STRESZCZENIE

Aktualny stan wiedzy na temat aktywności wydzielniczej szyszynki ptaków w okresie rozwoju zarodkowego jest wynikiem badań wykonanych głównie na embrionach kury domowej. Badania na innych gatunkach były prowadzone sporadycznie. Szyszynki ptaków domowych znacznie różnią się pod względem budowy anatomicznej i histologicznej, profili zawartości związków indolowych oraz mechanizmów regulujących sekrecję melatoniny (MLT). Istotne różnice międzygatunkowe wskazują na potrzebę prowadzenia badań porównawczych, w tym dotyczących rozwoju zarodkowego gruczołu.

Celem badań było poznanie ontogenezy szlaków syntezy 5-hydroksyindoli i 5-metoksyindoli oraz mechanizmów regulujących wydzielanie MLT w szyszynce gęsi domowej w okresie rozwoju zarodkowego.

Badania wykonano w warunkach *in vivo* i *in vitro* na szyszynkach zarodków gęsi domowej pobranych od 14 do 28 dnia inkubacji jaj. Pierwszy etap badań *in vivo* obejmował charakterystykę ontogenezy szlaków metabolicznych związanych z syntezą MLT oraz określenie występowania dobowych wahań zawartości 5-hydroksyindoli i 5-metoksyindoli w szyszynce. Oznaczenia związków indolowych wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z rozdziałem w gradiencie stężeń oraz detekcją fluorescencyjną. Drugi etap badań *in vivo* miał na celu poznanie ontogenezy toru syntezy i metabolizmu katecholamin w szyszynce. Zawartość tych związków w szyszynce 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. Hodowle przeprowadzono w różnych warunkach oświetlenia, również z dodatkiem noradrenaliny (NE) do medium. Poziom MLT we wszystkich zgromadzonych próbkach medium oznaczano metodą radioimmunologiczną. W celu dokładniejszego scharakteryzowania zmian w metabolizmie indoli związanych z wiekiem zarodków i zachodzących w trakcie hodowli w wybranych próbkach medium oznaczono zawartość 5-hydroksyindoli i 5-metoksyindoli metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną.

W badaniach przeprowadzonych *in vivo* wykazano, że zarodkowa ontogeneza szlaków syntezy 5-hydroksyindoli i 5-metoksyindoli w szyszynce gęsi obejmuje trzy fazy. W pierwszej fazie szyszynka produkuje i metabolizuje serotoninę (5-HT), ale brakuje jej zdolności do przeprowadzania acetylacji 5-HT i metylacji 5-hydroksyindoli. Proces acetylacji 5-HT rozpoczyna się w drugiej fazie, około 16 dnia inkubacji jaj. Podczas trzeciej fazy, począwszy od 18 dnia inkubacji, dochodzi do wytwarzania 5-metoksyindoli, w tym MLT. Poziomy 5-hydroksyindoli i 5-metoksyindoli wzrastają wraz z wiekiem zarodków i są najwyższe u zarodków w wieku 26 – 28 dni. Szyszynka zarodków gęsich charakteryzuje się wysoką zawartością 5-HT w porównaniu do 16-dniowych kurcząt; jednak poziom ten jest znacznie niższy niż w narządach 14-tygodniowych gęsi. Sugeruje to, że specyficzny dla gatunku typ metabolizmu indoli jest determinowany podczas rozwoju 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 i 5-HIAA z szyszynki zachodzi kilka dni przed wykształceniem się dobowego rytmu uwalniania NAS, MLT i 5-MIAA. Wydzielanie MLT w hodowli wzrasta wraz z wiekiem zarodków, najintensywniej po 22 dniu rozwoju, co skutkuje zmianami w proporcjach ilościowych pomiędzy indolami uwalnianymi do medium, zachodzącymi wraz z wiekiem zarodków. Rytmiczne wydzielanie MLT w warunkach *in vitro* było obserwowane po raz pierwszy w rozwoju w szyszynkach 24-dniowych zarodków. Ponadto 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. Jest to ważne 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, aczkolwiek należy podkreślić, że 6-godzinna ekspozycja na światło podczas 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 NE na wydzielanie MLT przez komórki szyszynki zarodków, zarówno podczas fazy jasnej, jak i fazy ciemnej. Stwierdzono, że poddanie eksplantów działaniu NE w czasie kolejnych faz jasnych skutkuje występowaniem regularnego rytmu wydzielania MLT o dużej amplitudzie. Po raz pierwszy w badaniach szyszynki ptaków stwierdzono, że NE indukuje bardzo duży wzrost uwalniania 5-HT z tego gruczołu. Wzrost zawartości NE i jej metabolitu – kwasu wanililomandarynowego w ostatnich dniach okresu zarodkowego sugeruje, że adrenergiczna regulacja aktywności szyszynki może rozwijać się pod koniec okresu zarodkowego lub wkrótce po wykluciu.