny wzrost wydzielania MLT do medium odnotowano po 22 dniu rozwoju zarodkowego gęsi. Aktywność wydzielnicza szyszynek embrionów gęsi ulega wyraźnym zmianom w hodowli przepływowej prowadzonej w cyklu 12L:12D. W kolejnych dobach hodowli poziomy wydzielania hormonu znacznie wzrastały podczas fazy jasnej i ciemnej. Wzrost sekrecji MLT w czasie hodowli był większy w szyszynkach młodszych zarodków niż starszych. W pierwszym dniu hodowli w normalnym cyklu dobowym rytmiczność wydzielania hormonu wykazano w szyszynkach 24-dniowych zarodków. W drugim dniu hodowli nocne piki wydzielania MLT wystąpiły także w szyszynkach młodszych zarodków. Nocne wydzielanie tego hormonu i amplituda zmian dobowych były znacznie wyższe w szyszynce zarodków 22-dniowych w trzecim dniu hodowli niż u 24-dniowych zarodków w pierwszym dniu hodowli. Wyniki te wskazują, że izolacja zarodkowych szyszynek z ich naturalnego środowiska indukuje rozwój aktywności wydzielniczej, a więc rozwój szlaku syntezy MLT i jej rytmiczności dobowej, co po raz pierwszy opisała Doktorantka. Ponadto w doświadczeniach *in vitro* wykazano, że rytmiczne uwalnianie z szyszynki

18-dniowych zarodków gęsi 5-hydroksytryptofanu i kwasu 5-hydroksyindolooctowego zachodzi kilka dni przed wykształceniem się rytmu dobowego uwalniania N-acetyloserotoniny, MLT i kwasu 5-metoksyindolooctowego. Doktorantka stwierdziła również, że sekrecja MLT jest bezpośrednio kontrolowana przez cykl światło-ciemność oraz endogenny oscylator ujawniający się w szyszynce zarodków w wieku 24 dni i starszych. Jednakże ekspozycja na światło w czasie fazy ciemnej nie miała wpływu na wydzielanie MLT. Ponadto po raz pierwszy stwierdzono, że dodanie noradrenaliny do hodowli hamuje wydzielanie MLT przez szyszynki zarodków w obu fazach cyklu świetlnego. W czasie kolejnych faz jasnych poddanie eksplantów szyszynki działaniu tej katecholaminy w cyklu dobowym powoduje występowanie regularnego rytmu sekrecji MLT o dużej amplitudzie. Wyniki wykazały także, że noradrenalina indukuje wydzielanie 5-HT.

Autorka w umiejętny i przemyślany sposób dyskutuje swoje wyniki, przedstawia wszystkie aspekty związane z badanymi zagadnieniami w oparciu o odpowiednio dobrane piśmiennictwo liczące 93 pozycje. Doktorantka właściwie sformułowała 10 wniosków. Jako recenzent tej pracy doktorskiej nie mam żadnych uwag merytorycznych i językowych.

Podsumowując należy stwierdzić, że lek. wet. Maria Hanuszewska-Dominiak przygotowała rozprawę doktorską profesjonalnie, we właściwy sposób sformułowała problem naukowy i cele badań, właściwie dobrała techniki badawcze, osiągnęła założone cele, wykazała się znajomością literatury, umiejętnie przedyskutowała wyniki swoich badań oraz przygotowała tekst rozprawy.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedłożoną rozprawę doktorską oceniam wysoce pozytywnie, w pełni spełnia wszystkie wymagania określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z póź.zm.) W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z wnioskiem o dopuszczenie lek. wet. Marii Hanuszewskiej-Dominiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą ze względu na tematykę, stanowiącą ważną część światowych badań, nowatorstwo i wysoką wartość naukową.

KIEROWNIK ZAKŁADU
Histologii i Embriologii
Prof. dr hab. Jadwiga Jaworska-Adamu