

Życie wszystkich organizmów na Ziemi, jedno- i wielokomórkowych, roślin i zwierząt, jest ściśle związane z ruchem obrotowym oraz obiegiem planety i następującymi po sobie fazami dnia i nocy oraz zmianami pór roku. Konieczność przygotowania do cyklicznie powtarzających się zmian warunków zewnętrznych (np. nadejścia nocy, zimy) sprawiła, że organizmy wytworzyły wewnętrzne zegary biologiczne, wpływające na bardzo wiele, jeśli nie na wszystkie procesy fizjologiczne i patologiczne. Coraz liczniejsze dowody uzyskane w badaniach na ptakach i ssakach wskazują, że życie wbrew wewnętrznemu zegarowi wiąże się z rozwojem wielu groźnych chorób, pomimo iż oddziaływanie zegara na funkcjonowanie organizmu wydaje się być bardzo subtelne, a początkowe objawy związane z zaburzeniem rytmów przez czynniki zewnętrzne lub wewnętrzne - łagodne. Rolę rytmów biologicznych i znaczenie badań nad nimi podkreśla przyznanie Nagrody Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii w 2017 roku za wyjaśnienie podstaw funkcjonowania zegara biologicznego. Nagrodę tę otrzymali odkrywcy genów zegarowych u muszki owocowej: Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash i Michael W. Young.

Kluczową rolę w funkcjonowaniu zegara biologicznego u kręgowców odgrywa szyszynka, która wytwarza i uwalnia melatoninę (związek indolowy) w rytmie dobowym. Poziom wydzielania melatoniny jest wysoki w nocy i niski w ciągu dnia. Szyszynka u ryb i płazów jest narządem fotoreceptorowym wyposażonym w autonomiczny oscylator dobowy, generujący rytm wydzielania melatoniny, zaś u ssaków gruczoł ten wytwarza hormon w rytm impulsów płynących z jądra nadskrzyżowaniowego. Szyszynka ptaków łączy w sobie cechy tego narządu u niższych kręgowców, bowiem posiada zdolność odbioru bodźców świetlnych i endogenny generator rytmu oraz u ssaków, gdyż jej aktywność jest kontrolowana również przez jądro nadskrzyżowaniowe. Te cechy sprawiają, że szyszynka ptaków jest doskonałym modelem do badań nad zegarem biologicznym. Należy również podkreślić, iż wiele prac dowodzi bardzo istotnej roli szyszynki i jej głównego hormonu – melatoniny w fizjologii i patologii ptaków. Wyniki najnowszych badań przeprowadzonych na zarodkach kury wskazały na istotną rolę melatoniny w procesach wczesnej organogenezy – w formowaniu się oka oraz serca.

Aktualny stan wiedzy na temat rozwoju zarodkowego szyszynki ptaków jest głównie wynikiem badań wykonanych na embrionach kury domowej i – w znacznie mniejszym stopniu – przepiórki japońskiej. Badania na innych gatunkach były prowadzone jedynie sporadycznie. Szyszynki ptaków domowych różnią się znacznie pod względem budowy histologicznej i ultrastrukturalnej, profili zawartości związków indolowych (związanymi z syntezą melatoniny) oraz rolą poszczególnych mechanizmów w regulacji rytmu sekrecji melatoniny. Istotne różnice międzygatunkowe wskazują na potrzebę prowadzenia badań porównawczych, w tym dotyczących rozwoju embrionalnego gruczołu.

Generalnym celem projektu jest poznanie rozwoju zarodkowego szyszynki u gęsi domowej. Planowane badania mają charakter kompleksowy i obejmują zarówno aspekty morfologiczne, jak również biochemiczne oraz funkcjonalne organogenezy. Oprócz okresu zarodkowego, badania będą dotyczyć także pierwszych dwóch tygodni po wykluciu, co pozwoli na porównanie budowy i fizjologii szyszynki w okresie embrionalnym i we wczesnej fazie rozwoju powylęgowego.

Zmiany morfologiczne szyszynki na poziomie narządu i tkanek będą badane za pomocą mikroskopii świetlnej, natomiast na poziomie komórkowym i subkomórkowym przy użyciu mikroskopii elektronowej. Zastosowana zostanie również metoda rekonstrukcji trójwymiarowej. Badania nad rozwojem szlaków metabolicznych będą przeprowadzone poprzez określenie zawartości 11 związków indolowych związanych z syntezą melatoniny (łącznie z tym hormonem) w szyszynkach zarodków i wyklutych piskląt, jak również poprzez oznaczenie poziomu noradrenaliny, jej prekursorów i metabolitów. Analizy te zostaną wykonywane z użyciem nowoczesnych i bardzo czułych metod laboratoryjnych. Badania nad regulacją wydzielania melatoniny będą prowadzone *in vitro*, przy pomocy specjalnego systemu, w którym wyizolowane szyszynki przeżywają ponad 10 dni. Dzięki tej hodowli możliwe będzie określenie momentu, kiedy szyszynka zaczyna odbierać bodźce świetlne i kiedy zaczyna generować swój rytm dobowej aktywności.

Ogromna część badań, planowanych w niniejszym projekcie, dotyczy aspektów rozwoju szyszynki, które nie były wcześniej badane u ptaków (a nawet u kręgowców) lub których wyniki nie zostały opublikowane w dostępnych źródłach. Wyniki uzyskane w ramach projektu będą jednymi z pierwszych dotyczących ontogenezy szlaków metabolicznych indoli związanych z syntezą melatoniny kręgowców. Po raz pierwszy zostaną oznaczone zawartości katecholamin, wraz z ich prekursorami i metabolitami w szyszynce ptasich zarodków. Uzyskane wyniki powinny pomóc zweryfikować słuszność stwierdzenia, które często jest powtarzane w literaturze, że szyszynki zarodków ptaków (w odróżnieniu od ssaków), wykazują znaczną aktywność sekrecyjną. Stwierdzenie to nie jest wystarczająco poparte literaturą, a istniejące dane wskazujące na niską aktywność wydzielniczą szyszynki w życiu embrionalnym i jej wyraźny wzrost po wykluciu, sugerują konieczność weryfikacji tego poglądu. Wyniki uzyskane w badaniach morfologicznych oraz badaniach *in vitro* będą stanowić ważny materiał do analiz porównawczych.