

## STRESZCZENIE

---

Szyszynka ptaków, wraz z siatkówką i jądrami nadskrzyżowaniowymi podwzgórza, tworzy system zegara biologicznego, generujący rytmy wielu procesów fizjologicznych i synchronizujący je z zewnętrznymi warunkami oświetlenia. Sygnał wyjściowy z zegara szyszynkowego stanowi rytmiczna (z nocnym szczytem) synteza melatoniny (MEL), która m.in. moduluje rozwój i aktywność układu odpornościowego. Aby wyjaśnić rolę MEL w uprzednio opisanym sezonowości rozwoju zapalenia otrzewnej u kury domowej, wprowadzono nowy protokół eksperymentalny, w którym pisklęta hodowane były od dnia wylęgu w warunkach naturalnego fotoperiodu (LD 16: 8 w lecie i 8:16 w zimie) lub w ciągłym oświetleniu (LL), wywołującym funkcjonalną pinealektomię. Dodatkowo, połowa zwierząt z grupy LL otrzymywała egzogenną MEL w wodzie pitnej (LL MEL) przez okres subiektywnej nocy, co miało naśladować jej naturalną dostępność w odpowiednich warunkach LD w celu sprawdzenia, czy będzie odwracać efekty działania LL. W doświadczeniach wstępnych wykazano, że rytm dobowy transkrypcji wybranych genów zegara szyszynkowego (*Cry1*, *Bmal1*, *Per3* i *E4bp4*) w obu sezonach utrzymywał się w warunkach LD, ale nie w LL. Efekt ten przypuszczalnie nie był związany z dostępnością MEL, gdyż jej suplementacja w grupie LL przywróciła rytmiczną transkrypcję jedynie genu *Per3*. MEL syntetyzowana w szyszynce wydaje się wpływać na zegar biologiczny funkcjonujący w tym narządzie przez mechanizm autokryny, między innymi poprzez receptory Mel1c [Rozdział 3.1].

W kolejnych eksperymentach poddano weryfikacji hipotezę, że sezonowość zapalenia jest związana z czasem obecności MEL w krwiobiegu i jej zdolnością do hamowania migracji komórek odpornościowych. Do wszystkich grup opisanego protokołu eksperymentalnego wprowadzono dodatkowo ptaki, które otrzymały dootrzewnowy zastrzyk tioglikolatu (TG), celem wywołania stanu zapalnego. Zapalenie otrzewnej wywołano na początku lub pod koniec fazy jasnej, a efekty oceniono 4 godziny później, w trakcie dnia lub w nocy (subiektywnych). Wskaźnikami rozwoju zapalenia był napływ leukocytów do jamy otrzewnej (nie występujących tam u ptaków kontrolnych), transkrypcja genów kodujących wybrane cytokiny w różnych grupach leukocytów, a w kolejnych doświadczeniach również poziom lizozymu, będącego u ptaków białkiem ostrej fazy. Uzyskane wyniki potwierdziły u młodych samców kury domowej sezonowość

przebiegu zapalenia otrzewnej, które rozwijało się intensywniej latem niż zimą, było bardziej nasilone w ciągu dnia niż w nocy, a obserwowane zmiany nie wydają się zależeć wyłącznie od MEL. Wywołane zapalenie otrzewnej nie zmieniło transkrypcji genów cytokin *IL-6* i *IL-18* w leukocytach krwi obwodowej w przeciwieństwie do splenocytów, w których nastąpił wzrost ilości mRNA badanych cytokin, modulowany warunkami świetlnymi i egzogenną MEL. Wykazano także dobowe różnice w transkrypcji genów tych cytokin w obu wspomnianych grupach leukocytów kurcząt, wskazujące, że w warunkach zapalnych gen *IL-6* ulegał transkrypcji głównie w ciągu dnia, zaś *IL-18* w nocy. Wyniki te sugerują zaangażowanie zegara biologicznego w kontrolę dobowego rytmu leukocytów i cytokin u badanych ptaków [Rozdziały 3.2 i 3.3]. Ponadto, cytokiny uwalniane podczas stanu zapalnego wpływały na transkrypcję genów zegarowych w szyszynce kurcząt, a efekt (stymulujący lub hamujący) zależał od sezonu wylęgu. Transkrypcja genu *Per3* w szyszynce może być jednym z "punktów kontaktowych" między zegarem molekularnym, MEL i zapaleniem [Rozdział 3.3].

Wyniki uzyskane w poprzednich doświadczeniach pozwoliły odrzucić hipotezę o głównej roli MEL w sezonowości zapalenia otrzewnej u kurcząt, sugerując jednak udział zegara biologicznego w tym zjawisku. Kolejny etap badań opierał się zatem na nowym założeniu, że sezonowa i dobowy modulacja odporności kurcząt może być związana z obwodowym zegarem biologicznym zlokalizowanym w narządach odpornościowych. Zastosowano nowy model doświadczalny, którego celem było zbadanie rytmicznej transkrypcji genów zegarowych *Per3* i *E4bp4* w grasicy, u kurcząt kontrolnych i objętych stanem zapalnym (nastrzykniętych TG). Uprzednio opisana sezonowość odpowiedzi zapalnej została potwierdzona po raz kolejny. Dobowy rytm transkrypcji genu *E4bp4*, regulatorowego elementu w systemie zegara, zwiększał się u kurcząt z wywołanym stanem zapalnym, podczas gdy transkrypcja genu *Per3*, negatywnego elementu w tym systemie, okazała się niezależna od zapalenia. Wyniki te wskazują, że zapalenie otrzewnej nie wpływa na transkrypcję co najmniej jednego genu zegara w grasicy, a obserwowany wzrost poziomu mRNA genu *E4bp4* jest prawdopodobnie związany z jego funkcją odpornościową [Rozdział 3.4].

Podsumowując, dobowe i sezonowe różnice w profilu badanych parametrów odpornościowych nie wydają się być zależne całkowicie od MEL, ale mogą być związane

także z funkcjonowaniem oscylatorów molekularnych w tkankach obwodowych, które odbierają informacje o procesach zapalnych za pośrednictwem krążących leukocytów i cytokin.