

**A circadian melatonin szekréció kialakulásának és
fényérzékenységének vizsgálata csirke tobozmirigy
modellen**

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Faluhelyi Nándor

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai Intézet
Pécs, 2009

Programvezető és témavezető: Dr. Csernus Valér, egyetemi tanár

Doktori Iskola vezetője: Dr. Lénárd László, egyetemi tanár

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
Ábrajegyzék	4
1. Bevezetés	5
1.1 A biológiai ritmus	5
1.2 A circadian ritmus és jelentősége.....	6
1.3 A tobozmirigy és a melatonin	9
1.4 A csirke tobozmirigy fényérzékenysége.....	16
1.5 A circadian melatonin szekréció fejlődése.....	18
1.6 Neuropeptidek embrionális tobozmirigyre gyakorolt hatásainak vizsgálata	19
Célkitűzések	22
2. Anyagok és módszerek	23
2.1 Anyagok és eszközök.....	23
2.2 A kísérleti állatok	23
2.3 <i>In ovo</i> kezelések	23
2.4 A perifúziós rendszer	24
2.5 A perifúziós kísérletek	25
2.6 A frakciók hormontartalmának meghatározása	26
2.7 Az eredmények értékelése	27
3. Eredmények	29
3.1. A felnőtt csirke tobozmirigy <i>in vitro</i> fényérzékenységének vizsgálata	29
3.2. A csirke embrionális tobozmirigy <i>in vitro</i> melatonin szekréciójának vizsgálata	31
<i>Periodikus ingerektől mentes („Random”) keltetés esetén</i>	31
<i>Keltetés napi kétszeri, ritmikusan ismétlődő tojásforgatás mellet</i>	32
<i>Az in vitro megvilágítás hatásai periodikus ingerektől mentes keltetést követően</i>	34
<i>Az in vitro megvilágítás hatásai periodikus megvilágításban keltetett embriókon</i>	36

3.3. Neuropeptidek (PACAP, VIP) csirke embrionális tobozmirigy melatonin szekréciójára gyakorolt hatásának vizsgálata	37
<i>PACAP in vitro hatásai (ritmikusan ismétlődő tojásforgatással történő keltetést követően)</i>	37
<i>In ovo PACAP6-38 kezelések hatásának vizsgálata („random” körülmények közötti keltetés alatt)</i>	38
<i>In vitro VIP beadás hatásai („random” környezetben történő keltetést követően)</i>	39
4. Az eredmények megbeszélése.....	41
4.1 A tobozmirigy fényérzékenysége vizsgálatáról	41
4.2 Az embrionális melatonin szekréció változásairól.....	42
4.3 A PACAP és a VIP embrionális melatonin szekrécióra gyakorolt hatásairól	46
4.4 Eredményeink összefoglalása	48
5. Publikációs lista.....	49
6. Irodalom.....	52

Rövidítések jegyzéke

AANAT	arilalkylamin-N-acetiltranszferáz
CP	corpus pineale (csak ábrán)
EEG	electroencephalogram
EKG	electrocardiography (magyarosítva: elektrokardiográfia)
EX	az embrionális élet <i>X.</i> napja
Ggl.	ganglion
HIOMT	hydroxyindol-Orto-metiltranszferáz
LHRH	luteinizing hormon releasing hormon
MT	melatonin
Nucl.	nucleus (csak ábrán)
PACAP	pituitary adenylate cyclase activating polypeptid
PACAP6-38	PACAP módosulat, antagonistá hatással
POPOP	1,4-Bis (5-phenyl-2-oxazolyl) benzén
PPO	2,5-Diphenyloxazol
PVN	nucleus paraventricularis
RIA	radioimmunoassay
SCN	nucleus suprachiasmaticus
Sup.	superior (csak ábrán)
tsai	(szerző) társai
VIP	vasoactive intestinal polypeptid
VPAC	a VIP és PACAP molekulák közös, sejtfelszíni receptora

Ábrajegyzék

1.2.a a melatonin bioszintézise	10
1.2.b az emlős tobozmirigy beidegzése	13
1.2.c a madár tobozmirigy beidegzése	15
2.4.a a perifúziós rendszer sémás rajza.....	24
2.4.b a perifúziós rendszer fotója.....	25

csirke tobozmirigy *in vitro* melatonin szekrécióját bemutató ábrák:

3.1.a felnőtt, állandó sötétben	29
3.1.b felnőtt, fordított megvilágításban (600 lux).....	30
3.1.c felnőtt, fordított megvilágításban (10 lux)	30
3.1.d felnőtt, napi 3 óra megvilágításban (10 lux)	31
3.2.a E15, állandó sötétben, „random” keltetést követően	32
3.2.b E13, állandó sötétben, ritmikus tojásforgatás után	33
3.2.c E18, állandó sötétben, ritmikus tojásforgatás után.....	33
3.2.d E13, fordított megvilágításban (600 lux), „random” keltetést követően	34
3.2.e E17, fordított megvilágításban (600 lux), „random” keltetést követően.....	35
3.2.f E17, fordított megvilágításban (10 lux), „random” keltetést követően	35
3.2.g E13, fordított megvilágításban (600 lux) <i>in vitro</i> és keltetés alatt is	36
3.3.a E13, állandó sötétben+PACAP <i>in vitro</i> , ritmikus tojásforgatás után.....	37
3.3.b E18, állandó sötétben+PACAP <i>in vitro</i> , ritmikus tojásforgatás után	38
3.3.c E18, állandó sötétben, keltetés alatt PACAP6-38, és kontroll	39
3.3.d E13, állandó sötétben+VIP <i>in vitro</i> , „random” keltetést követően	40

1. táblázat a megvilágítás és a MT ritmus kialakulásának összefüggései	44
--	----

1. Bevezetés

1.1 A biológiai ritmus

Az élő szervezetekben végbemenő folyamatok nagy része periodikusan ismétlődő, ritmikus jellegű, mint például az alvás-ébrenlét váltakozása, egyes hormonszintek napi ingadozása, a menstruációs ciklus, vagy a lombhullatás. A ritmikus változások szükségessége nyilvánvalóan a környezetből eredeztethető. A nappalok és éjszakák, valamint az évszakok ismétlődő váltakozása néhány extrém szélsőséget leszámítva (pl. mélytengerek, sarkkörök) a Föld valamennyi élőhelyén meghatározó változásokat hoznak létre az életfeltételekben. A biológiai folyamatok ciklikussá fejlődése, azaz a biológiai ritmus kialakulása nem csak ezeknek a külső változásoknak a pontosabb követésével, hanem sokkal inkább az előre „jóslással”, és ezáltal a megfelelő felkészüléssel növeli az alkalmazkodás hatékonyságát. Periodikusan változó világunkban tehát megkérdőjelezhetetlen evolúciós előnyt jelent az életjelenségek ritmikussága.

Mivel minden folyamatnak bizonyos időközönként szüksége van regenerációra, energia és alapanyag feltöltésre, a biológiai rendszerekben szinte elengedhetetlen a ciklusos szabályozás és működés. A szövet, vagy sejt szinten működő ritmikus folyamatok, ha nincsenek megfelelően összehangolva, szinkronizálva, akkor “kívülről”, szerv vagy szervezet szintjén nézve szabálytalan, vagy éppen folyamatos működésűnek látszanak. Ezért a legtöbb biológiai folyamatról feltételezhető, hogy valójában periodikus tevékenységeken alapulnak.

A biológiai ritmus alapvető jellemzője, illetve kritériuma, hogy az általa szabályozott életjelenségek ciklikus változása a külső környezetből érkező periodikus ingerek hiányában is megmarad, a ritmus halad tovább. Abból a tényből, hogy ezen folyamatok esetén nem csupán a környezet ismétlődő változásának passzív követéséről van szó, egyenesen következik, hogy mögöttük egy belső, önmagát fenntartó biológiai mechanizmus működése áll.

Ezt az élő szervezetekben megtalálható, ritmust generáló és megőrző mechanizmust nevezték már, illetve nevezik biológiai órának, belső órának, pacemaker-nek, valamint az

utóbbi évtizedekben endogén oszcillátornak. Annak ellenére, hogy ezek a folyamatok éppen a környezettől függetlenül is megtartott működésükkel definiálhatóak, elengedhetetlen, hogy a külvilág változásairól is „informálódjanak”, hogy szükség esetén a külső történések függvényében a ritmus módosítható legyen. Ezért egy komplett periodikus életjelenség kialakításában mindig részt vesznek olyan rendszerek is, amelyek az oszcillációt más folyamatokhoz, vagy a külvilághoz igazíthatják. Ezeket szinkronizáló mechanizmusoknak nevezzük.

Az oszcillátor működésének két alapvető jellemezője van: az ismétlődő periódusok hossza, azaz a periódusidő, valamint a fázisa, ami megadja, hogy a ciklus aktuálisan hol tart, milyen állapotban van. A periódusidőt a biológiai oszcillátort kialakító fiziko-kémiai folyamatok sebessége határozza meg. A másodpercekben mérhető oszcillációkat fizikai jelenségek (pl.: diffúzió, membrán-potenciálváltozás, stb.), vagy gyors kémiai folyamatok, a percekben, órákban mérhetőket enzim aktivitásváltozások, az ennél hosszabbakat receptor-aktivitásban, vagy enzimszintézisben történő változások hozzák létre, melyek háttérben a gén-expresszió változásai állnak. Ezen mechanizmusok hossza állandó, csak igen szűk keretek között változtatható. Ugyanakkor a fázis, azaz a ritmus pillanatnyi állása viszonylag könnyen befolyásolható (fázis-shift), a szinkronizáló mechanizmusok ennek változtatásával hangolják a ritmikus életjelenségeket egymáshoz, vagy a külvilághoz.

A különböző oszcillációkat periódusidejük hossza alapján három alapvető csoportba oszthatjuk. Az egy napnál hosszabb ciklussal rendelkezőket „infradian”-nak, a megközelítőleg 24 órás hosszúságúakat „circadian”-nak, és az egy napnál rövidebbeket „ultradian”-nak nevezzük. Infradian ritmust követ például a menstruációs ciklus, vagy a növényzet évszakos változása. Ultradian ritmust követnek az órákban, percekben, esetleg másodpercekben mérhető periodicitást mutató biológiai folyamatok, mint például a szívverés, az agy elektromos tevékenysége (EEG hullámok), stb.

1.2 A circadian ritmus és jelentősége

Circadian jellegű folyamat például a vérnyomás, vagy a kortizol szintézis napi ingadozása, vagy a legismertebb; az alvás-ébrenlét váltakozása. Néhány kivételtől eltekintve, a napi ritmussal ismétlődő folyamatok jelenléte az összes eukarióta élőlény

közös tulajdonsága (Dunlap, 1999). Miután a földi élővilágot érintő környezeti tényezők, pl. fény, zaj, hőmérséklet, általános aktivitás változásai a Föld forgását követik, a szervezet ritmikus folyamatai közül a leggyakoribb és legjobban tanulmányozott a circadian ritmus.

A napi ciklusok jelenlétét az élő szervezetekben már nagyon régóta ismerjük. Inkább csak tudománytörténeti érdekesség az az információ, hogy az első ismert ritmusbiológiai feljegyzést feltehetően Androstenes tette az i.e. 4. században, aki Nagy Sándor kalandozásainak leírásában megemlíti a tamarindusz fa (*tamarindus indica*) leveleinek napszakos mozgását (Bretzl, 1903). A következő jelentős lépés Jean Jacques d'Ortois de Mairan francia tudóshoz fűződik, aki 1729-ben megfigyelte, hogy a mimóza (*mimosa pudica*) leveleinek mozgása akkor is napi ritmus szerint történik, ha a növényeket a külvilág változásaitól izoláltan, állandó körülmények között tartotta. Adatait Henri-Louis Duhamel du Monceau publikálta saját, jelenleg a Harvard Egyetem Houghton könyvtárában őrzött művében (pontosabb hivatkozás nem elérhető: http://www.hhmi.org/biointeractive/museum/exhibit00/02_1.html).

A Pasteur intézet honlapján található, szintén hivatkozás nélküli adatok szerint J. S. Szymanski 1918-ban állatok esetében is leírta, hogy a 24 órás aktivitási ritmus a külvilág ciklikus fény és hőmérsékleti ingereinek hiányában is folytatódik, megtartott marad (http://www.pasteur.fr/recherche/unites/REG/causeries/dates_1900.html). A téma kutatása természetesen az elmúlt néhány évtizedben jelentősen felgyorsult. Az Egyesült Államok National Library of Medicine-je és a National Institutes of Health-je által működtetett Pubmed adatbázis 1990 és 2008 között megközelítőleg 33000 cikket jelenített meg a „circadian rhythm” keresőszavak beütése után.

Az élettani folyamatok circadian ritmicitásnak figyelembe vétele egyre gyakrabban épül be a gyakorlati orvoslásba is. A vérnyomás és/vagy az EKG 24-48 órás monitorozása (Holter) a szív és érrendszeri betegségek diagnosztizálása során már hosszú ideje rutinnak számít. Ismert, hogy számos hormon (pl. kortizol, melatonin, stb.) szintjének konkluzív meghatározásához egy napon belül több, különböző időpontban vett minta szükséges, és az egyetlen időpontból származó adat önmagában még akkor sem informatív (nem tekinthető egyértelműen kórosnak), ha az érték nem a normál tartományba esik.

A gyógyszerek farmakokinetikáját és farmakodinamikáját is több olyan biológiai folyamat is befolyásolja, melyek napi ritmussal rendelkeznek. Ezen tény felismerése tette szükségessé a *kronofarmakológia* megszületését, amely tudományág azt tanulmányozza, hogy az egyes gyógyszerek beadásának időpontja a fent említettek miatt hogyan változtatja meg a készítmények farmakológiai jellemzőit. A vizsgálatok eredményeit a *kronoterápia* a gyakorlatban történő alkalmazáson keresztül vizsgálja, és próbálja meghatározni az egyes kezelések optimális időzítését, azaz a nap azon pontját, amikor a lehető legnagyobb kívánt hatás a lehető legkevesebb, vagy legenyhébb mellékhatásokkal társul.

Az antibiotikumok családjában számos vegyületcsoport esetén találtak jelentős napi ingadozást a farmakokinetikában és a toxikus mellékhatásokban. Talán a legérdekesebb példa az aminoglikozidok csoportja, amely szerek hatékonyak számos gram negatív baktériumtörzs okozta fertőzés esetén. Főként húgyuti infekciók kezelésére ez a csoport lenne az elsődleges választás, ha nem rendelkezne jelentős oto- és nephrotoxikus mellékhatással. Ugyanakkor bebizonyosodott, hogy a toxikus mellékhatások jelentősen csökkenthetőek, ha a napi egyszeri gyógyszerdózis megfelelő időzítéssel kerül beadásra (Yonovitz és Fisch 1991; Prins és tsai. 1997; LeBrun és tsai. 1999). Így lehetséges, hogy további vizsgálatokat követően a jövőben az aminoglikozidok használati spektruma kiszélesedhet. A beadás időzítésével szignifikánsan befolyásolható farmakokinetikát és toxicitást írtak le számos más gyógyszercsoport esetén is, ilyenek például egyes fluoroquinolon antibiotikumok (Navarro és tsai. 2002), vagy egyes kemoterápiás szerek (Abolmaali és tsai. 2009).

Ismert továbbá az is, hogy nem csak a terápiás eszközöknek, hanem sokszor magának a kórállapotnak, és így a panaszoknak is napi ritmicitása van, ezért ismét a kezelés(ek) megfelelő időzítésével lehet jobb eredményeket elérni. Ilyenek például - a teljesség igénye nélkül sorolva - az asthma, az allergiás rhinitis, és az arthritisek különböző formái (osteoarthritis és rheumatoid arthritis). A szervezet különböző napi ritmusainak torzulása, esetleg megszűnése is orvosi problémává, betegséggé válhat, leggyakrabban alvászavar alakul ki, de a ritmuszavarok fontos szerepet töltenek be a depresszió kialakulásában is. A szervezet és a külvilág napi ritmusa közötti diszkrépancia is különböző panaszokat,

elsősorban szintén alvászavart okoz, ami az időzónákon keresztül történő gyors utazás egyik ismert, kellemetlen velejárója (jet-lag).

Egy egészen friss tanulmány pedig arról számol be, hogy áttétes mellrákban szenvedő betegekben a prognosztikai jelentőséggel rendelkező úgynevezett keringő tumorsejtek száma nem változik a nap folyamán (napi két mintavételi pont mellett), ami arra utalhat, hogy talán maga a tumor sem követ életfolyamataiban circadian ritmust (Martín és tsai. 2009). Sahar és Sassone-Corsi egy szintén aktuálisan megjelent review-jukban pedig számos hasonló vizsgálat eredményeit áttekintve arra a konklúzióra jutnak, hogy a circadian ritmusban bekövetkező zavarok direkt összefüggésben állhatnak különböző daganatos betegségek kialakulásával, illetve a tumorsejtek abnormális metabolizmusával (Sahar és Sassone-Corsi 2009). Nem kérdéses, hogy ezen összefüggések részletes feltárása nagy előrelépést jelenthet mind a megelőzés mind a kezelés terén.

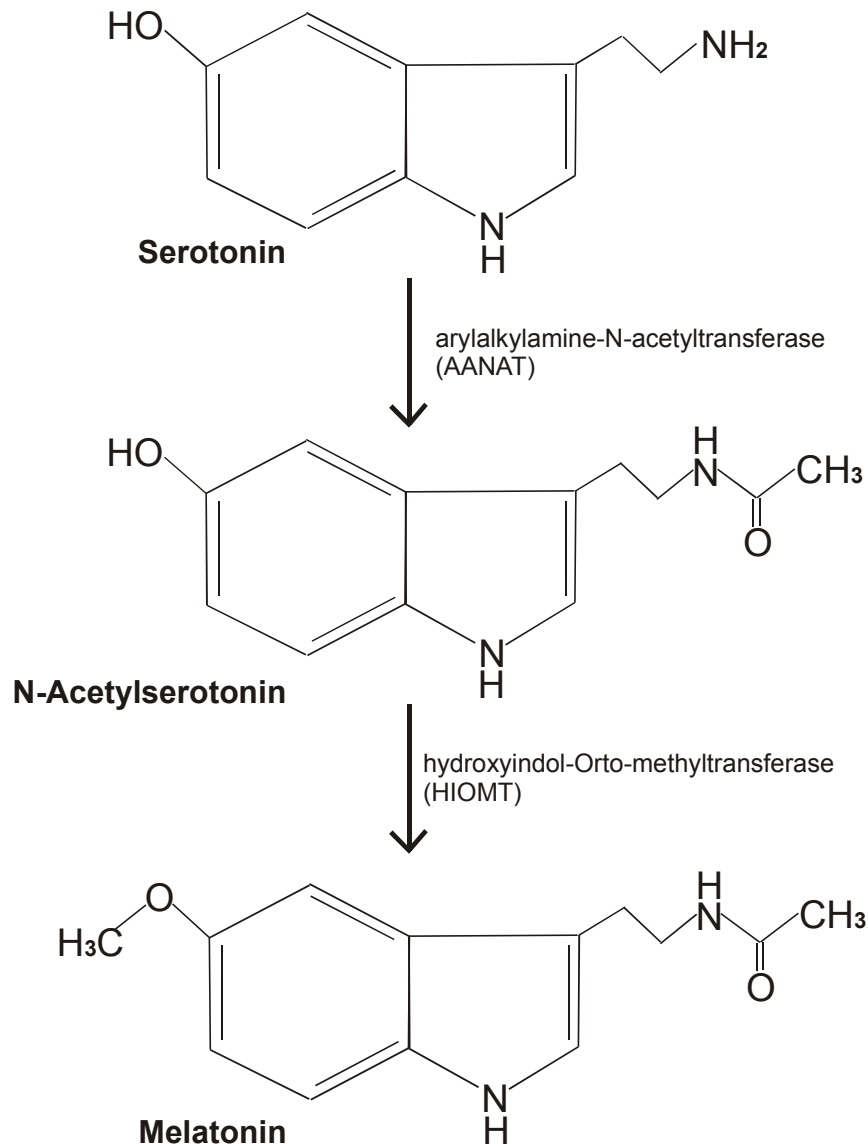
Összegezve tehát elmondható, hogy a 24 órás ritmus szerint zajló életjelenségek nem csak elméleti, de „kézzel fogható”, gyakorlati jelentőséggel is rendelkeznek a mindennapi orvoslás számára is. Napról napra növekszik a ritmusbiológia orvosi alkalmazhatósága. Jól példázza ezt a fent idézett két utolsó cikk, melyek a dolgozat megírásának ideje alatt, szinte az „utolsó simítások” közben jelentek meg. Mindezek ellenére a napi ritmus szerveződésével kapcsolatban számos alapvető kérdés még tisztázatlan, ezért a dolgozatban bemutatott kísérletek segítségével próbáltunk meg alapkutatás jellegű adatokat gyűjteni a ritmus kialakulásával és szinkronizációjával kapcsolatban.

1.3 A tobozmirigy és a melatonin

A circadian ritmus vezérléséért, valamint a nappalok és éjjelek váltakozásához történő szinkronizálásáért a nem emlős, gerinces fajokban elsősorban a tobozmirigy és az általa termelt hormon, a melatonin (MT) felelős. (Binkley és tsai. 1978; Korf és Wicht 1992).

A MT egy indol származék, mely két lépésben képződik szerotoninból. Az alapvegyületet először az arilalkylamin-N-acetiltransferase (AANAT) alakítja N-acetilserotoninná, majd a hydroxyindol-Orto-metiltransferase (HIOMT) hozza létre az 5-hydroxy-N-acetyltryptamint, azaz a MT-t (**1.2.a.** ábra). A folyamat sebesség-

meghatározó enzime az AANAT, melynek aktivitása sötétben mintegy hatvanszorosa a nyugalminak (Binkley, 1979). A MT metabolizmusa a májban történik, ahol a hormonból 6-sulphatoxy-melatonin képződik, ami majd a vizeletben választódik ki.



1.2.a. ábra

A melatonin bioszintézise

A serotonin az AANAT N-acetilserotoninná módosítja, majd a következő lépésben a HIOMT alakítja ki az 5-hidroxi-N-acetyltryptamint, azaz a MT-t.

A hormon a mirigysejtekben nem tárolódik, mivel lipidoldékony, tehát a MT plazmakoncentrációjának emelkedése mindig a termelés fokozódásának, és nem a raktárak kiürülésének az eredménye. Ezért a peptid-hormonokkal ellentétben, ahol stimulust követően a vér hormonkoncentrációja - a gyorsan kiürülő intracelluláris

raktárak miatt - rövid latenciával emelkedik, a tobozmirigyből csak mintegy kilencven perces késés után indul meg a hormon-felszabadulás (Csernus és tsai., 1994).

A MT meglehetősen széles hatásspektrummal rendelkezik. Célsejtjeit nagy affinitású, G-proteinhez kapcsolt receptorain át befolyásolja (Morgan és tsai., 1994). Eddig három receptor altípust azonosítottak: a főként az agyban expresszált MT1-et, a főként a retinában kifejeződő MT2-t (Reppert és tsai., 1994, valamint 1995), valamint az MT3-t, amiről csak nemrég derült ki, hogy valójában nem G-protein-t aktiváló receptorról van szó, hanem egy intracelluláris enzim, a quinone reductase 2 rendelkezik egy MT kötő hellyel (Boutin, 2007), és ez a „receptor” feltehetően csak a szemnyomás szabályozásában játszik szerepet (Dubrovich és tsai., 2003). Ezen kívül a MT más intracelluláris proteinekhez is képes kapcsolódni, és azok működését befolyásolni, pl. calmodulin (Turjanski és tsai., 2004; Benitez-King és Anton-Tay, 1993) és calreticulin (Macias és tsai., 2003).

Az MT1 és MT2 receptorokat számos központi idegrendszeri struktúrában (suprachiasmaticus mag, hippocampus, kisagy kéreg, prefrontális kéreg, bazális ganglionok, substantia nigra, nucleus accumbens, a retina horizontális, amacrin és ganglion sejtjei, stb.), valamint perifériás szervekben (erek, emlő mirigy, gyomor-bél traktus, máj, vese, petefészek, here, prosztata, bőr, és az immunrendszer különböző sejtjei) is kimutatták (ezeket az adatokat számos tanulmány alapján Pandi-Perumal és tsai 2008-as review-jukban foglalják össze). Szerteágazó hatásai közül a napi aktivitás szabályozásán kívül a legismertebbek a következők: reprodukív rendszerre gyakorolt befolyása főként az LHRH hatásának gátlásán keresztül valósulhat meg (Martin és tsai., 1980), hat az immunrendszer működésére (Carillo-Vico és tsai., 2005), fontos antioxidáns (Tan és tsai., 1993), az alacsonyabb MT szint egyes tumorok (pl. emlő tumor) kialakulásának rizikóját növelheti (Schernhammer és tsai., 2004; Navara és Nelson, 2007), továbbá feltételezik az abnormális MT produkció szerepét az autizmusban (Melke és tsai., 2008).

A tobozmirigy hormonjának legfontosabb szerepe mégis a circadian aktivitás szabályozása, külvilághoz igazítása. Ez a hatása is feltehetően több struktúrán, de elsősorban a suprachiasmaticus magon (SCN) keresztül valósul meg (Weaver és tsai., 1993). Ebben a hypothalamikus magban az MT1 és az MT2 receptorok is jelen vannak,

de funkciójuk eltér: az MT1 receptor gátolja a mag sejtjeinek elektromos aktivitását, míg az MT2 receptor a sejtek ritmikus működésének fázisát változtatja meg (Dubocovich és tsai., 2003).

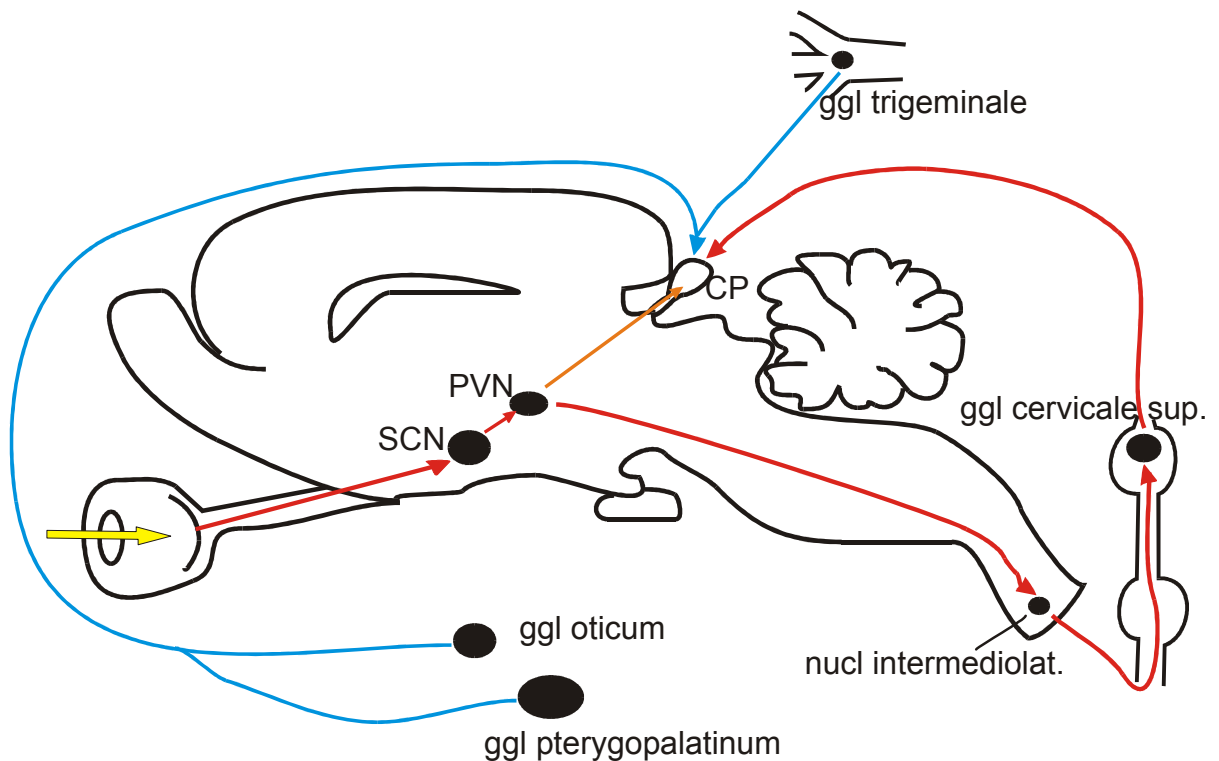
Az evolúció során a tobozmirigy felépítése, anatómiai elhelyezkedése megváltozott, funkciója beszűkült. A köztiagy dorsalis részén fejlődik egy tasakként, amely parietális és pineális részre válik szét (Dodt, 1973; Dodt és Meiss., 1982). A pineális rész mirigyes szerkezetű, ami magát a tobozmirigyét képezi, míg a pars parietalis magasabb rendűekben visszafejlődik.

A földtörténeti ókorban élt páncélos, állkapocs nélküli gerincesekben, valamint a ma is élő ingólában és a hidasgyíkban a tobozmirigy pars parietaléja a nyílvarrat (sutura sagitalis) egy nyílásán kibújva egy a fejtető bőre alatt elhelyezkedő harmadik szemet alakított ki. Ennek funkciója a fényviszonyok közvetlen érzékelése, és az ennek megfelelő idegi szabályozás volt. Ez utóbbit biztosította a harmadik szemből induló jelentős mennyiségű pineofugális idegrost. Később a filogenezis során a pars parietale elcsökevényesedett, az egész szerv a felszíntől egyre távolabb helyeződött valamint az efferens rostok száma és szerepe fokozatosan csökkent. A fény közvetlen vezérlő hatását egyre inkább a neurohumoralis afferentáció, míg az efferens idegelemek szerepét a hormonális tényező, a MT vette át (Vígh és Vígh-Teichmann 1988; Korf és Wicht 1992).

Emlősökben a tobozmirigyben található fényérző receptorok maradványai - szemben valamennyi nem emlős gerinccsel - elvesztették funkciójukat. A szerv önállósága a filogenezis során már elveszett, önmagában nem képes ritmikus tevékenységre, szerepe csupán a hormontermelés. Ezt bizonyította, hogy a patkányból eltávolított szerv önmagában, *in vitro* folyamatos alapszekréciót mutatott éjszakai szekréciófokozódások nélkül (Rékasi és tsai. 1991).

Emlősökben a circadian oszcillátor a suprachiasmaticus magba helyeződött, melyet a retinán keresztül érkező fényingerek hangolnak a külvilághoz (Binkley és tsai. 1978; Collin és tsai. 1984; Korf 1994; van Veen és tsai. 1986). A mag a sympathicus rendszeren keresztül vezérli a tobozmirigy MT szintézisét: a nucleus suprachiasmaticusból induló axonok a hypothalamus egy másik magjába, a nucleus paraventricularisba vetülnek, az információ innen száll le a thoracalis gerincvelő nucleus

intermediolateralis-ába, ahonnan a truncus sympathicuson keresztül a ganglion cervicale superiusba jut. Végül a ganglionból eredő idegrostok a központi idegrendszert ellátó artériák mentén érik el a tobozmirigyet (1.2.b. ábra).



1.2.b. Az emlős tobozmirigy beidegzése

A patkány központi idegrendszerének sémás, áttekintő rajzán a tobozmirigyhez (CP) futó afferens idegrostokat vékony, színes nyilak reprezentálják. A vastag sárga nyíl a külvilágból érkező fény jelképe. A retina által felvett fényinformáció a nucleus suprachiasmaticuson (SCN), nucleus paraventricularison (PVN), majd a gerincvelő nucleus intermediolateralis-án és végül a truncus sympathicus ganglion cervicale superius-án keresztül jut el a tobozmirigyhez (piros nyilak). A mirigybe ezen kívül rostok érkeznak több perifériás ganglion felől (kék nyilak), valamint centrális beidegzést is kap a hypothalamusból (főként PVN-ből, narancssárga nyíl). (Moller és Baeres 2002 nyomán)

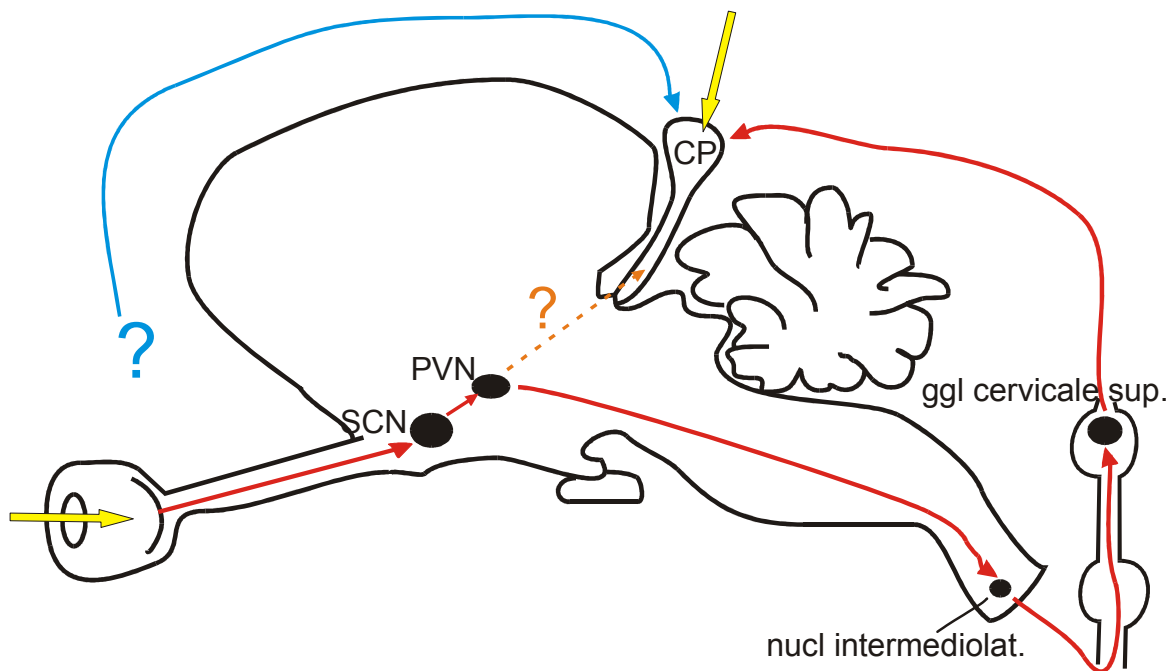
Ugyanakkor a korábban leírtaknak megfelelően a suprachiasmaticus kontoll alatt teremelő MT visszahat a magra, kialakítva ezzel egy komplex szabályozási mechanizmust. A sympathicus beidegzés mellett a mirigy rostokat kap két parasympathicus ganglionból is (ggl. oticum, ggl. pterygopalatinum), valamint meglepő módon peptiderg rostok érkeznak a ganglion trigeminaléből. A fentiekén kívül a tobozmirigy nyelén keresztül, a commissura posterior és habenularum felől is axonok lépnek a mirigybe, ez az úgynevezett centrális beidegzés a laterális hypothalamusból, a nucleus geniculatum lateraléből, a nucleus paraventricularisból, valamint a raphe magvekből ered (Moller és Baeres 2002). Az emlős tobozmirigyben végződő idegrostokat összefoglalóan az 1.2.b. ábra mutatja be.

Az emlősökkel szemben a madarak (illetve a nem emlős gerincesek) tobozmirigye még tartalmaz egy komplett biológiai oszcillátort, aminek működését a fény direkt pacemaker tényezőként vezérli (Binkley és tsai. 1978; Takahashi és tsai. 1980). Akárcsak az emlősök esetében, a nucleus suprachiasmaticus a madarakban is több átkapcsolás révén, a sympathicus idegrendszeren keresztül létesít kapcsolatot a tobozmiriggyel. Mivel azonban a nem emlős gerincesek corpus pinealéja önállóan is képes a ritmikus működésre, valamint direkt fényérzékenységgel rendelkezik, a sympathicus beidegzés szerepe kisebb, már nem vezérlő, hanem inkább befolyásoló tényező (Binkley és tsai. 1978; Takahashi és tsai. 1980). A madár tobozmirigy egyéb eredetű beidegzéséről alig található irodalmi adat, kutatócsoportunk még nem publikált eredményei szerint a ganglion pterygopalatinumból indulnak a mirigybe tartó idegrostok. Bár a további kapcsolatok feltérképezése még további vizsgálatokat igényel, elképzelhető, hogy a szerv - önállósága folytán - az emlősök esetében látott kapcsolatoknál csak kevesebb afferentációt „igényel”. A madár corpus pineale beidegzésével kapcsolatos ismereteinket az **1.2.c.** ábra szemlélteti.

Bár az emlős és a madár tobozmirigy felépítése és beidegzése eltér, megállapítható, hogy a környezethez adaptálható, circadian ritmusban történő MT szekréció kialakításának mindkét esetben a nucleus suprachiasmaticus és a corpus pineale együttműködése áll a háttérben. Mivel a biológiai óra kialakításáért felelős óragének a törzsfajlás során konzerválódottaknak bizonyultak (a különböző fajokban történt vizsgálatokból származó nagy mennyiségű adatot a következő review-k foglalták össze: Dunlap 1999; Panda és tsai. 2002; Bell-Pedersen és tsai. 2005), feltételezhető, hogy a circadian oszcillációért, valamint a ritmus - a külvilág fény és egyéb ingereihez történő -szinkronizációjáért felelős mechanizmusok madarakban és emlősökben azonosak.

Az eddig leírtak alapján elmondható, hogy a ritmikus folyamatok alapjelenségeinek vizsgálatára a madarak tobozmirigye is alkalmas modell. Mivel patkány miriggyel ellentétben a csirkéből eltávolított szerv *in vitro* is megtartotta ritmikus, a napszaknak megfelelő hormontermelését, mely külső megvilágítással és bioaktív anyagokkal (Noradrenalin, VIP, PACAP, stb.) is befolyásolható bizonyult (Binkley és tsai. 1978; Deguschi, 1979; Csernus és tsai. 1998; Mess és tsai. 1996; Takahashi és tsai. 1980),

belátható, hogy a madár corpus pineale egyszerűbben vizsgálható. Egyszerű tartása és hozzáférhetősége miatt a madarak közül a csirkét választottuk kísérleti állatnak.



1.2.c. A madár tobozmirigy beidegzése

A csirke központi idegrendszerének sémás, áttekinthető rajzán a tobozmirigyhez (CP) futó afferens idegrostokat vékony, színes nyilak reprezentálják. A vastag sárga nyíl a külvilágból érkező fény jelképe. A retina által felvett fényinformáció az emlősökhöz hasonló úton (nucleus suprachiasmaticus: SCN, nucleus paraventricularis PVN, piros nyilak) keresztül eléri tobozmirigyét, de itt a szerv közvetlenül is érzékeny a megvilágításra. A mirigy perifériás ganglionok felől történő beidegzése nem pontosan ismert (kék nyíl). Szintén kérdéses a centrális beidegzést megléte (narancssárga nyíl). (Csernus nyomán)

A circadian ritmus alapjelenségeinek kutatásához az élő szervezetben végbemenő, ellenőrizhetetlen és jórészt ismeretlen mennyiségű és minőségű élettani interakciók kiküszöbölése érdekében *in vitro* vizsgálatokat terveztünk. Mivel a 24 órás ritmus követéséhez, illetve az abban bekövetkező változások monitorozásához egy több napig működő, gyakori mintavételezési lehetőséggel rendelkező szövettenyésztési módra volt szükségünk, a statikus kultúra helyett egy dinamikus, folyamatos tápoldat-átáramlásos szövetkultúrát, a perifúziós rendszert választottuk. Ebben a rendszerben a friss, oxigenizált szövettenyésztő médium a vérkeringést imitálva folyamatosan áramlik a mirigydarabokat tartalmazó géloszlopokon keresztül, és a szövetek ellátásán túl biztosítja a sejtek által termelt salakanyagok, illetve végtermékek, elválasztott hormon(ok) (ez esetben MT) elszállítását is. Ezáltal a perifúziós módszer mentes a végtermékek

visszahatásától, amely a statikus rendszerekben nehezen kivédhető. Valamint az elfolyó médium gyűjtésével, frakciózásával (24 óra alatt 48 minta) és az ezekből történő hormonkoncentráció mérésével lehetővé vált a ritmikus folyamat pontos, folyamatos követése, ami a korábbi, statikus kultúrákban történő napi 2-4 mintavételhez képest a sokkal pontosabb és informatívabb képet adott.

Csirkék tobozmirigyein perifúziós módszer segítségével végzett kutatásaink három fő kérdéskör köré csoportosultak:

1. **Szinkronizáció:** korábbi kísérleteink (Csernus és tsai. 1998, Csernus és tsai. 1999) folytatásaként vizsgáltuk, hogy a tobozmirigy már kialakult circadian működését milyen intenzitású megvilágítással lehet a külvilághoz igazítani, mekkora a szerv fényérzékenysége (lásd 1.4)
2. **Fejlődés:** adatokat gyűjtöttünk a circadian hormontermelés embrionális fejlődéséről, illetve az ezt befolyásoló tényezőkről (lásd 1.5)
3. **Neuropeptidok:** a fény változásainak szerepe mellett a pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) és a vasoactive intestinal polypeptide (VIP) embrionális MT szekrécióra gyakorolt hatásait is vizsgáltuk (lásd 1.6)

1.4 A csirke tobozmirigy fényérzékenysége

A természetben a szervezet számára a fény a legegyszerűbb és legegységesebb információhordozó a külvilág ciklusáról, így egyben ez a legfontosabb szinkronizáló faktor is, ami a circadian aktivitást a környezethez igazítja. A fény érzékelését fotoreceptorok teszik lehetővé, melyek a halaktól a madarakig megtalálhatóak a tobozmirigyben (Deguchi 1981; Dodt 1973; Sun és tsai. 1991; Ueck és Wake 1977; Vígh és Vígh-Teichmann 1981). A madarak tobozmirigye közvetlenül a koponyacsont alatt helyezkedik el. Mérések szerint a benne található, a retina receptor-sejtjeire emlékeztető fényérzékeny elemek érzékenysége elegendő ahhoz, hogy a koponyatetőn áthatoló fény vezérelni tudja a szervet. Ezek a szövettanilag kimutatható fényérzékelő elemek (pl. pinealopsin) bizonyítottan működnek is, és kapcsolatban állnak a MT termelő rendszerrel (Korf és Vígh-Teichmann 1984; Vígh-Teichmann és Vígh 1992; Vígh és Vígh-Teichmann 1988). A madár corpus pineale fényérzékeny pigmentje a kék fény esetén

mutat abszorpciós maximumot (Okano és tsai. 1994; Okano és Fukada 1997). A csirke tobozmirigy *in vitro* MT szekréciója szintén kék fényre bizonyult a legérzékenyebbnek (Csernus és tsai. 1999)

A fény szinkronizáló szerepét vizsgálva intézetünkben kimutatták, hogy ritmikus MT szekréció *in vitro* nem változott, ha az állatokat leölésük előtt akár több hétig folyamatos fényviszonyokban tartották, vagy ha a megvilágítást akár *in vivo*, akár *in vitro* rövid (3 óránál rövidebb) időre megváltoztatták. Az *in vitro* folyamatos fényben tartott sejtek MT elválasztása néhány nap után magas szinten stabilizálódott (Csernus és tsai. 1998). Fordított megvilágítással (éjszaka fény, nappal sötétség) másfél nap alatt megfordíthatónak bizonyult a periodikus működés fázisa (Csernus és tsai. 1998; Mess és tsai. 1996). Azt is kimutatták, hogy a megfelelő fázisban alkalmazott viszonylag rövidebb (de legalább 3 órás) fény is rendelkezik a fordított megvilágításhoz hasonló hatással (Csernus 2003). Ugyanakkor a folyamatos sötétség nem okozott az állandó megvilágításhoz hasonló eltéréseket, azaz nem módosította a fázist.

Felmerül a kérdés, hogy a fény eddig felsorolt hatásai milyen intenzitás mellett valósulnak meg. A kis intenzitású megvilágítás okozta változásokat eddig csak bizonyos halfajokban vizsgálták. Nyúlhalak tobozmirigyei - sejt kultúrában vizsgálva – érzékenynek bizonyultak az éjszakai holdfényre (Takemura és tsai. 2006), sőt a tengeri sügér mirigysejtjeinek *in vitro* MT termelését már a 3.8×10^{-5} és 3.8×10^{-6} W/m², azaz a 0.0024 és 0.00024 lux közötti intenzitású megvilágítás is befolyásolta (Migaud és tsai. 2006). Ezen adatok szerint a halak tobozmirigye az extrém alacsony intenzitású fényt is képes érzékelni. A madarak pinealocytainak fényérzékenységéről nem találtunk korábbi kísérletes adatokat.

Seregélyekben kimutatták, hogy a tojások 10 lux intenzitású fényvel történő megvilágítása elegendő ahhoz, hogy az embriók MT szintézisét a külső megvilágításhoz szinkronizálja (Gwinner és tsai. 1997). Ebben az *in vivo* kísérleti eredményben nem tisztázott, hogy a tapasztalt hatás a retinán, vagy a tobozmirigyen, vagy esetleg mindkettőn keresztül valósult-e meg. Más vizsgálatok igazolták, hogy a madár tobozmirigyben a MT szintézis sebesség-meghatározó enzimének, az arylalkylamine N-acetyltransferase-nak (AANAT) az aktivitása megváltozik a retina megvilágítását követően (Zawilska és tsai. 2004). Felmerül tehát a kérdés, hogy az alacsony intenzitású

fénynek van-e direkt, a madarak tobozmirigyére gyakorolt hatása. Az sem tisztázott, hogy mennyire fényérzékeny a madarak tobozmirigye, összehasonlítható-e a halak tobozmirigyének érzékenységgel? Ezen kérdések megválaszolására *in vitro* vizsgálatokat terveztünk.

1.5 A circadian MT szekréció fejlődése

Emlősökben a tobozmirigy MT szekréciójának circadian ritmusa csak születés után alakul ki, a magzat ritmikus funkciói még az anya ritmusát követik (Zeman és tsai. 1992). Újabb, egereken végzett vizsgálatok kimutatták, hogy egyes perifériás oszcillátorok (pl. pars tuberalis), melyek fázisát az anyai MT ritmus kontrollálja, már a magzatban is működnek, csupán a karmesteri szerepet betöltő suprachiasmaticus mag ritmusa hiányzik (Ansari és tsai. 2009). Az *in vivo* egyértelműen detektálható circadian MT ritmus fajonként eltérően a 2-4. postnatális hetek között jelenik meg (Tamarkin és tsai. 1980, Sato és tsai. 1989).

Ezzel szemben madarakban a circadian MT ritmus már az embrionális élet során kialakul. Az eltérő időzítés ellenére feltételezhető, hogy a circadian ritmus fejlődésének lépései, valamint a külvilágból származó ritmikus ingerek ezen folyamatra gyakorolt hatásának alapjai mindkét osztályban hasonlóak. Így várhatóan a madár tobozmirigyen végzett embrionális vizsgálatok eredményei az emlős postnatális ritmusfejlődés megismeréséhez is felhasználhatóak lehetnek.

A madarak embrionális MT szekréciójáról a következő adatok állnak rendelkezésünkre: Zeman és társai kimutatták, hogy normál megvilágításban (12 óra fény, 12 óra sötét) tartott, az embrionális élet 18. és 19. napján (ezentúl következetesen: E18 és E19) 2 óránként feláldozott csirke embriókban az éjszakai órák alatt magasabb MT tartalom mérhető, mint nappal (Zeman és tsai. 1992; Zeman és tsai. 1999). Herichová szintén *in vivo* kísérleteiben kimutatta, hogy az E19 csirke embriók MT szekréciója és a mirigy egyes óragénjeinek mRNS szintjei a megvilágítás hatására megváltoznak (Herichová és tsai. 2001).

Más kutatók is hasonló eredményre jutottak a csirke embriók tobozmirigyéből készített szövettényezeteken végzett vizsgálatok során. Akasaka és társai csirke corpus pineale

tenyészetben szintén a környezeti megvilágítással befolyásolható változásokat mutattak ki a MT szekréciónál már a 13-14. embrionális napokon (Akasaka és tsai. 1995). Lamosová és szerzőtársai szerint az embrionális tobozmirigyek E17 után *in vitro* is ritmikusan termelik a MT-t, amennyiben normál megvilágításban tartják a tenyészetet, de konstans sötétben megszűnik a ritmus (Lamosova és tsai. 1995). Ezek a legfeljebb 2 napos kísérletek azonban statikus kultúrákban történtek, ahol a MT szint változását csupán napi két (Akasaka és tsai. 1995), vagy négy (Lamosova és tsai. 1995) mintavétel alapján határozták meg.

Az *in vivo* vizsgálatok esetén nincs információnk arról, hogy a retinán keresztül történő fényérzékelés is részt vesz-e a MT ritmus kialakításában, illetve az sem világos, hogy az eltérő éjszakai és a nappali MT koncentrációk hátterében valóban ritmikus változások állnak-e. Az *in vitro* kísérletekben, ahol kisszámú mintavétel alapján mutattak ki eltéréseket, szintén nem igazolták, hogy az eredmények valójában ritmusnak felelnek-e meg. Továbbra is kérdéses, hogy a circadian MT ritmus az embrionális élet melyik napján/napjain jelenik meg először, és hogy a környezeti megvilágítás a ritmus kialakulásában milyen szerepet játszik. Hogy ezekre a kérdésekre választ kapjunk, dinamikus, *in vitro* rendszerünkben az embrionális MT szekréciónál több napon keresztül történő folyamatos monitorozását terveztük különböző megvilágítási feltételek mellett.

1.6 Neuropeptidok embrionális tobozmirigyre gyakorolt hatásainak vizsgálata

A pituitary adenylate cyclase activating polypeptid (PACAP)-et 1989-ben izolálták birka hypothalamusból, mint a VIP/secretin/glucagon peptidcsalád új tagját, mely 67%-os szerkezeti hasonlóságot mutat a VIP-el (Arimura 1998; Vaudry és tsai. 2000; Sherwood és tsai., 2000). A széles hatásspektrummal rendelkező, az élő szervezetek számos szövetében fellelhető neuropeptid egyéb hatásai mellett emlősökben a circadian aktivitás szabályozásában is szerepet játszik (Chen és tsai. 1999; Harrington és Hoque 1997; Harrington és tsai. 1999). Jelenlétét kimutatták többek között a circadian szabályozás központjában, a nucleus suprachiasmaticusban (SCN), a retina ganglionsejtjeiben, illetve a retinát az SCN-el összekötő tractus retinohypothalamicusban is (Hannibal és tsai. 1997; Hannibal és tsai. 2000; Piggins és tsai. 1996).

A PACAP-nak két különböző verziója is ismert, egy 27 valamint egy 38 aminosav hosszúságú molekula. Az emlős és madár szövetekben egyaránt az utóbbi dominál (Arimura, 1998). A PACAP(38) molekulaszervezete az evolúció során jelentősen konzerválódott, így a csirke PACAP az emlősökétől csupán egyetlen aminosavban különbözik (Arimura, 1998). A csirke agyában is kimutatták a PACAP jelenlétét és koncentrációjának circadian változásait (Józsa és tsai., 2001). Emellett azt is leírták, hogy a PACAP stimulálja a felnőtt csirke tobozmirigy MT szekrécióját is (Csernus és tsai., 2004; Nakahara és tsai., 2002). A PACAP direkt hatásai mellett vizsgálták továbbá, hogy a PACAP hatásának antagonistával (PACAP6-38) történő gátlása befolyásolja-e az idegrendszer fejlődését. Kimutatták, hogy az E8 napon történő *in ovo* PACAP6-38 kezelés a kikelés utáni motoros viselkedést átmenetileg, a szociális viselkedést viszont tartósan megváltoztatta (Hollósy és tsai. 2004).

Az eddig felsoroltak alapján feltételezhető, hogy a PACAP szerepet játszhat a csirke tobozmirigy circadian aktivitásának fejlődésében is. Mivel erre utaló irodalmi adatokat nem találtunk, kísérletes rendszerünkben különböző korú csirke embriókon mind az *in vitro* PACAP expozíció, mind az *in ovo* anti-PACAP kezelés hatásainak vizsgálatát terveztük.

A vasoactive intestinal polypeptide (vagy egyszerűbben csak peptide) 28 aminosavból épül fel, és a PACAP-hoz hasonlóan az emlős, illetve a madár szervezet számos különböző szövetében szintetizálódik (pl. nucleus suprachiasmaticus, vegetatív idegek, pancreas, bélfal – Fahrenkrug és Emson, 1982; Said, 1986). Patkányban ismert, hogy a SCN-ben VIP szintetizáló neuronok találhatóak, amelyek számos SCN-en belüli neuronra (Daikoku és tsai., 1992, Romijn és tsai., 1997), valamint azon kívüli magokra (pl. LHRH neuronok, preoptikus régió, paraventriculáris mag - van der Beek és tsai., 1997, Watts és Swanson 1987, Kalsbeek és tsai., 1993) vetülnek.

A VIP-t termelő neuronokon kimutatták a retinohypothalamicus pálya direkt végződéseit (Ibata és tsai., 1989, Tanaka és tsai., 1993), és igazolták, hogy fényingert követően a VIP sejtek aktivitása növekszik (Romijn és tsai., 1996). Szintén bizonyított, hogy a patkány SCN VIP expressziója 24 órás ritmusban változik a fény-sötét ciklus során, és szignifikáns maximumot mutat a sötét periódus alatt (Zoeller és tsai., 2006). Mindezekből feltételezhető, hogy rágcsálókban az SCN VIP szekrécióját a környezeti

megvilágítás irányítja, illetve a VIP a fény hatásait közvetíti az SCN-be (Piggins és Cutler 2003).

A PACAP mellett a szintén a VPAC receptorcsaládon ható VIP-ről is bizonyították, hogy *in vitro* körülmények között is serkenti a felnőtt csirkék tobozmirigyéből történő MT elválasztást (Csernus és tsai. 2004; Nakahara és tsai. 2002; Zatz és tsai. 1990). Mivel a VIP embrionális corpus pinealera gyakorolt hatásairól sem állt rendelkezésünkre kísérletes eredmény, a PACAP mellett a vizsgálatainkat kiterjesztettük a VIP hatásának tesztelésére is.

Célkitűzések:

A már említett három fő kérdéskör kutatásához tervezett vizsgálataink:

1. A tobozmirigy circadian működésének fényérzékenysége.

Felnőtt csirkék tobozmirigyait *in vitro* fordított fényritmusban (éjszakánként megvilágítás, nappal sötét) tartjuk. A kísérletekben a MT ritmus fázisának változását (megfordulását) hasonlítjuk össze különböző, csökkentett intenzitású megvilágítás alkalmazását követően. Az alkalmazott fény intenzitásának csökkentése mellett az ismétlődő megvilágítás időtartamának rövidítésével (de korábbi adataink alapján 3 óránál nem rövidebbre) is megpróbáljuk a stimulust „gyengíteni”, hogy a tobozmirigy fényérzékenységének határait feltérképezzük.

2. A circadian MT szekréció fejlődése.

Előkísérleteink során meghatározzuk, hogy mi az a legfiatalabb embrionális kor, amikor a calvaria felnyitását követően a tobozmirigy már egyértelműen elkülöníthető a környező szövetektől és nagy biztonsággal, valamint gyorsan eltávolítható. A már eltávolítható mirigyek MT elválasztását a perifúziós rendszerben állandó sötétben, illetve különböző intenzitású ritmikus megvilágításban tartva napokon át monitorozzuk, hogy a ritmus megjelenésének idejét és feltételeit meghatározzuk. Szintén vizsgáljuk, hogy hogyan változik és/vagy jelenik meg a MT ritmus, ha az *in vitro* kísérlet előtt a „mirigygazda” embriók keltetésének paramétereit változtatjuk.

3. Neuropeptidek hatása a circadian ritmus fejlődésére.

Különböző korú embrionális tobozmirigyeket *in vitro* ismételt PACAP-al ingerelve vizsgáljuk, hogy megfigyelhető-e bármilyen változás a mirigy hormontermelésében egy-egy beadást követően, illetve hogy megváltoztatható-e (előrébb hozható, vagy késleltethető) ezzel a circadian ritmus fejlődése. Hasonló kísérleteket végzünk VIP-vel is. *In ovo* PACAP antagonistá injektálását követően teszteljük a később eltávolított corpus pinealék *in vitro* MT szekrécióját, hogy megtudjuk, az idegrendszer érését gátló beavatkozás kihat-e a tobozmirigyre is.

2. Anyagok és módszerek

2.1 Anyagok és eszközök

A perifúziós tápfolyadékhoz Médiüm 199-et (Sigma, M-5017), nátrium-bikarbonátot (Reanal), gentamycint (Chinoïn), valamint bovin szérumalbumint (Sigma, A-7906) használtunk. Az oldatot 0.45 µm-es membránszűrőn (Millipore HAWP-04700) szűrtük át. A vízfürdő és a vízköpenyek hőmérsékleteinek pontos vezérlését Braun Thermomix BM (B. Braun Biotech) és Lauda Ecoline 211 (Simex) típusú termosztátokkal biztosítottuk. A fényviszonyokat Luxmeter PU150 (Metra Blansko) típusú luxmérővel határoztuk meg. A tojásokat Hemel Brutgerät (A70) keltetőgépben keltettük.

2.2 A kísérleti állatok

A vizsgálatokhoz mindkét nembeli, fehér és tarka „húshibrid” csirkék tobozmirigyait használtuk. Az állatokat 25 °C-on, standard megvilágítás (06.00 - 20.00 óráig 255 lux intenzitású fény, 20.00 - 06.00 óráig sötét) alatt tartottuk a kísérleteket megelőzően legalább két hétig. Takarmányt (kukorica és búza) és vizet *ad libitum* fogyaszthattak.

A megtermékenyített tojásokat egy helyi keltető-üzemből (Bóly Rt) szereztük be, majd 37.5°C-on, 60% páratartalom alatt keltettük őket. A kísérletek egy részében a tojásokat naponta kétszer, megközelítőleg azonos időpontokban (07.00 és 08.00 között, valamint 17.00 és 18.00 között) manuálisan, egyenként megforgattuk. Más kísérletekben a Hemel Brutgerät keltetőgép minden fél órában automatikusan átgörgette a tojásokat (rimikus ingerektől mentes, „random” keltetés). Az állatokat mindig 13.00 és 14.00 óra között áldoztuk fel, hogy a hormontermelés circadian ritmusának lehetőleg ugyan azon fázisában kezdjük el az *in vitro* monitorozást.

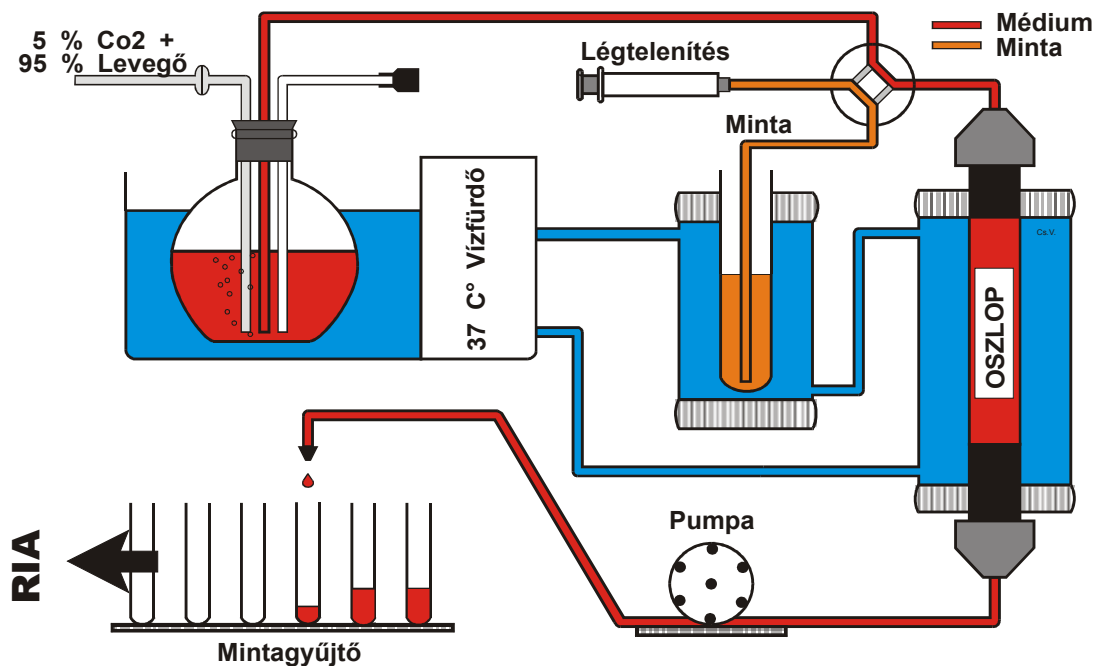
2.3 *In ovo* kezelések

Egyes kísérleteinkben a csirke embriókat tartalmazó tojásokat E15 korukban injektáltuk 50µg, 25µl fiziológias sóban feloldott PACAP6-38-al. Az azonos korú kontroll tojásokba 25µl fiziológias sóoldatot feskendeztünk.

Az *in ovo* injektálás előtt a tojások „lámpázásával” megállapítottuk a léghólyag helyzetét. A tervezett behatolási területet jódd oldattal lemostuk, majd steril tűvel kilyukasztottuk a tojáshéjat. A megfelelő oldatot Hamilton fecskendővel a chorioallantois hártya alá juttattuk. A beadást követően a lyukat steril ragasztószalaggal fedtük be.

2.4 A perifúziós rendszer

A perifúziós rendszer szerkezete a **2.4.a** ábrán látható. A vízfürdőbe helyezett, 5% CO₂-t és 95% levegőt tartalmazó gázkeverékkel telített, Médium 199 alapú tápfolyadékot (médium) vékony teflon csöveken keresztül jutattuk a mirigydarabokat tartalmazó oszlopba. Az elfolyó tápoldatot (médium) a frakciókollektor csöveiben gyűjtöttük össze. Folyamatos, 0.1 ml/perces áramlását egy az oszlopok és a frakciókollektor között elhelyezett perisztaltikus pumpával biztosítottuk. A kísérletek során harminc perces frakciókat gyűjtöttünk, így egy csőbe 3 ml médium került.

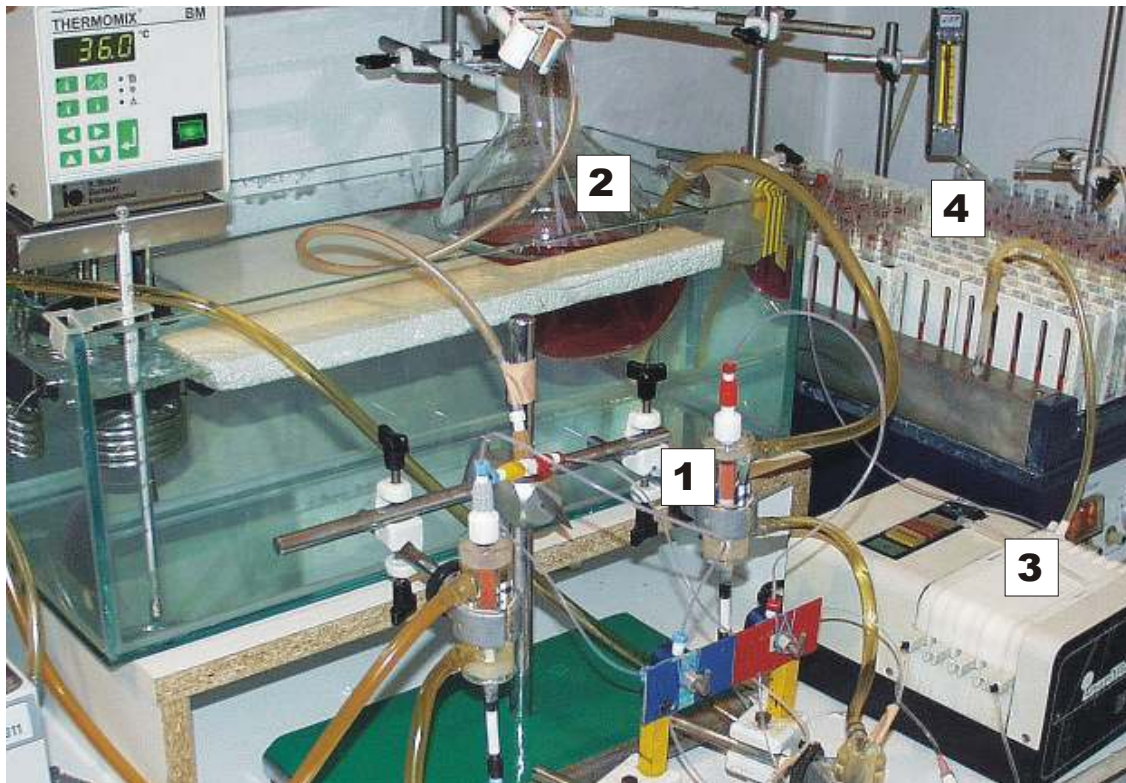


2.4.a. ábra

A perifúziós rendszer sémás rajza (Csernus nyomán)

Az általunk használt rendszerben két párhuzamos oszlop található, melyekből külön-külön gyűjtöttük a frakciókat az egymással összehasonlítható vizsgálatok érdekében. Az

üvegoszlopok 100 mm hosszúak és 6.6 mm átmérőjűek, melyeket alul és felül 30 µm-es szűrővel ellátott dugattyúkkal zárhatunk le. Mindkét oszlop saját vízköpennyel és saját termosztáttal rendelkezik, így hőmérsékleteiket tetszőlegesen változtathatjuk. Egy kapcsolót elfordítva médium helyett tesztminta vezethető az oszlopra. A tápoldatot tartalmazó lombikból külön erre a célra szolgáló kimenetből - például a tesztminta hígítására - médium nyerhető. (2.4.a. és b. ábrák)



2.4.b ábra

A perfúziós rendszer fotója.

- 1: A perfúziós oszlopokban látható a sephadex géloszlop, amely a mirigydarabokat tartalmazza.
- 2: Szövettenyésztő médium. 3: Perisztaltikus pumpa. 4: Mintagyűjtő. A rendszer részletes leírását lásd a szövegben (2.4 és 2.5).

2.5 A perfúziós kísérletek

A médiumot minden kísérlet előtt frissen készítettük el. Másfél liter bidesztillált vízhez (BDV) 1.5 üveg Médium 199-et, 3.3 gramm nátrium-bikarbonátot, 1.5 gramm bovin szérumalbumint és egy ampulla (80mg-os) gentamycint adtunk. Másfél óra keverés után az oldatot egy 0.45 µm-es Millipore szűrőn át egy gömblombikba szűrtük, mely a rendszer vízfürdőjébe került, és a már említett gázkeveréket vezettük bele.

Kísérleteinkhez az állatok dekapitálását követően a koponyatetőt eltávolítva a gombostűfej méretű tobozmirigyét kivettük, majd - médiumos közegben - steril szikével négy-hat darabra vágtuk fel. Mindkét perifúziós oszlopba több állat mirigyéből is helyeztünk el darabokat (kikelés után 2 állat, embrióknál kortól függően 4-8 állat mirigyeit használtuk, hogy megközelítőleg azonos mennyiségű szövetmassza kerüljön az oszlopokba). A szövetdarabokat Sephadex G10-el keverve töltöttük az oszlopokba. A leolást követően 10 percen belül elkészültek a perifúziós oszlopok, majd újabb 10 percen belül megkezdtük a mintagyűjtést. A kísérletek rendszerint 4 napig tartottak.

Vizsgálataink egy részében a környezeti tényezők állandóak voltak, és elegendő volt a megvilágítást, valamint a termosztátokat egyszer, a kísérlet elején beállítani. Máskor meghatározott időpontokban változtattuk a fényt, illetve a hőmérséklet paramétereit.

2.6 A frakciók hormontartalmának meghatározása

A gyűjtött médiumfrakciók MT koncentrációjának meghatározása radioimmunoassay (RIA) módszerrel történt. Ehhez a laboratóriumunkban nyulakban előállított, nagy titerű és specifikitású MT-antiszérumot (Rekasi és tsai. 1991) használtunk fel.

A módszer rövid leírása:

2.6.1. Mintavétel: Minden médiumot tartalmazó csőből kétszer vettünk mintát, és ezeket két különböző RIA csőbe mértük (duplikátumok). Egy RIA csőbe a következő anyagok kerültek: 200 µl minta, MT-antiszérum (7nl/cső, 1/100,000-es végső hígításban), 10,000 count per minute aktivitásnyi tracer (átlagosan 125 fmol, O-methyl-3H/melatonin, Amersham, TRK 798). Az elegyet assay-pufferrel (0.5 M foszfát-puffer fiziológias sóoldatban, 1g/l nátrium-azid és 1 g/l zselatin hozzáadásával) 700 µl végtérfogatra egészítettük ki.

A standard görbe felvételéhez kilenc lépéses hígítási sort készítettünk három példányban. Minden lépés 1:2 arányú hígítást jelentett, így a sor a 8.6 pmol/cső-től a 30 fmol/cső-ig terjedő koncentrációkat ölelte fel. Ezek mindegyikéből szintén 200 µl-eket RIA csövekbe mértünk, amelyek a korábban leírtakkal azonos anyagokat tartalmaztak.

2.6.2. Inkubálás: A RIA mintákat és a hígítási sor csöveit is 4 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk.

2.6.3. Szeparálás: Ezt követően minden csőhöz 250 µl-nyi jéghideg szén (dextran coated charcoal - Sigma, C5260) adtunk és az elegyeket 20 percen át jeges vízfürdőben "ráztuk össze", majd a csöveket lecentrifugáltunk (3000G-n és 4 °C-on, 20 percig). A felülúszókat szcintillációs vial-ekbe mértük át.

2.6.4. Mérés: Minden vial-hez egy ml dioxánt és 5 ml szcintillációs koktélt (4.3 g PPO és 42 mg POPOP 1 liter toluolban) kevertünk. A radioaktivitást szcintillációs béta counter-el detektáltuk (Beckman, LS-100C).

2.7 Az eredmények értékelése

A standard görbe minden pontját a három hígítási sor megfelelő pontjainak átlagai alapján vettük fel. A minták MT koncentrációját azok radioaktivitása alapján a standard görbéből interpolálva határoztuk meg. A minta-duplikátumok és standard sor-triplikátumok RIA eredményeinek kvantitatív elemzését az intézetünkben erre a célra készült speciális RIA (RIA32 - Csernus) programmal végeztük. A program az assay megbízhatóságát és minőségét is értékelte, szükség esetén az egész assay-t megismételtük. A MT koncentrációk meghatározását és az eredmények ábrázolását a Superfusion Analysis (SUP32 3.10 - Csernus) programmal végeztük el.

Az intraassay koefficiens, azaz az azonos (kontroll) minták egy assay-n belüli újramérésének eltéréseit kifejező hányados (a mérések standard deviációjának és átlagának a százalékban kifejezett hányadosa) 5-6 %-osnak bizonyult. Az interassay koefficiens, melynek meghatározásához a kontroll mintákat különböző assay-kben mérjük újra, 7-8 %-os volt (szintén a standard deviáció és az átlag hányadosának százszorososa). Mindkét érték megfelelt az irodalomban általánosan elfogadott 10% alatti célértéknek. A módszer szenzitivitása 80 pmol/l, ami nagyságrendekkel kisebb a mért legalacsonyabb koncentrációnál.

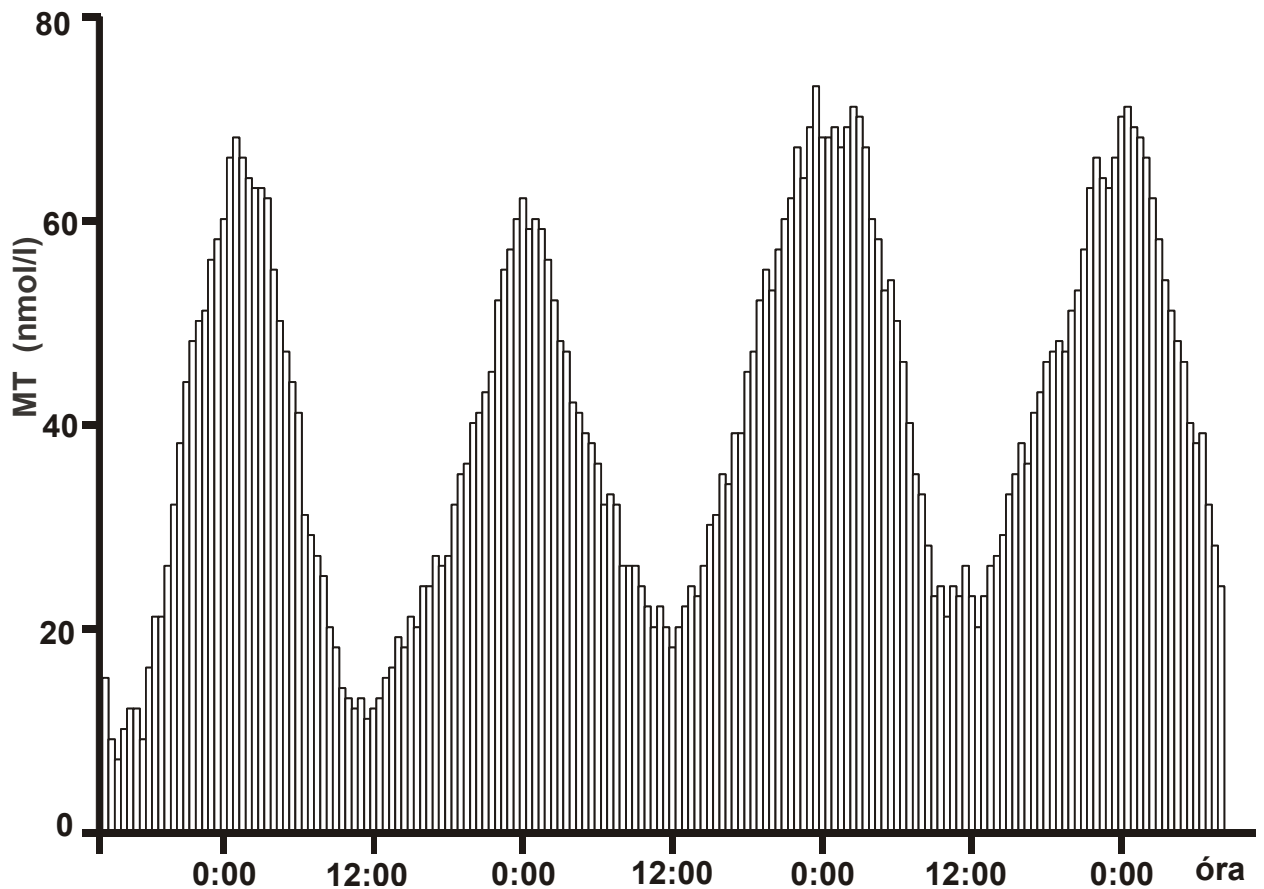
Az eredmények értékelését a grafikus ábrázolás nagymértékben megkönnyítette. Grafikonjaink vízszintes tengelyén az egy kísérletben egymás után gyűjtött, félórás frakciókat tüntettük fel (minden egyes oszlop egy mintának felel meg). Az egyszerűbb áttekinthetőség kedvéért és a circadian ritmus ellemzésének megkönnyítése céljából a tengelyen nem a frakciók (minták) sorszámát, hanem gyűjtésüknek időpontjait jelöltük meg (CET idő szerint). A függőleges tengely, azaz az oszlopok magassága pedig az egyes mintákban mért MT koncentrációt ábrázolja nmol/l-ben.

Ezen koncentrációk abszolút számértéke tulajdonképpen nem lényeges, csupán arról hordoz információt, hogy az adott perifúziós oszlopba milyen számú túlélő sejt került. Ezért a különböző görbéken látható MT koncentrációkban akár jelentős eltérések is lehetnek. Kutatásunk szempontjából az volt lényeges, hogy egy kísérleten belül az X tengely mentén haladva ezek a koncentrációk milyen ütemben változnak, hol, azaz mikor láthatunk maximális illetve minimális értékeket és ezek hogyan váltakoznak. Ezek a változások a MT konkrét mennyiségétől függetlenül a különböző kísérletekben is összehasonlíthatónak bizonyultak. A dolgozatban bemutatott minden ábra 3-4, azonos körülmények között elvégzett, egybevágó eredménnyel rendelkező kísérletet reprezentál.

3. Eredmények

3.1. A felnőtt csirke tobozmirigy *in vitro* fényérzékenységének vizsgálata

Felnőtt csirkéből származó tobozmirigyeket a perifúziós rendszer oszlopaiba helyeztük, ahol állandó hőmérséklet (37 °C) alatt, sötét környezetben 4 napig monitoroztuk a MT szekréciónak. A hormontermelés circadian ritmusban történt, a hormonkoncentráció maximális értékei (csúcsok) éjjel körül jelentkeztek (3.1.a ábra).

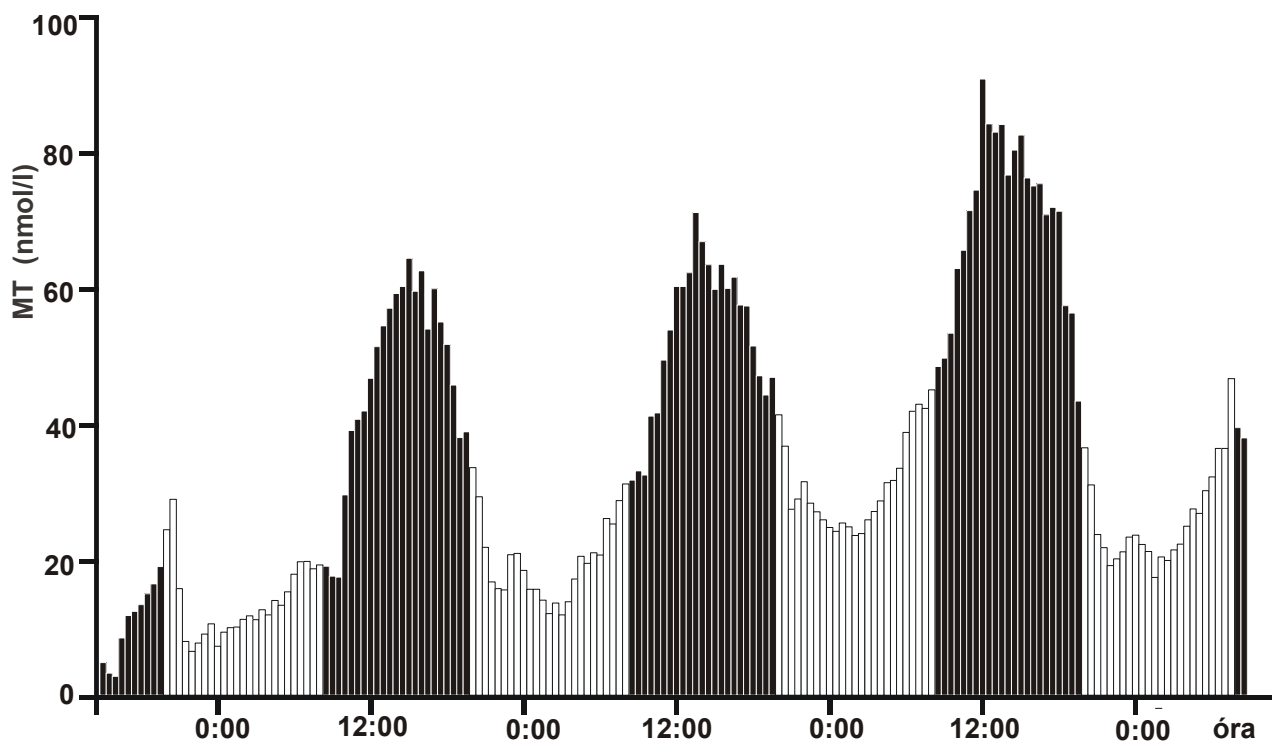


3.1.a ábra

Felnőtt csirke tobozmirigy *in vitro* MT szekréciónak állandó sötétben.

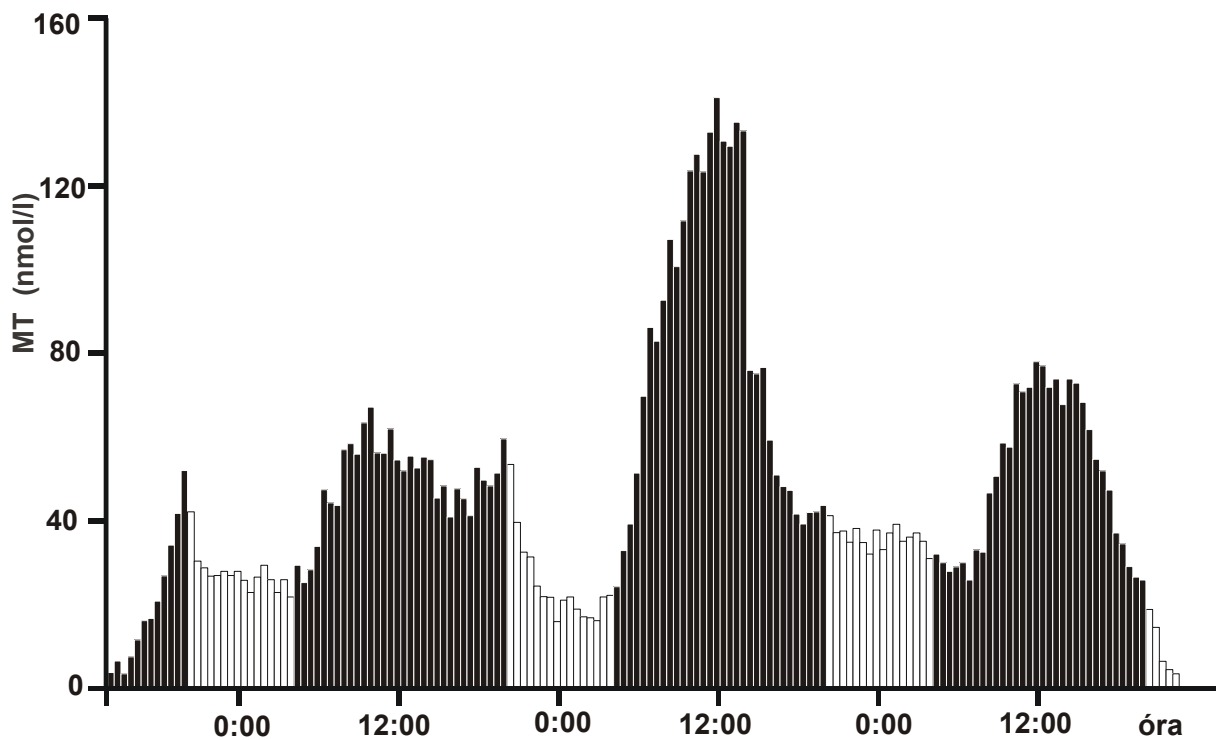
A grafikon vízszintes tengelyén az időt (CET óraállítás), a függőleges tengelyén az egymás után gyűjtött, 30 perces minták MT tartalmát (nmol/l) ábrázoltuk.

Fordított megvilágítás (20.00-08.00: fény, 600 lux intenzitás) alatt tartott tobozmirigyek *in vitro* MT ritmusának fázisa megfordult: a csúcsok a koradélutáni órákban (az egymást követő napokon 15.00, 14.00 majd 12.00 órákor) jelentek meg, míg a szekréciónak éjjel körül volt minimális (3.1.b ábra).



3.1.b ábra

Felnőtt csirke tobozmirigy *in vitro* MT szekréciója fordított megvilágításban (600 lux). A grafikon vízszintes tengelyén az időt (CET órállás), a függőleges tengelyén az egymás után gyűjtött, 30 perces minták MT tartalmát (nmol/l) ábrázoltuk. A világos oszlopok jelölik a megvilágítás óráit (20:00-08:00).

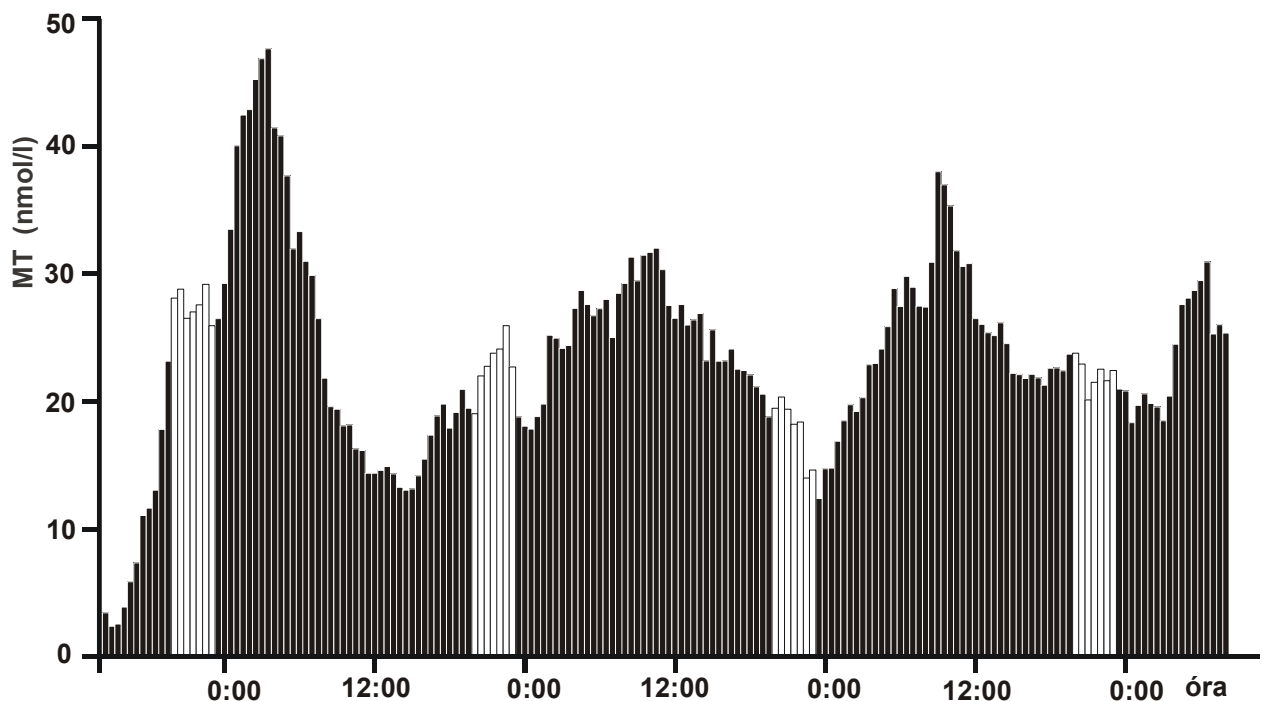


3.1.c ábra

Felnőtt csirke tobozmirigy *in vitro* MT szekréciója fordított megvilágításban (10 lux). A grafikon vízszintes tengelyén az időt (CET órállás), a függőleges tengelyén az egymás után gyűjtött, 30 perces minták MT tartalmát (nmol/l) ábrázoltuk. A világos oszlopok jelölik a megvilágítás óráit (20:00-04:00).

Hasonló eredményt kaptunk, ha az ismétlődő megvilágítás időtartamát 8 órára (20.00-04.00), intenzitását mindössze 10 lux-ra csökkentettük (**3.1.c ábra**)

Amennyiben az alacsony intenzitású (10 lux) megvilágítás időtartamát napi 3 órára (20.00-23.00) rövidítettük, a MT ritmus fázisának megfordulása láthatóan lassabb lett, mint az előző kísérletekben (**3.1.d ábra**, vedd össze: **3.1.b** és **c** ábrákkal). Az első MT csúcs 04.00-ra tolódott el, a további csúcsok 10.00 körül jelentek meg. A második naptól kiszélesedett csúcsokat figyelhetünk meg, a ritmus amplitúdója a többi kísérlethez képest csökkent.



3.1.d ábra

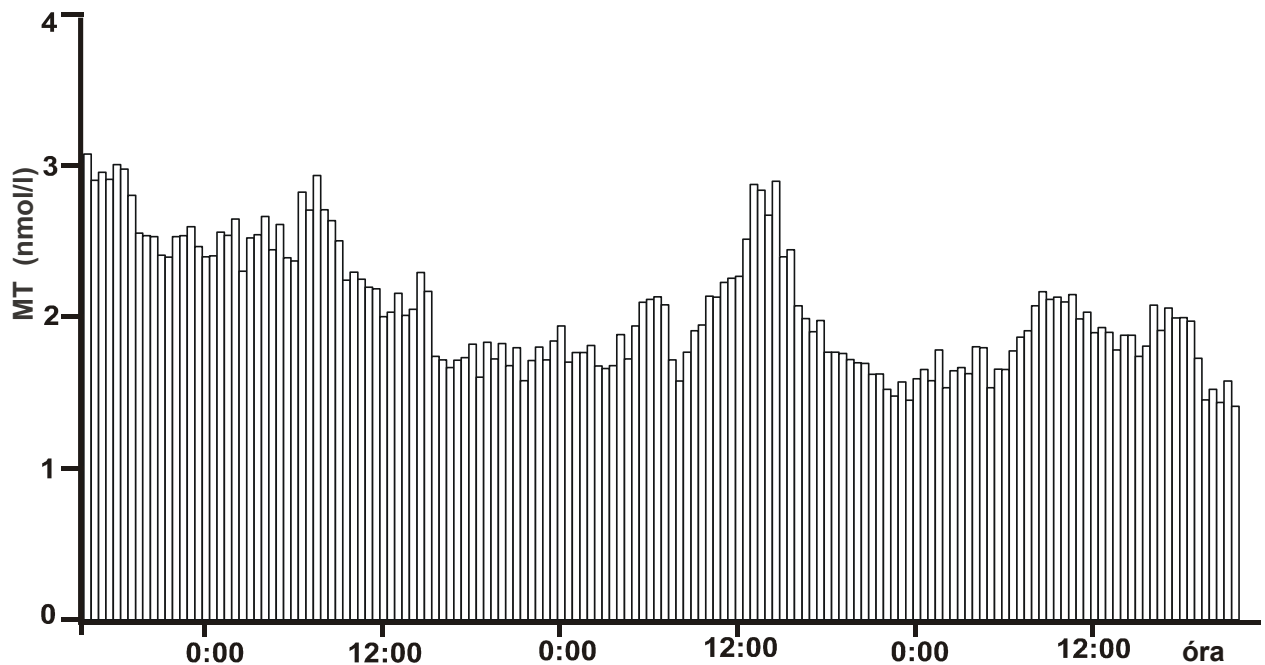
Felnőtt csirke tobozmirigy *in vitro* MT szekréciója ismétlődő, naponta 3 óra hosszú megvilágításban (10 lux). A grafikon vízszintes tengelyén az időt (CET óraállás), a függőleges tengelyén az egymás után gyűjtött, 30 perces minták MT tartalmát (nmol/l) ábrázoltuk. A világos oszlopok jelölik a megvilágítás óráit (20:00-23:00).

3.2. A csirke embrionális tobozmirigy *in vitro* MT szekréciójának vizsgálata

Periodikus ingerektől mentes („Random”) keltetés esetén

Az *in vivo* állandó sötétben, konstans hőmérsékleten és randomizált környezeti ingerek (tojásforgatás) között keltetett embriók tobozmirigyeit az embrionális élet 15. napján

(E15) a perifúziós rendszer oszlopaiba helyeztük (oszloponként 3 feldarabolt mirigyet). Az *in vitro* állandó hőmérséklet alatt és konstans sötétben tartott mirigyek MT szekréciónak csupán epizodikus változásokat figyelhetünk meg, a kísérlet végéig (E20) sem vált ritmikusá (3.2.a ábra).



3.2.a ábra

E15 csirke tobozmirigy *in vitro* MT szekréciónak állandó sötétben, periodikus ingerektől mentes keltetést követően. A grafikon vízszintes tengelyén az időt (CET óráállás), a függőleges tengelyén az egymás után gyűjtött, 30 perces minták MT tartalmát (nmol/l) ábrázoltuk.

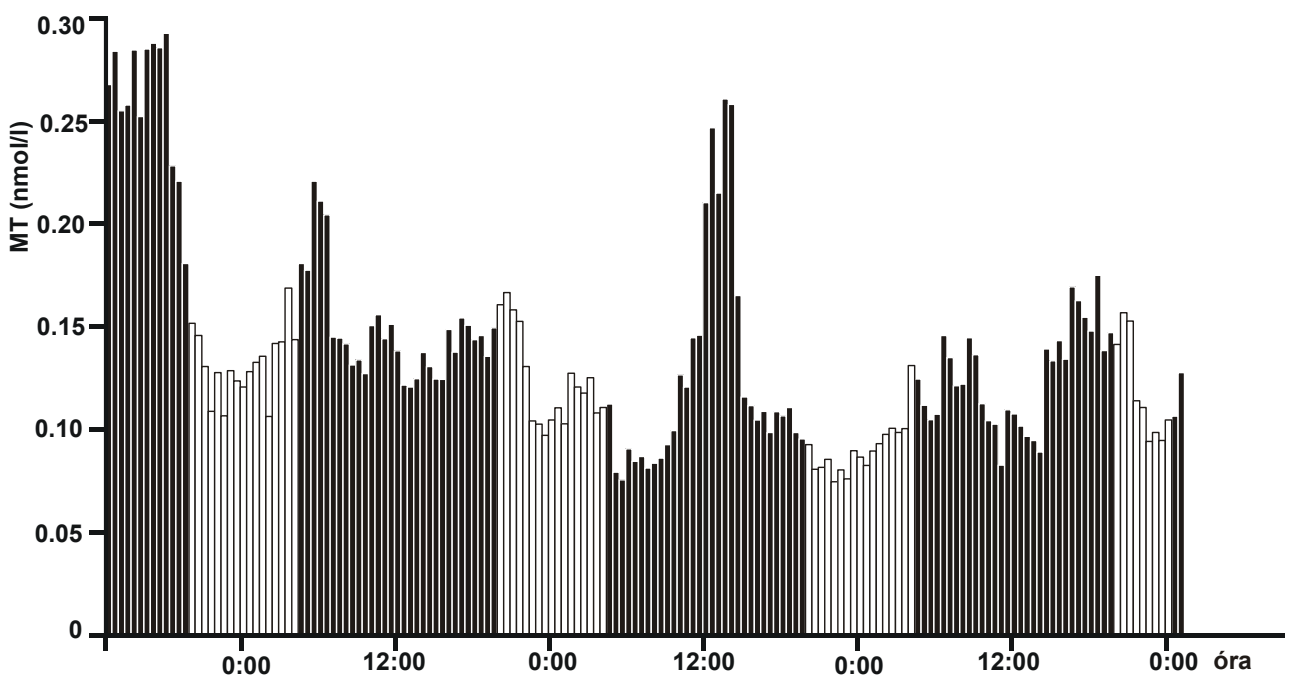
Keltetés napi kétszeri, ritmikusán ismétlődő tojásforgatás mellett

A csirketojásokat állandó sötétben és konstans hőmérsékleten keltettük, de minden nap kétszer, azonos időpontokban (07.00-kor és 17.00-kor) forgattuk meg őket. Az embrionális élet 13. napján (E13) eltávolított tobozmirigyeket a perifúziós rendszer oszlopaiba helyeztük (3db mirigy/oszlop), ahol állandó hőmérséklet alatt, sötét környezetben monitoroztuk a MT szekréciónak E17-ig. A kísérlet kezdetén átmeneti szekréciónak fokozódást követően (3.2.b ábra), a második naptól kezdve a hormontermelés irreguláris volt, szabályos mintázat, ritmus nem volt megfigyelhető. A detektált hormonkoncentráció alacsony, a teljes kísérlet alatt kevesebb volt, mint 1 nmol/l.

A 18. napon explantált (E18), azonos körülménynek között tartott tobozmirigyek (szintén oszloponként 3 mirigy, konstans sötét és 37 °C) *in vitro* szabályos, circadian ritmusban termelték a hormont (**3.2.c ábra**). A kezdeti magasabb MT csúcsot követően a hormon koncentrációja minden nap 07:00 és 09:00 óra között volt maximális. A mért MT koncentrációk az E13 és E16 között detektáltaknál (**3.2.b ábra**) magasabbak voltak (1-10 nmol/l).

Az in vitro megvilágítás hatásai periodikus ingerektől mentes keltetést követően

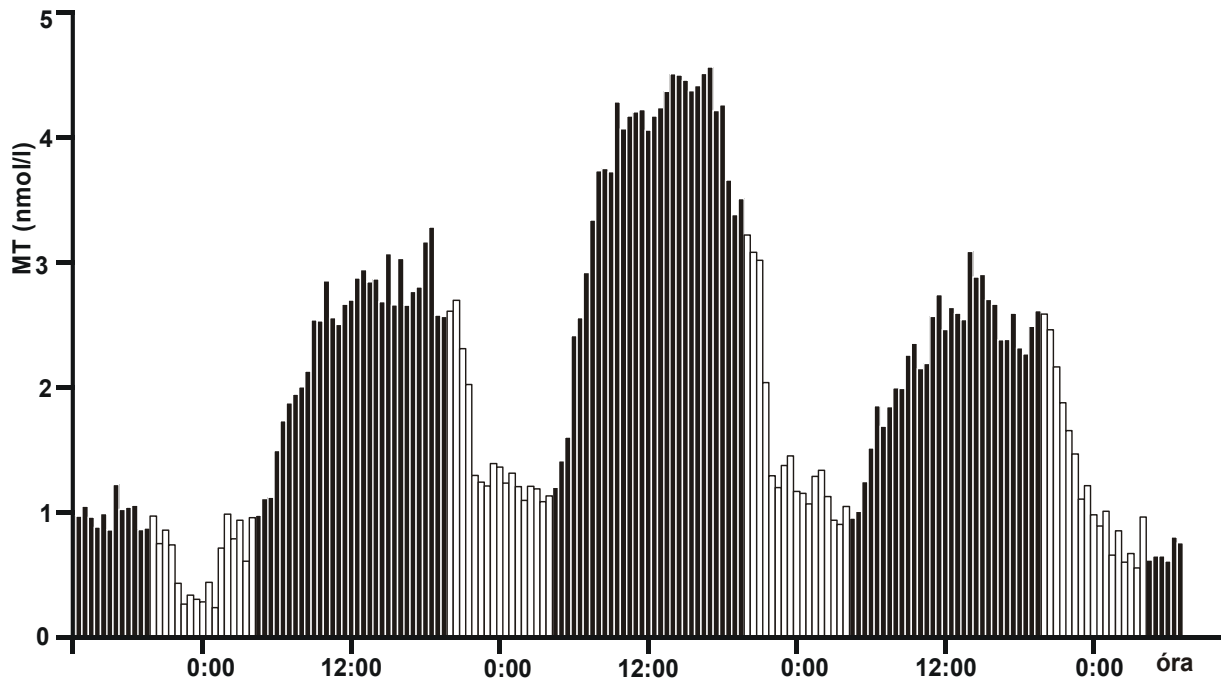
„Random” keltetést követően E13 embriók tobozmirigyeit *in vitro* 600 lux intenzitású fényvel megvilágítottuk naponta 20:00 és 04:00 között. A MT elválasztás a világos periódus alatt enyhén csökkent, de circadian mintázat így sem alakult ki (**3.2.d ábra**).



3.2.d ábra

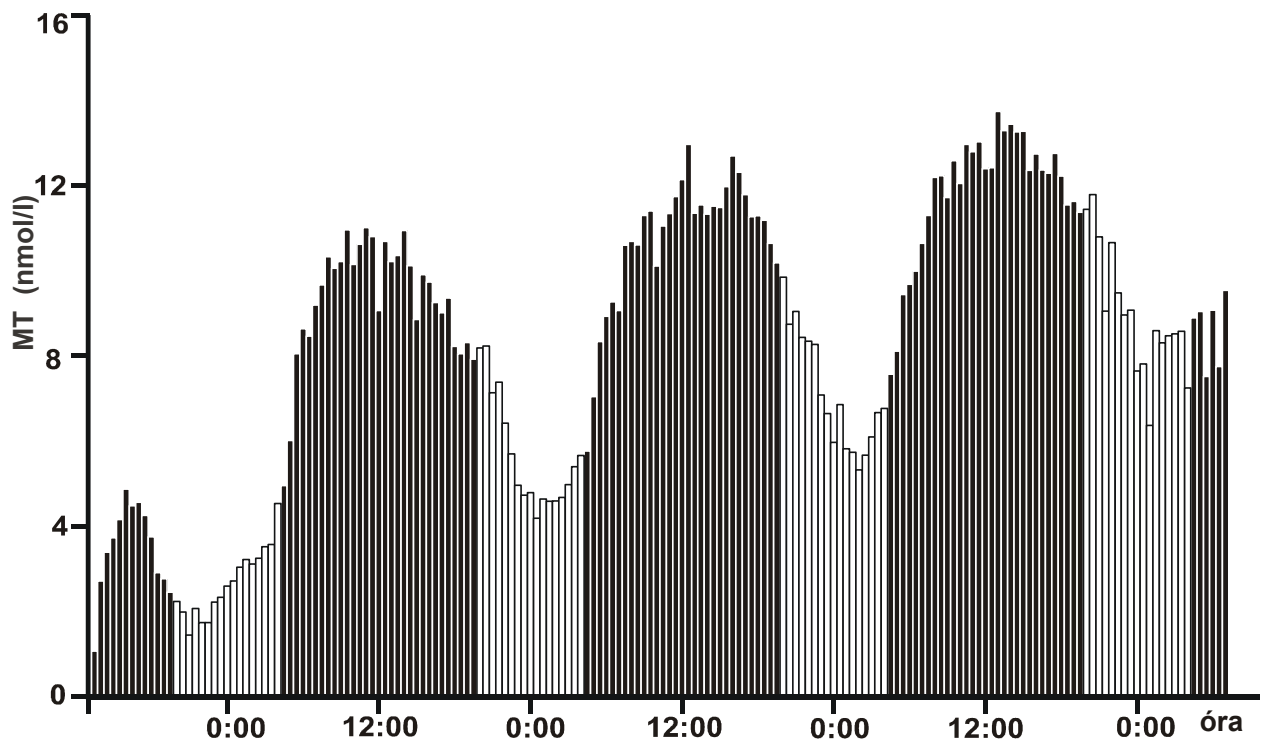
E13 csirke tobozmirigy *in vitro* MT szekrécója fordított megvilágításban (600 lux), periodikus ingerektől mentes keltetést követően. A grafikon vízszintes tengelyén az időt (CET óraállás), a függőleges tengelyén az egymás után gyűjtött, 30 perces minták MT tartalmát (nmol/l) ábrázoltuk. A világos oszlopok jelölik a megvilágítás óráit (20:00-04:00).

Az előző kísérlettel megegyező körülmények között keltetett és tartott E17 mirigyek MT szekrécója circadian ritmusban történt, melynek fázisa a megvilágítás mintázatát követte, a csúcsok 13.00 körül, a sötét órák alatt voltak megfigyelhetőek (**3.2.e ábra**).



3.2.e ábra

E17 csirke tobozmirigy *in vitro* MT szekréciója fordított megvilágításban (600 lux), periodikus ingerektől mentes keltetését követően. A grafikon vízszintes tengelyén az időt (CET óraállás), a függőleges tengelyén az egymás után gyűjtött, 30 perces minták MT tartalmát (nmol/l) ábrázoltuk. A világos oszlopok jelölik a megvilágítás óráit (20:00-04:00).



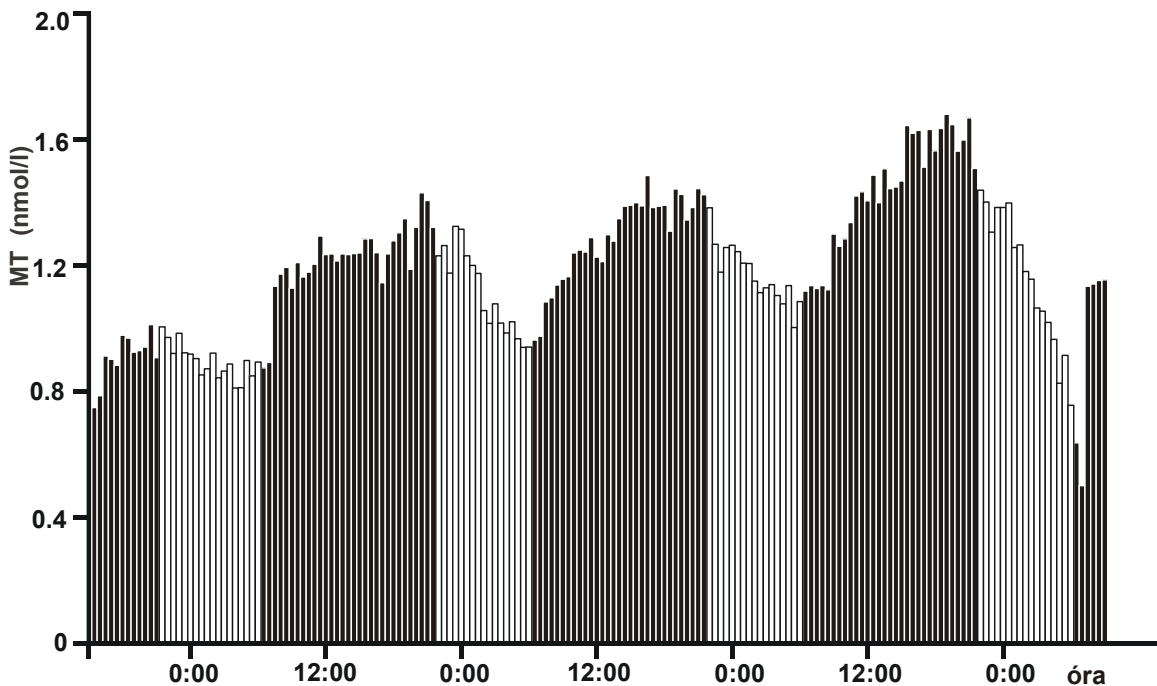
3.2.f ábra

E17 csirke tobozmirigy *in vitro* MT szekréciója fordított megvilágításban (10 lux), periodikus ingerektől mentes keltetését követően. A grafikon vízszintes tengelyén az időt (CET óraállás), a függőleges tengelyén az egymás után gyűjtött, 30 perces minták MT tartalmát (nmol/l) ábrázoltuk. A világos oszlopok jelölik a megvilágítás óráit (20:00-04:00).

E17 korban eltávolított, csirke embrionális tobozmirigyeket a perifúziós rendszerben naponta 8 óra hosszan (20.00-04.00) világítottuk meg, 10 lux intenzitású fénnel. A MT szekréció circadian ritmus szerint történt, a ritmus fázisa a megvilágítást követte: csúcsok a déli órákban voltak megfigyelhetőek (3.2.f ábra).

Az in vitro megvilágítás hatásai periodikus megvilágításban keltetett embriókon

A konstans hőmérsékleten és randomizált környezeti ingerek (tojásforgatás) mellett a 7. embrionális naptól kezdve *in ovo* periodikus, fordított ritmusú (22.00-06.00: fény), 600 lux intenzitású megvilágításban keltetett embriók tobozmirigyzeit E13 napon a perifúziós rendszer oszlopaiba helyeztük. Az *in ovo* megvilágítást *in vitro* is folytattuk. E14-től egy alacsony amplitúdójú circadian ritmushoz hasonlítható szekréciós minta figyelhető meg, melynek amplitúdója a kísérlet során egyre növekedett. Csúcsok 16.00-18.00 között jelentek meg (3.2.g ábra).



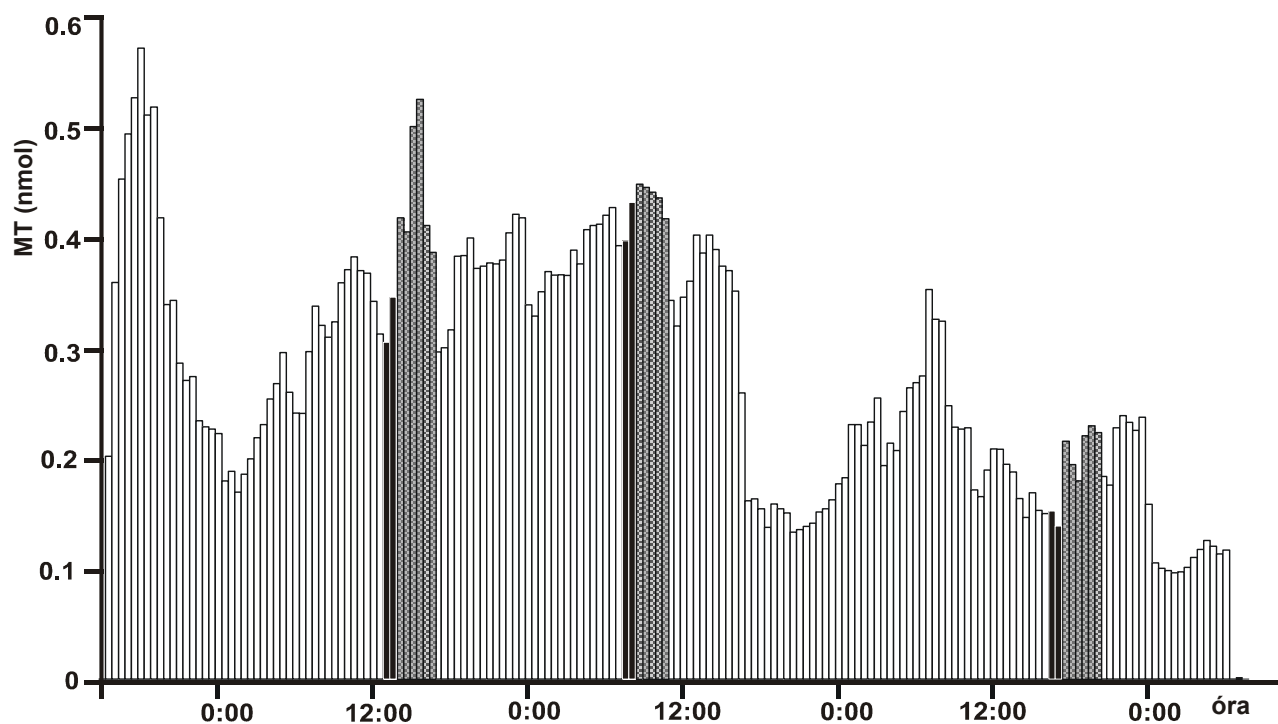
3.2.g ábra

E13 csirke tobozmirigy *in vitro* MT szekréciója fordított megvilágításban (600 lux), *in ovo* alkalmazott fordított megvilágítást követően. A grafikon vízszintes tengelyén az időt (CET óráállás), a függőleges tengelyén az egymás után gyűjtött, 30 perces minták MT tartalmát (nmol/l) ábrázoltuk. A világos oszlopok jelölik a megvilágítás óráit (22:00-06:00).

3.3. Neuropeptidek (PACP, VIP) csirke embrionális tobozmirigy MT szekréciójára gyakorolt hatásának vizsgálata

PACAP in vitro hatásai (ritmikusan ismétlődő tojásforgatással történő keltetést követően)

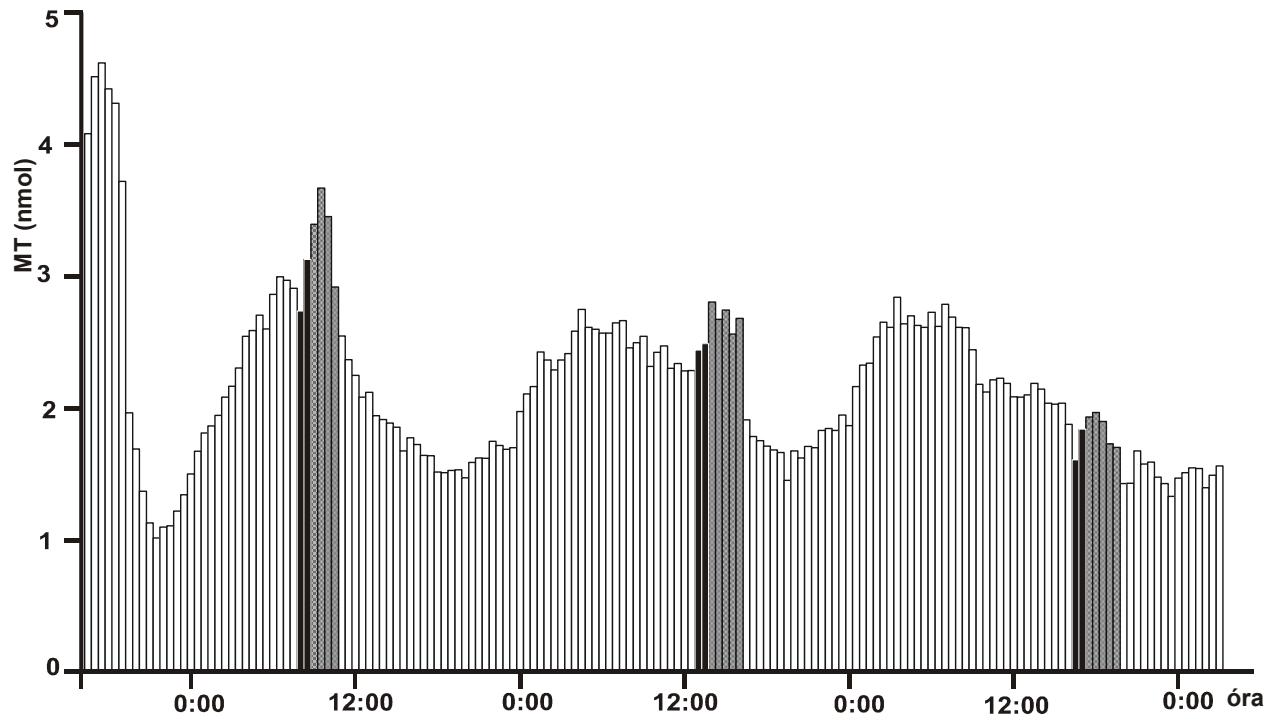
A csirkeembriókat állandó sötétben, konstans hőmérsékleten, de ritmikus, napi kétszeri, tojásforgatás mellett keltettük. A perifúziós rendszerbe helyezett, E13 tobozmirigyek MT szekréciója konstans sötétben, 10 nM PACAP beadását követően átmenetileg (3 órán keresztül) fokozódott (**3.3.a ábra**). A PACAP ingerlésre adott válasz-csúcsok mérete a beadás időzítésétől függött, a legnagyobb amplitúdót a déli órákban (13.00-14.00) történt beadást követően tapasztaltunk. Az átmeneti szekréciófokozódásoktól eltekintve a hormontermelés a **3.2.b** ábrához nagymértékben hasonlított: a kezdeti csúcsot követően nem figyelhető meg ritmus, szabályosság.



3.3.a ábra

E13 csirke tobozmirigy *in vitro* MT szekréciója konstans sötétben, ritmikusan tojásforgatással történő keltetést követően. A grafikon vízszintes tengelyén az időt (CET órállás), a függőleges tengelyén az egymás után gyűjtött, 30 perces minták MT tartalmát (nmol/l) ábrázoltuk. A fekete oszlopok PACAP (10nM) beadását, a sávozott oszlopok a PACAP ingerlést követő MT szekréciófokozódást jelölik.

Az *in vitro* 10 nM PACAP-al ingerelt, az előző kísérlethez hasonlóan keltetett E18 tobozmirigyekből szintén különböző amplitúdójú MT csúcsokat detektáltunk (**3.3.b ábra**). A délutáni PACAP beadást követő MT válasz az E13-16 mirigyekhez hasonlóan alig volt mérhető. A hormon szekréciója a hasonló korú kontrollal (**3.2.c**) egyezően - circadian ritmusban, reggel 08:00 óra körüli csúcsokkal történt.

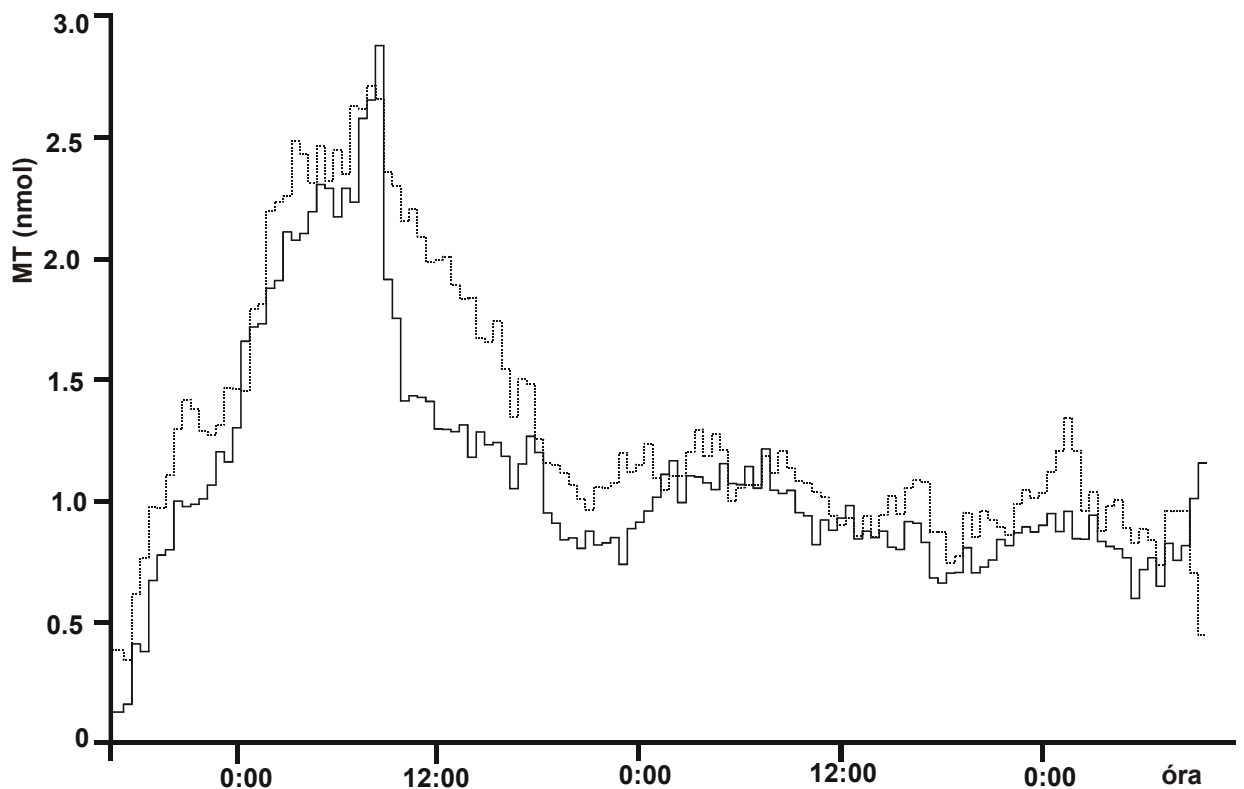


3.3.b ábra

E18 csirke tobozmirigy *in vitro* MT szekréciója konstans sötétben, ritmikus tojásforgatással történő keltetést követően. A grafikon vízszintes tengelyén az időt (CET órállás), a függőleges tengelyén az egymás után gyűjtött, 30 perces minták MT tartalmát (nmol/l) ábrázoltuk. A fekete oszlopok PACAP (10nM) beadását, a sávozott oszlopok a PACAP ingerlést követő MT szekréciófokozódást jelölik.

In ovo PACAP6-38 kezelések hatásának vizsgálata („random” körülmények közötti keltetés esetén)

A tojásokat az embrionális élet 15. napján PACAP6-38-al kezeltük. Az E15 napon kezelt embriók tobozmirigyét E18 korban eltávolítva a perifúziós rendszerben vizsgáltuk. MT ritmus nem volt kimutatható, a szekréció a kontroll mirigyekével teljesen párhuzamos, szabálytalan mintázatot mutatott (**3.3.c ábra**).

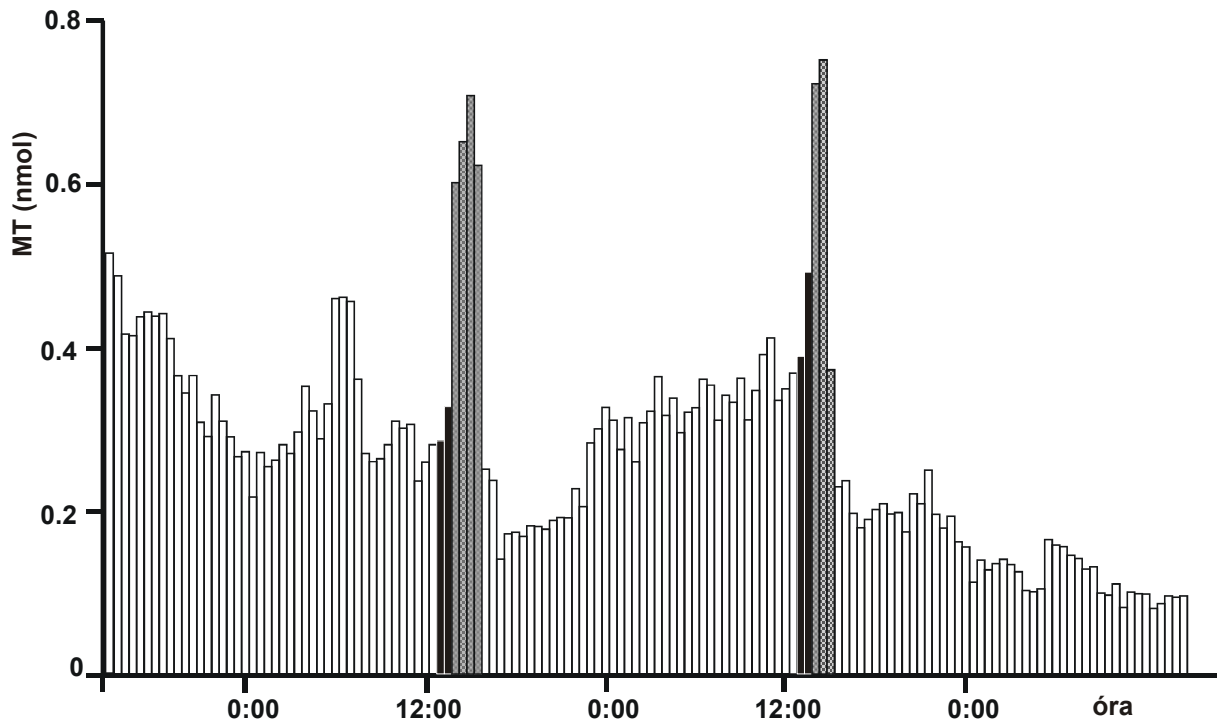


3.3.c ábra

E18 csirke tobozmirigy *in vitro* MT szekréciója konstans sötétben, periodikus ingerektől mentes keltetést követően. A grafikon vízszintes tengelyén az időt (CET óráállás), a függőleges tengelyén az egymás után gyűjtött, 30 perces minták MT tartalmát (nmol/l) ábrázoltuk. A folytonos vonal a 15. embrionális napon *in ovo* PACAP6-38-al kezelt, a pontozott vonal a kontroll állatok tobozmirigyeinek MT szekrécióját mutatja.

In vitro VIP beadás hatásai („random” környezetben történő keltetést követően)

Periodikus ingerektől mentesen keltetett, E13 embriókból explantált tobozmirigyeket a perifúziós rendszerben ismételt 100 nM VIP-el ingereltük. A VIP beadását követően a mirigy hormonszekréciója átmenetileg, néhány órán keresztül fokozódott, de a MT elválasztás összességében szabálytalan maradt, nem mutatott ritmikus változást (3.3.d ábra).



3.3.d ábra

E13 csirke tobozmirigy *in vitro* MT szekréciója konstans sötétben, periodikus ingerektől mentes keltetést követően. A grafikon vízszintes tengelyén az időt (CET óraállás), a függőleges tengelyén az egymás után gyűjtött, 30 perces minták MT tartalmát (nmol/l) ábrázoltuk. A fekete oszlopok a VIP (100nM) beadását, a sávozott oszlopok a VIP ingerlést követő MT szekréciófokozódást jelölik.

4. Az eredmények megbeszélése

4.1 A tobozmirigy fényérzékenységének vizsgálatáról

A legtöbb gerinces állatban a fény a legfontosabb környezeti jel, ami a napi és a szezonális aktivitást a külvilághoz szinkronizálja. Ezen aktivitások jelentős részét a tobozmirigy MT ritmusa kontrollálja. Míg a fényinformáció emlősökben csak a retina – nucleus suprachiasmaticus rendszeren keresztül jut el a tobozmirigyhez, addig madarakban és más nem-emplős gerincesekben közvetlenül is eléri a szervet. A nem-emplős tobozmirigy direkt fényérzékenységén kívül – az emlősökkel szemben – teljes autonómiával is rendelkezik, mivel tartalmaz egy komplett és működő biológiai oszcillátort is a MT szintetizáló apparátus mellett. Ezt bizonyítja az a megfigyelés is, mely szerint a madarak tobozmirigye még *in vitro* állandó sötétben is circadian ritmus szerint termeli a MT-t (**3.1.a ábra**, Csernus és tsai. 1998).

Az *in vitro* MT ritmus fázisát megfelelő megvilágítással módosíthatjuk (Binkley és tsai. 1978; Csernus és tsai. 1998; Takahashi és tsai. 1980). Ezekkel az adatokkal összhangban azt tapasztaltuk, hogy 600 lux intenzitású, fordított megvilágítás esetén a MT ritmus fázisa mindössze 1 ciklus alatt szintén fordítottá, a fényritmusnak megfelelővé vált (**3.1.b ábra**). Ehhez hasonló eredményt kaptunk akkor is, amikor a megvilágítás intenzitása mindössze 10 lux volt (**3.1.c ábra**). Ebben az esetben a görbén az első elcsúsztatott MT csúcs (az első, 12.00-kor jelentkező csúcs) alacsonyabb volt, mint az előző kísérlet azonos csúcsa, ami arra utalhat, hogy a fázisfordulás az alacsonyabb fényintenzitás esetén lassabb.

Amennyiben a megvilágítás hosszát napi 3 órára rövidítettük, 10 luxos fényintenzitás esetén a korábbiaknál még lassabb fázisfordulást tapasztaltunk (**3.1.d ábra**), itt az első sötét nappalon, 12.00-kor még mindig szekréción minimumot láthatunk, csak a következő napra teljesül a fázisfordulás, bár a csúcs akkor is inkább korábban, 9.00 és 10.00 között jelentkezik. A kiszélesedett csúcsok és a csökkent amplitúdó arra utal, hogy a mirigyben található különböző oszcillátor-egységek (azaz feltehetően a különböző sejtek) már eltérően érzékenyek erre a megvilágításra; azaz egyes egységek követik az új

fény ritmust, míg mások nem, vagy csak lassabban teszik ugyanezt, ezért aktivitásuk összességében kissé deszinkronizálódik. Ebből arra következtethetünk, hogy a 3 órás, 10 luxos fényinger a tobozmirigy *in vitro* fényérzékenységének alsó határát közelíti.

Mivel a perifúziós rendszer oszlopaiban a tobozmirigy darabjai Sephadex G-10 gélszemcsékkel keverten helyezkednek el, és a géloszlopon piros színű (phenol-red) médium áramlik át, a mirigysejteket elérő fény intenzitása az oszlop felszínén mértnél alacsonyabb. Ezen kívül a médium elsősorban a fehér fényből a kék komponenst nyeli el, azt, amelyre a pinealocyták leginkább érzékenyek (Csernus és tsai. 1999; Okano és tsai. 1994). Mindezek alapján feltételezhető, hogy a csirke tobozmirigy sejtjei a 10 luxnál kisebb fényintenzitásra is érzékenyek. Bár kísérleti rendszerünkben a halak által még érzékelt extrém alacsony fényintenzitásokat (0.0024 lux, (Migaud és tsai. 2006)) technikailag nem tudtuk vizsgálni, elsőként bizonyítottuk, hogy a csirke pinealocyták is közvetlenül érzékenyek a rendkívül alacsony, néhány lux intenzitású megvilágításra is. Ez az érzékenység valószínűleg a tobozmirigy és a retina szoros evolúciós rokonságára utal (Mano és Fukada 2007).

Gwinner *in vivo* vizsgálataiból nem volt egyértelmű, hogy a 10 lux intenzitású fény az embriók retináján át, vagy esetleg direkt, a tobozmirigyen keresztül hatott a tojásokra (Gwinner és tsai. 1997). A 17. embrionális napon eltávolított tobozmirigyeken 10 luxos megvilágítással végzett kísérleteink (**3.2.f ábra**) azt bizonyították, hogy a csirke embriók tobozmirigyének MT szekréciója direkt, a retinától független, külső megvilágítással is befolyásolható. A szerv fényérzékenysége már az embrionális élet 17 napján is a felnőtt állatokéhoz hasonló, tehát az érzékelő apparátus már teljesen kifejlődött és működőképes.

4.2 Az embrionális MT szekréció változásairól

Korábbi kutatások kimutatták, hogy a MT ritmus madarakban az emlősöknél korábban, már az embrionális élet során megjelenik (Zeman és tsai. 1999). A ritmikus MT szekréció hörsögökben a születés utáni 10. napon, emberben csak a 2. hónapban alakul ki (Kaufman és Menaker 1991; Mirmiran és tsai. 1992). Emlősökben az anyai ritmus határozza meg a magzat, majd az újszülött ritmikus működéseit. Feltehetően éppen az

anyai ritmus hiánya miatt szükséges, hogy madarakban már *in ovo* kifejlődjön az önálló ritmus, ezzel biztosítva, hogy kikelés után az állat alkalmazkodni tudjon környezetéhez.

Bár több szerző kimutatta, hogy csirke embriókban normál megvilágítás mellett *in vivo* és *in vitro* is mérhető különbségek vannak a nappali és az éjszakai MT szekréció, valamint AANAT aktivitások között (Herichova és tsai. 2001; Zeman és Illnerova 1990; Zeman és tsai. 1992; Zeman és tsai. 1999), a circadian MT ritmus kialakulásának idejéről és feltételeiről hiányosak voltak ismereteink. Előkísérleteink során kiderítettük, hogy a legkorábban a 13. embrionális napon (E13) tudtuk a tobozmirigyét egyértelműen elkülöníteni és nagy biztonsággal, gyorsan eltávolítani. A **3.2.a ábrán** bemutatott kísérleti eredmény alapján megállapíthatjuk, hogy amennyiben a csirke tobozmirigyét fejlődése során nem érik periodikus környezeti ingerek (fény, hőmérsékletváltozás, mechanikai ingerek, stb.), az embrionális élet során a MT szekréció nem válik ritmikussá. Ez az eredmény megfelel azoknak az irodalmi adatoknak is, ahol a szerzők állandó sötétben tartott embriók esetén nem találtak eltérést a különböző napszakok MT koncentrációi között (Akasaka és tsai. 1995).

Egyes kísérleteinkben megfigyeltük, hogy amennyiben manuálisan, naponta kétszer, mindig azonos időpontokban forgatjuk a tojásokat, akkor az E18 napon explantált mirigyek esetében circadian MT ritmus jelenik meg (**3.2.c ábra**). Az ennél fiatalabb tobozmirigyeknél (E17-ig) *in vitro* nem tapasztaltunk a ritmikus változást a hormon szintjében (**3.2.b ábra**). Ezekből az adatokból arra következtethetünk, hogy a tojásokat circadian ritmusban érő mechanikai (és/vagy gravitációs) ingerek is elegendő stimulációt jelentenek a MT ritmus kialakulásához. Mivel azonban ismételt stimuláció esetén sem válik ritmikussá a tobozmirigy hormontermelése E17 előtt, feltételezhető, hogy az oszcillátor-mechanizmus kifejlődése, illetve ennek és a MT szintézis kapcsolatának kialakulása E16 és E17 között történik. Lamosova és társai statikus rendszerben történő vizsgálatait alapján a ritmus megjelenésének idejét illetően hasonló következtetésekre jutottak (Lamosova és tsai. 1995).

Mivel a legtöbb szerző normál megvilágításban (nappal fény, éjszaka sötét környezet) tartott embriók esetén tapasztalt változásokat a MT szintézisben (Lamosova és tsai. 1995; Zeman és tsai. 1999), a periodikus megvilágításról is feltételezhető, hogy elősegíti a ritmus kialakulását. A tobozmirigy fotopigmentjének, a pinopsinnak már E8 napon

kimutatták a jelenlétét fűrjben (Yamao és tsai. 1999). Szintén ebben a fajban, E13 korban a pinealocytákban már érett csap és pálcika típusú fotoreceptorokat írtak le (Araki és tsai. 1992), így ebben a korban már működhet a fényérzékelés. A különböző korú embrionális tobozmirigyek *in vitro* periodikus megvilágítása esetén a ritmusos tojásforgatásnál tapasztaltakhoz hasonló eredményt kaptunk; MT ritmus csak E17 után jelent meg (**3.2.d** és **3.2.e ábrák**). Ez az adat is a korábbi következtetésünket támasztja alá, miszerint E16 és E18 között válik a tobozmirigy éretté a circadian MT ritmus kialakításához. Ezen kívül kimondhatjuk, hogy a mirigy E14-től a megvilágítást már *in vitro* is érzékeli (**3.2.d ábra**), illetve, ahogy azt már korábban kifejtettük, E17-től a felnőtt állatokéhoz hasonló mértékű fényérzékenység tapasztalható (**3.2.f ábra**).

Kísérletsorozatunkban megvizsgáltuk az *in ovo* alkalmazott periodikus megvilágítás hatásait is. Ahogy azt az előzőekben bemutattuk, ha *in ovo* standard körülményeket alkalmazunk, és *in vitro* periodikusan megvilágítjuk az E13 mirigydarabokat tartalmazó oszlopokat, valódi circadian MT ritmus nem jelenik meg (**3.2.d.ábra**). Azonban abban az esetben, ha E8-től *in ovo* periodikus megvilágítás alatt keltettük a tojásokat, akkor a perifúziós rendszerben (folytatva az *in ovo* megvilágítást) már E13-tól is megfigyelhető circadian MT termelés (**3.2.g ábra**). Tehát az *in ovo* alkalmazott periodikus megvilágítás előbbre hozza a circadian MT ritmus megjelenését. Mivel kotlás közben a tojásokat érik ritmikus környezeti változások, következtetésünk megfordítható; periodikus ingerek nélkül a ritmus fejlődése, illetve a tobozmirigyben található oszcillátorok szinkronizációja késik (**1. táblázat**). Ehhez hasonló konklúzióra vezettek a zebrahal embriókkal végzett kutatások is, ahol a circadian óra beindulásának feltétele szintén a környezeti fényviszonyokban végbemenő változás volt (Kazimi és Cahill, 1999; Vuilleumier és tsai., 2006).

	<i>in ovo</i>	<i>in vitro</i>	E13	E17	
ritmikus megvilágítás	-	-	-	-	ritmikus MT szekréció
	-	+	-	+	
	+	-	-	+	
	+	+	+	+	

1. táblázat

A környezeti megvilágítás és a circadian ritmus kialakulása közötti kapcsolat összefoglalása

A piros +(pozítív) jel esetén a kísérlet *in ovo* és/vagy *in vitro* része circadian ritmusú megvilágításban, piros -(negatív) jel esetén állandó sötétben zajlott. A kék + jel a MT szekréció ritmikus jellegét, a kék - annak hiányát jelzi. E13 és E17 az az embrionális életkor, amikor a perifúzió kezdődött. E13-korban csak akkor jelent meg MT ritmus, ha mind a keltetés, mind az *in vitro* kísérlet alatt ritmikus fényviszonyokat biztosítottunk. Ezzel szemben E17 kortól már bármely időzítésben történt ciklikus megvilágítás elegendő a hormon periodikus elválasztásának megjelenéséhez.

Az **1. táblázat** összefoglalja a ciklikus környezeti megvilágítás (és ezen keresztül a ritmikus külvilági ingerek) valamint a circadian MT szekréció fejlődésének kapcsolatát. Leolvasható, hogy E13 naptól kezdve csak akkor tapasztalunk ritmust, ha már a tojást is periódikus fényingerek érik, illetve ha ezek *in vitro* is folytatódnak. Ha azonban összehasonlítjuk ezt a korai ritmust (**3.2.g ábra**) a más kísérletekben vizsgált, idősebb embriók tobozmirigyének MT ritmusával (**3.2.c, 3.2.e és 3.2.f ábrák**), szembetűnik, hogy az E13 naptól „kikényszerített” ritmus amplitúdója kisebb. Továbbá ennél a korai ritmusnál a megvilágított órákat nem előzi meg szekréció csökkenés, és a sötét órákat sem előzi meg növekedés, míg ezek a változások idősebb (legalább E17) embrióknál az önálló, automata oszcilláció egyértelmű jelei (lásd pl. **3.2.f ábra**). Mindezek a megfigyelések azt sejtetik, hogy a korai, E17 kor előtti MT „ritmus” még nem egy a megvilágítás által szinkronizált, valódi oszcilláció, sokkal inkább a fény MT szintézisre gyakorolt gátló hatásának jele.

Ezzel szemben a 17. embrionális naptól kezdve a ritmus már egyértelmű állandó sötétben is (**3.2.c ábra**), és ahogy az **1. táblázatból** látható, megjelenik minden esetben, ha a mirigyet valamikor (akár a kísérlet előtt *in ovo*, akár a kísérlet alatt *in vitro*) ritmikus megvilágítás ér, sőt akkor is, ha csupán mechanikai ingerek érik (tojásforgatás) periódikusan. Tehát ekkora már a tobozmirigy óramechanizmusa érett, a circadian ritmus megjelenéséhez, elindulásához mindössze valamilyen ritmikus külvilági ingerre van szüksége. Feltehetően ez a külvilági behatás kell ahhoz, hogy a mirigyben található különböző oszcillátorok együtt, összehangolva kezdjenek működni. A későbbiekben tervezzük vizsgálni, hogy mi lehet a legminimálisabb inger, ami már elegendő ehhez a szinkronizációhoz (pl. hányszor kell ismételni ehhez a megvilágítást, és melyik a legkorábbi kor, amikor az *in ovo* ingerlés már a későbbi ritmushoz vezet, stb.).

Összefoglalva a corpus pinealén belüli óramechanizmus megfelelő érettsége és a környezet ritmusának egy jele szükséges a circadian működés kialakulásához. Mivel a napi ritmusokra eleve a külvilág periódikus változásához történő jobb adaptáció eléréséhez van szükség, érthető, hogy ezen környezeti változások részt vesznek a biológiai ritmus kialakításában az egyed szintjén épp úgy, mint ahogy tehték ezt evolúciós szinten is.

4.3 A PACAP és a VIP embrionális MT szekrécióra gyakorolt hatásairól

A PACAP termelődése és aktivitása csirke embriók neuroblastjaiból már E3 és E4 között kimutatható (Erhardt és tsai. 2001), tehát már a korai embrionális fejlődés során megjelenik. Bár ismert, hogy a PACAP felnőtt csirkék tobozmirigyében MT szekréciófokozódást vált ki (Csernus és tsai. 2004; Nakahara és tsai. 2002), az embrionális mirigyre gyakorolt hatásokról nem találtunk irodalmi adatot. Kísérleteink szerint a pinealocyták már E14-től a MT szintézis fokozódásával reagálnak PACAP *in vitro* beadását követően (**3.3.a** és **3.3.b ábrák**). A különböző napszakokban beadott, azonos PACAP dózisokra létrejövő, eltérő méretű MT válaszok arra utalnak, hogy a sejteken belül bizonyos folyamatoknak már vannak napszaki változásai akkor is, amikor a MT még nem ritmikusan termelődik (**3.3.a ábra**). Az átlagosan 2-3 óra hosszú PACAP válaszoktól eltekintve a hormontermelés mintázata teljesen megfelel az azonos körülmények között keltetett, de PACAP-al nem ingerelt embriók mirigyeinek hormontermelésével (**3.2.b** és **3.2.c ábrák**). Nem tapasztaltunk a korai megvilágítás esetén megjelenő „kényszerített” ritmushoz (**3.2.g ábra**) hasonló változásokat. Ebből arra következtethetünk, hogy az embriók korától függetlenül ismételt PACAP expozíció sem változtatta meg a circadian MT ritmus fejlődését.

Mivel az eddig megbeszélte eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a circadian oszcillátor és/vagy az intracelluláris jelátvitel egyes elemei E16 és E17 között fejlődik/nek ki, megvizsgáltuk a 15. embrionális napon történő *in ovo* anti-PACAP kezelés esetleges hatásait. Bár az embrionális élet során alkalmazott hasonló kezelés megváltoztatta a kikelés utáni motoros és szociális viselkedést (Hollósy és tsai. 2004), a **3.3.c ábrán** látható, hogy az általunk kezelt és a kontroll állatok *in vitro* MT szekréciója azonos maradt, tehát – ilyen paraméterek mellett - a PACAP hiánya nem változtat a MT szekréció fejlődésén. Tervezzük vizsgálni, hogy fényel, vagy periodikus mechanikai ingerekkel stimulált embriók esetén a MT ritmus megjelenésére van-e hatása az anti-PACAP kezelésnek.

A PACAP mellett egy másik neuropeptid, a VIP is stimulálja a tobozmirigy MT szintézisét felnőtt csirkék esetén (Nakahara és tsai. 2002; Zatz és tsai. 1990), de esetleges

embrionális hatásairól eddig nem publikáltak adatot. A **3.3.d ábrán** bemutatott eredményünk alapján a VIP-ről is a PACAP-hoz hasonló következtetéseket vonhatunk le; már E14-től érzékenyek a sejtek a VIP-re, de még a naponta azonos időpontban ismételt VIP beadások sem változtatták meg tartósan a MT szekréció mintázatát.

A PACAP-al és VIP-vel kapcsolatos vizsgálataink szerint mindkét neuropeptid receptora és a MT szintézist befolyásoló jelátvitel E14-től (vagy még korábbról) működőképes, de egyik peptid sem játszik lényeges szerepet a circadian MT szekréció fejlődésében. Ez a következtetés összhangban áll azzal a felnőtt csirkék esetében megfigyelt ténnyel, mely szerint a PACAP és a VIP a MT szekréciót átmenetileg stimulálják, de a circadian ritmus fázisát, lefutását egyik sem változtatja meg (Nakahara és tsai. 2002; Zatz és tsai. 1990). Természetesen mindkét neuropeptid esetén még további kísérletek is szükségesek ahhoz, hogy a ritmus szinkronizációjára és/vagy a MT szintézisének kialakulására gyakorolt lehetséges hatásukat kizárjuk, vagy éppen alátámasszuk, feltérképezzük.

4.4 Eredményeink összefoglalása

Kísérletsorozatunkban dinamikus, *in vitro* rendszerben, különböző körülmények között több napig monitoroztuk felnőtt csirkék, illetve csirke embriók tobozmirigyének a MT szintézisét. Legfontosabb eredményeink:

1. Vizsgálataink során számos korábbi *in vivo*, vagy statikus, *in vitro* módszerekkel történt kutatásokban ritka mintavételek „pillanatfelvételei” alapján feltételezett adatokat támasztottunk alá.
2. Elsőként igazoltuk továbbá, hogy a csirke tobozmirigyben megtalálható fotoreceptorok, és ezeken keresztül a circadian MT szekréciónak *in vitro* körülmények között is érzékeny a rendkívül alacsony, néhány lux intenzitású megvilágításra.
3. A fényreceptorok már az E14 naptól közvetítik a megvilágítás MT szekréciónak csökkentő hatását és a szerv fényérzékenysége az embrionális élet 17 napjától a felnőtthez hasonlóan, teljesen kifejlődött.
4. Szintén bizonyítottuk, hogy a circadian MT ritmus kialakulásához periodikus környezeti ingerek jelenléte feltétlenül szükséges.
5. Ezen ingerek széles skálán mozognak: a tojásokat circadian ritmusban érő mechanikai behatások, illetve a ritmikus megvilágítás is elegendő stimulációt jelentenek a MT ritmus kialakulásához.
6. Következtetéseink szerint az oszcillátor-mechanizmus kifejlődésének, illetve ennek és a MT szintézis kapcsolatának kialakulása E16 és E17 között történik, de időpontját a környezeti ingerek befolyásolják.
7. Ebben a fejlődési folyamatban azonban az idegrendszer érésében lényeges neuropeptidok, a PACAP és a VIP nem játszanak jelentős szerepet.

Publikációs lista

A dolgozat témájához közvetlenül kapcsolódó cikkek listája:

Faluhelyi N, Reglődi D, Lengvári I és Csernus V (2004): Development of the circadian melatonin rhythm and the effect of PACAP on melatonin production in the embryonic chicken pineal gland. An in vitro study. - *Regulatory Peptides*, 123, 23-28.
Impact factor: 2.531

Faluhelyi N, Reglődi D és Csernus V (2005): Development of the circadian rhythm and its responsiveness to PACAP in the embryonic chicken pineal gland. - *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1040, 305-309.
Impact factor: 1.971

Faluhelyi N, Reglődi D és Csernus V (2006): The effects of PACAP and VIP on the in vitro melatonin secretion from the embryonic chicken pineal gland. - *Annals N Y Acad Sci.*, 1070, 271-275.
Impact factor: 1.93

Faluhelyi N és Csernus V (2007): The effects of environmental illumination on the in vitro melatonin secretion from the embryonic and adult chicken pineal gland. - *General and Comparative Endocrinology*, 152, 154-158.
Impact factor: 2.562

Csernus VJ, Nagy AD és Faluhelyi N (2007): Development of the rhythmic melatonin secretion in the embryonic chicken pineal gland. - *Gen Comp Endocrinol.* 152, 148-153.
Impact factor: 2.562

Faluhelyi N, Matkovits A, Párniczky A és Csernus V (2009): The *in vitro* and *in ovo* effects of environmental illumination and temperature on the melatonin secretion from the embryonic chicken pineal gland. - *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology: Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1163, 383-385.
Impact factor: 1.731 (2007-es érték)

A dolgozat témájához közvetlenül nem kapcsolódó cikkek listája:

Csernus V, Faluhelyi N és Nagy AD (2005): Features of the circadian clock in the avian pineals. - *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1040, 281-287.
Impact factor: 1.971

Faluhelyi N és Csernus V (2005): The effects of periodic alteration of the temperature on the rhythmic melatonin release of explanted chicken pineals. - *Neuro Endocrinol Lett.*, 26, 503-510.
Impact factor: 1.005

Tudományos előadások nemzetközi kongresszusokon:

Faluhelyi N és Csernus V: A mágneses erőtér és a környezeti hőmérséklet biológiai ritmusokra gyakorolt hatásának vizsgálata. - *1st Symposium of the European Federation of Endocrine Societies*, Gyula, 2002.05.14-17.

Csernus V, Nagy AD és Faluhelyi N: Mechanisms of the circadian clock in the chicken pineal gland. - *21st Conference of European Comparative Endocrinologists*, Bonn, 2002.08.26-30.

Faluhelyi N, Reglődi D, Lengvári I és Csernus V: Development of the circadian melatonin rhythm and the effect of PACAP on melatonin production in the embryonic chicken pineal gland. An in vitro study. - *IBRO 2004 International Workshop on Neuronal Circuits: From Elementary to Complex Functions*, Budapest, 2004.01.29-31.

Csernus V, Faluhelyi N és Nagy AD: Features of the circadian clock in the avian pineals. - *22nd Conference of the European Comparative Endocrinologists*, Uppsala, Sweden, 2004.08.24-28.

Faluhelyi N, Reglődi D és Csernus V.: Development of the circadian rhythm and its responsiveness to PACAP in the embryonic chicken pineal gland. - *22nd Conference of the European Comparative Endocrinologists*, Uppsala, Sweden, 2004.08.24-28.

Faluhelyi N és Csernus V: The effects of subtle changes of illumination on the in vitro melatonin rhythm of chicken pineal gland. - *X. Congress of the European Pineal and Biological Rhythms Society*, Frankfurt, 2005.09.01-05.

Faluhelyi N, Reglődi D és Csernus V: The effects of PACAP and VIP on the in vitro melatonin secretion from the embryonic chicken pineal gland. - *7th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides*, Rouen, France, 2005.09.11-14.

Faluhelyi N és Csernus V.: The effects of PACAP and VIP on the in vitro melatonin secretion from the embryonic chicken pineal gland. - *IBRO 2006 International Workshop on Neuronal Circuits: Regulatory mechanisms of synaptic transmission*, Budapest, 2006. Jan 26-28.

Faluhelyi N és Csernus V: The effects of environmental illumination and PACAP on the *in vitro* melatonin secretion from the embryonic chicken pineal gland. - *23rd Conference of the European Comparative Endocrinologists*, Manchester, UK, 2006. Aug 28 - Sept 2.

Csernus V, Faluhelyi N és Nagy AD: Development of the rhythmic melatonin secretion in the embryonic chicken pineal gland. - *23rd Conference of the European Comparative Endocrinologists*, Manchester, UK, 2006. Aug 28 - Sept 2.

Faluhelyi N, Matkovits A, Párniczky A és Csernus V: The *in vitro* and *in ovo* effects of environmental illumination and temperature on the melatonin secretion from the embryonic chicken pineal gland – *24th Conference of the European Comparative Endocrinologists*, Genoa, Italy, 2008. Sept 2 -6.

Tudományos előadások hazai konferenciákon, kongresszusokon:

Faluhelyi N és Csernus V: A mágneses tér hatása csirke tobozmirigy *in vitro* ritmikus melatonin termelésére. - *XI. Magyar Anatómus Kongresszus*, Debrecen, 2001.06.14-16.

Faluhelyi N és Csernus V: A környezeti hőmérséklet és a circadian melatonin ritmus kapcsolatának vizsgálata. - *A Magyar Anatómus Társaság XII. Kongresszusa*, Budapest, 2003.06.19-21.

Faluhelyi N és Csernus V: A circadian melatonin ritmus kialakulásának és a pacap hatásának vizsgálata csirke embrió tobozmirigyén *in vitro*. - *XII. Sejt és Fejlődésbiológiai Napok*, Pécs, 2004.04.16-18.

Faluhelyi N és Csernus V: A hőmérséklet szerepe csirke tobozmirigy *in vitro* circadian melatonin ritmusának szinkronizálásában. - *XII. Sejt és Fejlődésbiológiai Napok*, Pécs, 2004.04.16-18.

Faluhelyi N és Csernus V: A hőmérséklet szerepe csirke tobozmirigy *in vitro* circadian melatonin ritmusának szinkronizálásában - *A magyar endokrinológiai és anyagcsere társaság XIX. Kongresszusa*, Szolnok, 2004.05.20-22.

Faluhelyi N és Csernus V: The effects of rhythmic environmental factors on the chicken pineal gland *in vitro*. - *Magyar Idegtudományi Társaság 11. Kongresszusa*, Pécs, 2005.01.26-29.

Faluhelyi N és Csernus V: A csirke tobozmirigy fényérzékenységének *in vitro* vizsgálata. - *XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok*, Eger, 2005.04.10-12.

Faluhelyi N és Csernus V: A ritmikus melatonin szekréció kialakulásának *in vitro* vizsgálata embrionális csirke tobozmirigy modellen. - *Magyar Anatómus Társaság XIII. Kongresszusa*, Pécs, 2005.06.17-18.

Faluhelyi N és Csernus V: Kis intenzitású fényváltozások hatása a csirke tobozmirigy *in vitro* melatonin szekréciójára. - *A Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság XX. Kongresszusa*, Debrecen, 2006. május 18-20.

Faluhelyi N és Csernus V: Fényváltozások hatása a csirke tobozmirigy *in vitro* circadian melatonin szekréciójára - *XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok*, Balatonfüred, 2007. április 15-17.

Matkovits A, Faluhelyi N és Csernus V.: A periódikus megvilágítás hatásai csirke embrionális tobozmirigy *in vitro* melatonin szekréciójára. *Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése*, Pécs, 2007. június 8-11.

5. Irodalom

Abolmaali K, Balakrishnan A, Stearns AT, Rounds J, Rhoads DB, Ashley SW és Tavakkolizadeh A (2009): Circadian variation in intestinal dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) expression: a potential mechanism for benefits of 5FU chrono-chemotherapy. *Surgery*. 146 (2), 269-73.

Akasaka K, Nasu T, Katayama T és Murakami N (1995): Development of regulation of melatonin release in pineal cells in chick embryo. *Brain Research* 692, 283-286.

Ansari N, Agathagelidis M, Lee C, Korf HW és von Gall C (2009): Differential maturation of circadian rhythms in clock gene proteins in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis during mouse ontogeny. *Eur J Neurosci*. 29(3), 477-89.

Araki M, Fukada Y, Shichida Y, Yoshizawa T és Tokunaga F (1992): Differentiation of both rod and cone types of photoreceptors in the in vivo and in vitro developing pineal glands of the quail. *Brain Res Dev. Brain Res* 65, 85-92.

Arimura A (1998): Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn.J.Physiol* 48, 301-331.

Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL és Zoran MJ (2005): Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet*. 6(7), 544-56.

Benítez-King G és Antón-Tay F (1993): Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia*. 49 (8), 635-41.

Binkley SA, Riebman JB és Reilly KB (1978): The pineal gland. A biological clock in vitro. *Science* 202, 1198-1200.

Binkley SA, Hryshchyshyn M és Reilly K. (1979): N-acetyltransferase activity responds to environmental lighting in the eye as well as in the pineal gland. *Nature* 281 (5731), 479-81.

Boutin JA (2007): Melatonin binding site MT3 is QR2: state of the art. *J Soc Biol.* 201(1), 97-103

Bretzl H (1903): Botanische Forschungen des Alexanderzuges. B.G. Teubner, Leipzig, 1903, pp. 120-132.

Carrillo-Vico A, Guerrero J, Lardone P és Reiter R (2005): A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 27 (2), 189 – 200.

Chen D, Buchanan GF, Ding JM, Hannibal J és Gillette MU (1999): Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: a pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13468-13473.

Collin JP, Juillard MT és Voisin P (1984): Circadian information and messages in the modified photoreceptor cells of the avian pineal organ: retrospect and prospect. *Ophthalmic Research* 16, 107-113.

Csernus VJ, Rékási Z és Mess B (1994): Differences in hormone release patterns from the anterior pituitary and the pineal gland. *Acta Biol Hung.* 45 (2-4), 207-21

Csernus V, Ghosh M és Mess B (1998): Development and control of the circadian pacemaker for melatonin release in the chicken pineal gland. *General & Comparative Endocrinology* 110, 19-28.

Csernus V, Becher P és Mess B (1999): Wavelength dependency of light-induced changes in rhythmic melatonin secretion from chicken pineal gland in vitro. *Neuroendocrinol.Lett.* 20, 299-304.

Csernus V (2003): Avian pineal - a model for studying mechanisms of circadian rhythms. In *Rhythmic biological processes. The role of the biological clocks.*, pp 119-133. Eds V Csernus & B Mess. Budapest: Dialog Campus Inc.

Csernus V, Józsa R, Reglódi D, Hollósy T, Somogyvári-Vígh A és Arimura A (2004): The effect of PACAP on rhythmic melatonin release of avian pineals. *General & Comparative Endocrinology* 135, 62-69.

- Daikoku S, Hisano S, Kagotani Y J (1992):** Neuronal associations in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrated by immunoelectron microscopy. *Comp Neurol.* 325(4), 559-71.
- Deguchi T (1979):** A circadian oscillator in cultured cells of chicken pineal gland. *Nature.* 282 (5734,) 94-6.
- Deguchi T (1981):** Rhodopsin-like photosensitivity of isolated chicken pineal gland. *Nature* 290, 706-707.
- Dunlap JC (1999):** Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96, 271-290.
- Dodt E (1973):** The parietal eye (pineal and parapineal organs) of lower vertebrates. In *Handbook of Sensory Physiology, Vol. II*, pp 113-140. Ed R Jung. Berlin-Heidelberg-New York: Springer.
- Dodt E és Meissl H (1982):** The pineal and parietal organs of lower vertebrates. *Experientia.* 38 (9), 996-1000.
- Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ és Masana MI (2003):** Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci.* 8, d1093–1108.
- Erhardt NM, Fradinger EA, Cervini LA, Rivier JE és Sherwood NM (2001):** Early expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and activation of its receptor in chick neuroblasts. *Endocrinology* 142, 1616-1625.
- Fahrenkrug J és Emson PC (1982):** Vasoactive intestinal polypeptide: functional aspects. *Br. Med. Bull.* 38 (3), 265–70
- Gwinner E, Zeman M és Klaassen M (1997):** Synchronization by low-amplitude light-dark cycles of 24-hour pineal and plasma melatonin rhythms of hatchling European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Journal of Pineal Research* 23, 176-181.
- Hannibal J, Ding JM, Chen D, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Gillette MU és Mikkelsen JD (1997):** Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *Journal of Neuroscience* 17, 2637-2644.

Hannibal J, Moller M, Ottersen OP és Fahrenkrug J (2000): PACAP and glutamate are co-stored in the retinohypothalamic tract. *Journal of Comparative Neurology* 418, 147-155.

Harrington ME és Hoque S (1997): NPY opposes PACAP phase shifts via receptors different from those involved in NPY phase shifts. *Neuroreport* 8, 2677-2680.

Harrington ME, Hoque S, Hall A, Golombek D és Biello S (1999): Pituitary adenylate cyclase activating peptide phase shifts circadian rhythms in a manner similar to light. *Journal of Neuroscience* 19, 6637-6642.

Herichova I, Zeman M, Mackova M és Griac P (2001): Rhythms of the pineal N-acetyltransferase mRNA and melatonin concentrations during embryonic and post-embryonic development in chicken. *Neuroscience Letters* 298, 123-126.

Hollósy T, Józsa R, Jakab B, Németh J, Lengvári I és Reglődi D (2004): Effects of in ovo treatment with PACAP antagonist on general activity, motor and social behavior of chickens. *Regulatory Peptides* 123, 99-106.

Ibata Y, Takahashi Y, Okamura H, Kawakami F, Terubayashi H, Kubo T és Yanaihara N (1989): Vasoactive intestinal peptide (VIP)-like immunoreactive neurons located in the rat suprachiasmatic nucleus receive a direct retinal projection. *Neurosci Lett.* 97(1-2), 1-5.

Józsa R, Somogyvari-Vígh A, Reglődi D, Hollósy T és Arimura A (2001): Distribution and daily variations of PACAP in the chicken brain. *Peptides* 22, 1371-1377.

Kaufman CM és Menaker M (1991): Ontogeny of the Pineal Response to Norepinephrine. *Journal of Pineal Research* 11, 173-178.

Kalsbeek A, Rijkers M, Vivien-Roels B és Pévet P. (1993): Vasopressin and vasoactive intestinal peptide infused in the paraventricular nucleus of the hypothalamus elevate plasma melatonin levels. *J Pineal Res.* 15(1), 46-52.

Kazimi N és Cahill GM. (1999): Development of a circadian melatonin rhythm in embryonic zebrafish. *Brain Res Dev Brain Res.* 117 (1), 47-52.

Korf HW és Vigh-Teichmann I (1984): Sensory and central nervous elements in the avian pineal organ. *Ophthalmic Research* 16, 96-101.

Korf HW és Wicht H. (1992): Receptor and effector mechanisms in the pineal organ. *Prog Brain Res.* 91, 285-97.

Korf HW (1994): The pineal organ as a component of the biological clock. Phylogenetic and ontogenetic considerations. *Annals of the New York Academy of Sciences* 719, 13-42.

Lamosova D, Zeman M, Mackova M és Gwinner E (1995): Development of rhythmic melatonin synthesis in cultured pineal glands and pineal cells isolated from chick embryo. *Experientia* 51, 970-975.

LeBrun M, Grenier L, Gourde P, Bergeron MG, Labrecque G és Beauchamp D. (1999): Effectiveness and toxicity of gentamicin in an experimental model of pyelonephritis: effect of the time of administration. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(5), 1020-6.

Macías M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A és Acuña-Castroviejo D (2003): Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem.* 270(5), 832-40

Mano H és Fukada Y (2007): A median third eye: pineal gland retraces evolution of vertebrate photoreceptive organs. *Photochem.Photobiol.* 83, 11-18.

Martin JE, McKellar S és Klein DC (1980): Melatonin inhibition of the in vivo pituitary response to luteinizing hormone-releasing hormone in the neonatal rat. *Neuroendocrinology.* 31(1), 13-17.

Martín M, García-Sáenz JA, Maestro De las Casas ML, Vidaurreta M, Puente J, Veganzones S, Rodríguez-Lajusticia L, De la Orden V, Oliva B, De la Torre JC, López-Tarruella S, Casado A, Sastre J és Díaz-Rubio E (2009): Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: timing of blood extraction for analysis. *Anticancer Res.* 29(10), 4185-7.

Melke J, Goubran Botros H, Chaste P, Betancur C, Nygren G, Anckarsäter H, Rastam M, Ståhlberg O, Gillberg IC, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, Fauchereau F, Durand CM, Chevalier F, Drouot X, Collet C, Launay JM, Leboyer M, Gillberg C és

Bourgeron T (2008): Abnormal melatonin synthesis in autism spectrum disorders. *Mol Psychiatry*. 13 (1), 90-98.

Mess B, Rékasi Z, Ghosh M és Csernus V (1996): Regulation of pineal melatonin secretion: comparison between mammals and birds. *Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 47, 313-322.

Migaud H, Taylor JF, Taranger GL, Davie A, Cerda-Reverter JM, Carrillo M, Hansen T és Bromage NR (2006): A comparative ex vivo and in vivo study of day and night perception in teleosts species using the melatonin rhythm. *J.Pineal Res.* 41, 42-52.

Mirmiran M, Kok JH, Boer K és Wolf H (1992): Perinatal development of human circadian rhythms: role of the foetal biological clock. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 16, 371-378.

Moller M és Baeres F. M. M. (2002): The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res* 309, 139–150.

Morgan P J, Barret P, Howell H E és Helliwell R. (1994): Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem. Int.* 24, 101–146.

Nakahara K, Abe Y, Murakami T, Shiota K és Murakami N (2002): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is involved in melatonin release via the specific receptor PACAP-r1, but not in the circadian oscillator, in chick pineal cells. *Brain Research* 939, 19-25.

Navara KJ és Nelson RJ (2007): The dark side of light at night: physiological, epidemiological, and ecological consequences. *J. Pineal Res.* 43 (3), 215–224.

Navarro MDS, Sayalero Marinero MLS és Navarro AS. (2002): Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of ciprofloxacin 250 mg/12 h versus 500 mg/24 h for urinary infections. *J Antimicrob Chemother.* 50(1), 67-72.

Okano T, Yoshizawa T és Fukada Y (1994): Pinopsin is a chicken pineal photoreceptive molecule. *Nature* 372, 94-97.

Okano T és Fukada Y (1997): Phototransduction cascade and circadian oscillator in chicken pineal gland. *Journal of Pineal Research* 22, 145-151.

Panda S, Hogenesch JB és Kay SA (2002): Circadian rhythms from flies to human. *Nature*. 417(6886), 329-35.

Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N és Cardinali DP (2008): Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol*. 85(3), 335-53.

Piggins HD, Stamp JA, Burns J, Rusak B és Semba K (1996): Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) immunoreactivity in the hypothalamus and extended amygdala of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 376, 278-294.

Piggins HD és Cutler DJ (2003): The roles of vasoactive intestinal polypeptide in the mammalian circadian clock. *J Endocrinol*. 177 (1), 7-15.

Prins JM, Weverling GJ, van Ketel RJ és Speelman P (1997): Circadian variations in serum levels and the renal toxicity of aminoglycosides in patients. *Clin Pharmacol Ther*. 62(1), 106-11.

Rékasi Z, Csernus V, Horváth J, Vigh S és Mess B (1991): Long-term dynamic in vitro system for investigating rat pineal melatonin secretion. *Journal of Neuroendocrinology* 3, 563-568.

Reppert S M, Weaver D R és Ebisawa T. (1994): Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*. 13, 1177-1185.

Reppert S M, Weaver D R és Goodson C. (1996): Melatonin receptors step into the light. *Trends Pharmacol. Sci*. 17, 100-102.

Romijn HJ, Sluiter AA, Pool CW, Wortel J, Buijs RM. (1996): Differences in colocalization between Fos and PHI, GRP, VIP and VP in neurons of the rat suprachiasmatic nucleus after a light stimulus during the phase delay versus the phase advance period of the night. *J Comp Neurol*. 372(1), 1-8.

Romijn HJ, Sluiter AA, Pool CW, Wortel J és Buijs RM. (1997): Evidence from confocal fluorescence microscopy for a dense, reciprocal innervation between AVP-, somatostatin-, VIP/PHI-, GRP-, and VIP/PHI/GRP-immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci.* 9(12), 2613-23.

Sato T, Attanasio A, Wake K és Gupta D (1989): Rhythm development in pineal and circulating serotonin, N-acetylserotonin, and melatonin in Syrian hamsters. *J Pineal Res.* 7(1), 45-54.

Sahar S és Sassone-Corsi P (2009): Metabolism and cancer: the circadian clock connection. *Nat Rev Cancer.* 9(12), 886-96.

Said SI. (1986): Vasoactive intestinal peptide. *J. Endocrinol. Invest.* 9 (2), 191–200.

Schernhammer E, Rosner B, Willett W, Laden F, Colditz G és Hankinson S (2004): Epidemiology of urinary melatonin in women and its relation to other hormones and night work. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13 (62), 936–43.

Sherwood NM, Krueckl SL és McRory JE (2000): The origin and function of the pituitaryadenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocrine Rev.* 21, 619-670.

Sun JH, Reiter RJ, Mata NL és Tsin AT (1991): Identification of 11-cis-retinal and demonstration of its light- induced isomerization in the chicken pineal gland. *Neuroscience Letters* 133, 97-99.

Takahashi JS, Hamm H és Menaker M (1980): Circadian rhythms of melatonin release from individual superfused chicken pineal glands in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 77, 2319-2322.

Takemura A, Ueda S, Hiyakawa N és Nikaido Y (2006): A direct influence of moonlight intensity on changes in melatonin production by cultured pineal glands of the golden rabbitfish, *Siganus guttatus*. *J.Pineal Res.* 40, 236-241.

Tamarkin L, Reppert SM, Orloff DJ, Klein DC, Yellon SM és Goldman BD (1980): Ontogeny of the pineal melatonin rhythm in the Syrian (*Mesocricetus auratus*) and Siverian (*Phodopus sungorus*) hamsters and in the rat. *Endocrinology.* 107(4), 1061-4.

Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC és Reiter, RJ. (1993): Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J.* 1, 57-60.

Tanaka M, Ichitani Y, Okamura H, Tanaka Y és Ibata Y (1993): The direct retinal projection to VIP neuronal elements in the rat SCN. *Brain Res Bull.* 31(6), 637-40.

Turjanski AG, Estrin DA, Rosenstein RE, McCormick JE, Martin SR, Pastore A, Biekofsky RR és Martorana V (2004): NMR and molecular dynamics studies of the interaction of melatonin with calmodulin. *Protein Sci.* 13(11), 2925-38

Ueck M és Wake K (1977): The pinealocyte--a paraneuron? A review. *Arch.Histol.Jpn.* 40 Suppl, 261-278.

van der Beek EM, Horváth TL, Wiegant VM, Van den Hurk R és Buijs RM. (1997): Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J Comp Neurol.* 384(4), 569-79.

van Veen T, Elofsson R, Hartwig HG, Gery I, Mochizuki M, Cena V és Klein DC (1986): Retinal S-antigen: immunocytochemical and immunochemical studies on distribution in animal photoreceptors and pineal organs. *Experimental Biology* 45, 15-25.

Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A és Vaudry H (2000): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol.Rev.* 52, 269-324.

Vígh B és Vígh-Teichmann I (1981): Light- and electron-microscopic demonstration of immunoreactive opsin in the pinealocytes of various vertebrates. *Cell and Tissue Research* 221, 451-463.

Vígh B és Vígh-Teichmann I (1988): Comparative neurohistology and immunocytochemistry of the pineal complex with special reference to CSF containing neuronal structures. *Pineal.Res.Rev.* 6, 1-65.

Vígh-Teichmann I és Vígh B (1992): Immunocytochemistry and Calcium Cytochemistry of the Mammalian Pineal Organ - A Comparison with Retina and Submammalian Pineal Organs. *Microscopy Research & Technique* 21, 227-241.

Vuilleumier R, Besseau L, Boeuf G, Piparelli A, Gothilf Y, Gehring WG, Klein DC és Falcón J. (2006): Starting the zebrafish pineal circadian clock with a single photic transition. *Endocrinology*. 147 (5), 2273-2279.

Watts AG és Swanson LW (1987): Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat. *J Comp Neurol*. 258(2), 230-52.

Weaver DR, Stehle JH, Stopa EG és Reppert SM (1993): Melatonin receptors in human hypothalamus and pituitary: implications for circadian and reproductive responses to melatonin. *J Clin Endocrinol Metab*. 76 (2), 295-301.

Yamao M, Araki M, Okano T, Fukada Y és Oishi T (1999): Differentiation of pinopsin-immunoreactive cells in the developing quail pineal organ: an in-vivo and in-vitro immunohistochemical study. *Cell and Tissue Research* 296, 667-671.

Yonovitz A és Fisch JE (1991): Circadian rhythm dependent kanamycin-induced hearing loss in rodents assessed by auditory brainstem responses. *Acta Otolaryngol*. 111(6), 1006-12.

Zatz M, Kasper G és Marquez CR (1990): Vasoactive intestinal peptide stimulates chick pineal melatonin production and interacts with other stimulatory and inhibitory agents but does not show alpha 1-adrenergic potentiation. *Journal of Neurochemistry* 55, 1149-1153.

Zawilska JB, Berezinska M, Rosiak J, Skene DJ, Vivien-Roels B és Nowak JZ (2004): Suppression of melatonin biosynthesis in the chicken pineal gland by retinally perceived light - involvement of D1-dopamine receptors. *J.Pineal Res*. 36, 80-86.

Zeman M és Illnerova H (1990): Ontogeny of N-acetyltransferase activity rhythm in pineal gland of chick embryo. *Comparative Biochemistry and Physiology A - Comparative Physiology* 97, 175-178.

Zeman M, Gwinner E és Somogyiova E (1992): Development of melatonin rhythm in the pineal gland and eyes of chick embryo. *Experientia* 48, 765-768.

Zeman M, Gwinner E, Herichova I, Lamosova D és Kostal L (1999): Perinatal development of circadian melatonin production in domestic chicks. *Journal of Pineal Research* 26, 28-34.

Zoeller RT, Broyles B, Earley J, Anderson ER és Alberst HE (2006): Cellular Levels of Messenger Ribonucleic Acids Encoding Vasoactive Intestinal Peptide and Gastrin-Releasing Peptide in Neurons of the Suprachiasmatic Nucleus Exhibit Distinct 24-Hour Rhythms. *Journal of Neuroendocrinology* 4 (1), 119-124.