

**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

1. Bevezetés.....	3
2. Célkitűzések	6
3. Anyagok és módszerek.....	7
4. Eredmények és megbeszélés	8
5. Publikációs lista	14
6. Irodalom	15

1. Bevezetés

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. Mivel minden folyamatnak bizonyos időközönként szüksége van regenerációra, energia és alapanyag feltöltésre, a biológiai rendszerekben szinte elengedhetetlen a ciklusos szabályozás és működés. Az úgynevezett oszcillátor mechanizmusok által generált 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. 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, ezen mechanizmusok hossza állandó, csak igen szűk keretek között változtatható. Ugyanakkor a fázis 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 (pl. menstruációs ciklus), az egy napnál rövidebbeket „ultradian”-nak nevezzük (pl. szívciklus, EEG hullámok, stb.). A megközelítőleg 24 órás hosszúságúakat „circadian”-nak nevezzük, ilyen 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).

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). Emlősökben a szerv önállósága a filogenezis során elveszett, önmagában nem képes ritmikus tevékenységre, szerepe csupán a hormontermelés. Ezt bizonyította, hogy a patkányból eltávolított szerv önmagában, *in vitro* folyamatos alapszekekréciót mutatott éjszakai szekekréciófokozódások nélkül (Rékasi és tsai. 1991). A circadian oszcillátor a *nucleus suprachiasmaticus*ba 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. Ezzel szemben a madarak (illetve a nem emlős gerincesek) tobozmirigye még tartalmaz egy komplett biológiai oszcillátort, aminek működését a fény direkt pacemaker tényezőként vezérli. Akárcsak az emlősök esetében, a nucleus suprachiasmaticus a madarakban is kapcsolatot létesít a tobozmiriggyel, szerepe azonban nem a ritmus vezérlése, inkább csak befolyásolása (Binkley és tsai. 1978; Takahashi és tsai. 1980).

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 befolyásolhatónak bizonyult (Csernus és tsai. 1998; Mess és tsai. 1996; Takahashi és tsai. 1980), kísérleti modellnek az egyszerűbben vizsgálható madár corpus pineale-t választottuk.

A csirke tobozmirigy fényérzékenysége

A természetben a szervezet számára a fény a legegyszerűbb és legegértelműbb információhordozó a külvilág ciklusáról. A madarak tobozmirigye közvetlenül a koponyacsont alatt helyezkedik el, a szervben szövettanilag kimutatható fényérzékelő elemek (pl. pinealopsin) bizonyítottan működnek, és kapcsolatban állnak a MT termelő rendszerrel (Korf és Vigh-Teichmann 1984; Vigh-Teichmann és Vigh 1992; Vigh és Vigh-Teichmann 1988). A fény szinkronizáló szerepét vizsgálva intézetünkben kimutatták, hogy ritmikus MT szekréció fordított megvilágítással (éjszaka fény, nappal sötétség) másfél nap alatt megfordítható (Csernus és tsai. 1998; Mess és tsai. 1996). Továbbá a megfelelő fázisban alkalmazott viszonylag rövidebb (de legalább 3 órás) fény is rendelkezik a fordított megvilágításhoz hasonló hatással (Csernus 2003).

Gwinner és társai (1997) seregélyekben kimutatták, hogy a tojások 10 lux intenzitású fényel történő megvilágítása elegendő ahhoz, hogy az embriók MT szintézisét a külső megvilágításhoz szinkronizálja. 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.

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). Ezzel szemben madarakban a circadian MT ritmus már az embrionális élet során kialakul. Zeman és társai (1992 és 1999) 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. Herichová (2001) szintén *in vivo* kísérleteiben kimutatta, hogy az E19 csirke embriók MT szekréciója és a mirigy egyes óragénjeinek mRNS szintjei a megvilágítás hatására megváltoznak. Akasaka és társai (1995) csirke corpus pineale tenyészetben a környezeti megvilágítással befolyásolható változásokat mutattak ki a MT szekrécióban már a 13-14. embrionális napokon. Lamosová (1995) szerint az embrionális tobozmirigyek E17 után *in vitro* is ritmikusán termelik a MT-t, amennyiben normál megvilágításban tartják a tenyészetet, de konstans sötétben megszűnik a ritmus. 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 háttérében (akár *in vivo*, akár *in vitro* kísérletről legyen szó) valóban ritmikus változások állnak-e. 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.

Neuropeptidek embrionális tobozmirigyre gyakorolt hatásainak vizsgálata

A pituitary adenylate cyclase activating polypeptid (PACAP) az élő szervezetek számos szövetében fellelhető neuropeptid, mely - egyéb hatásai mellett - emlősökben a circadian aktivitás szabályozásában is szerepet játszik (Chen és tsai. 1999; Harrington és Hoque 1997; Harrington és tsai. 1999). A PACAP 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.

A PACAP mellett a szintén a VPAC receptorcsaládon ható vasoactive intestinal peptid (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.

2. Célkitűzések

Hogy a bevezetőben felvetett kérdésekre választ kapjunk, dinamikus, *in vitro* rendszerünkben a MT szekréció több napon keresztül történő folyamatos monitorozását terveztük.

Terveink:

1. Az alacsony intenzitású, ismétlődő megvilágítás hatásainak vizsgálata a tobozmirigy direkt, *in vitro* fényérzékenységének meghatározása céljából.
2. A circadian ritmus kialakulásának, valamint ezen fejlődés feltételeinek megismerése céljából különböző környezeti körülmények között vizsgáljuk csirke embriók *in vitro* MT szekrécióját.
3. A PACAP és VIP hatásainak vizsgálata a csirke embrionális tobozmirigy circadian MT ritmusának fejlődésére.

3. Anyagok és módszerek

A kísérleti állatok

A vizsgálatokhoz mindkét nembeli, fehér és tarka „húshibrid” csirkék tobozmirigyeit 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 37.5°C-on, 60% páratartalom alatt keltettük, és a kísérletek egy részében a naponta kétszer, manuálisan, egyenként megforgattuk őket. 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 dekaptáltuk, az eltávolított tobozmirigyet steril szikével négy-hat darabra vágtuk fel. Mindkét perifúziós oszlopba több állat mirigyéből is helyeztünk el darabokat Sephadex G10-el keverve. A kísérletek rendszerint 4 napig tartottak.

In ovo kezelések

Egyes kísérleteinkben a csirke embriókat tartalmazó tojásokat E15 korukban injektáltuk 50µg, 25µl fiziológiás sóban feloldott PACAP6-38-al. Az azonos korú kontroll tojásokba 25µl fiziológiás sóoldatot fecskendeztünk. A megfelelő oldatot Hamilton fecskendővel a chorioallantois hártya alá juttattuk. A beadást követően a lyukat steril ragasztószalaggal fedtük be.

A perifúziós rendszer

A vízfürdőbe helyezett, 5% CO₂-t és 95% levegőt tartalmazó gázkeverékkel telített, Médium 199 alapú tápfolyadékot (médiium) vékony teflon csöveken keresztül jutattuk a mirigydarabokat tartalmazó oszlopba. Egy kapcsolót elfordítva médiium helyett tesztmintát vezethető az oszlopra. A szövetdaraboktól elfolyó tápoldatot a frakciókolektor csöveiben gyűjtöttük össze. Folyamatos, 0.1 ml/perces áramlását egy az oszlopok és a frakciókolektor között elhelyezett perisztaltikus pumpával biztosítottuk. A kísérletek során harminc perces frakciókat gyűjtöttünk.

A frakciók hormontartalmának meghatározása és az eredmények értékelése

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 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.

4. Eredmények és megbeszélés

A tobozmirigy fényérzékenységének vizsgálatáról

A madarak tobozmirigye még *in vitro* állandó sötétben is circadian ritmus szerint termeli a MT-t. Akárcsak normál megvilágítás esetén, a hormon szekréciójának minimuma állandó sötétben is a dél körüli, maximuma (csúcs) az éjfél körüli órákban tapasztalható (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 (20.00-08.00-ig fény, 08.00-20.00ig sötét) esetén a MT ritmus fázisa mindössze 1 ciklus alatt szintén fordítottá, a fényritmusnak megfelelővé vált. Ehhez hasonló eredményt kaptunk akkor is, amikor a megvilágítás intenzitása mindössze 10 lux volt. Ebben az esetben a görbén az első, elcsúsztatott fázisú (12.00) MT csúcs alacsonyabb volt, mint az előző kísérlet azonos csúcsa, ami arra utalhat, hogy a fázisfordulás az alacsonyabb fényintenzitás esetén lassabb (Faluhelyi és Csernus 2007).

Amennyiben a megvilágítás hosszát napi 3 órára (20.00-23.00) rövidítettük, 10 luxos fényintenzitás esetén a korábbiaknál még lassabb fázisfordulást tapasztaltunk, itt az első sötét nappalon, 12.00-kor még mindig szekréciós 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* fényérzékenységenek alsó határát közelíti (Faluhelyi és Csernus 2007).

Gwinner (1997) seregély embriókon végzett *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. A 17. embrionális napon eltávolított tobozmirigyek MT szekréciónak 10 luxos, ritmikus megvilágítással vezérelni tudtuk. Ezzel bizonyítottuk, hogy a csirke embriók tobozmirigyének MT szekrécióna 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 (Faluhelyi és Csernus 2007).

Az embrionális MT szekrécióna változásairól

Míg emlősökben az anyai ritmus határozza meg a magzat, majd az újszülött ritmikus működéseit, addig madarakban már az embrionális élet során megjelenik a MT ritmus (Zeman és tsai. 1999). 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 szekrécióna, 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. Kimutattuk, hogy amennyiben a csirke tobozmirigyét fejlődése során nem érik periodikus környezeti ingerek (fény, hőmérsékletváltozás, mechanikai ingerek, stb.), az embrionális élet során a MT szekrécióna nem válik ritmikusná. 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. Az ennél fiatalabb tobozmirigyeknél (E17-ig) *in vitro* nem tapasztaltunk a ritmikus változást a hormon szintjében. 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 (Faluhelyi és tsai. 2004 és 2005). Lamosova és társai statikus rendszerben történő vizsgálatai 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 különböző korú embrionális tobozmirigyek *in vitro* periodikus megvilágítása esetén a ritmosos tojásforgatásnál tapasztaltakhoz hasonló eredményt kaptunk; MT ritmus csak E17 után jelent meg. Ez az adat is a korábbi következtetésünket támasztja alá, miszerint E16 és E17 között válik a tobozmirigy éretté a circadian MT ritmus kialakításához (Faluhelyi és Csernus 2007; Csernus és tsai. 2007). Ugyanakkor E14-től már megfigyeltünk a megvilágításra kimutatható változásokat a hormonszekrécióban, ami alapján elmondható, hogy a mirigy a megvilágítást már *in vitro* is érzékeli ebben a korban (Csernus és tsai. 2007).

Kísérletsorozatunkban megvizsgáltuk az *in ovo* alkalmazott periodikus megvilágítás hatásait is. Abban az esetben, és csak akkor, ha E8-tól *in ovo* periodikus megvilágítás alatt keltettük a tojásokat, a perifúziós rendszerben (folytatva az *in ovo* megvilágítást) már E13-tól is megfigyelhető circadian MT ritmus. Tehát az *in ovo* alkalmazott periodikus megvilágítás előbbre hozza a circadian MT ritmus megjelenését (Faluhelyi és tsai. 2009).

	<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 + (pozítív) jel circadian ritmust jelent mind a kísérlet környezeti megvilágításában, mind a MT szekréciójában.

A – (negatív) jel esetén állandó sötétben zajlott kísérletet, valamint a hormonelválasztás ritmikus jellegének hiányát is jelképezi. 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.

Mivel kotlás közben a tojásokat érik ritmikus környezeti változások, következtetésünk megfordítható; periodikus ingerek nélkül a ritmus fejlődése, illetve a tobozmirigyben található oszcillátorok szinkronizációja késik. Hasonló konklúzióra vezettek zebrahal embriókkal végzett kutatások is, ahol a circadian óra beindulásának feltétele szintén a környezeti fényviszonyokban végbemenő változás volt (Kazimi és Cahill, 1999; Vuilleumier 2006).

Az **1. táblázatból** leolvasható, hogy E13 naptól kezdve csak akkor tapasztalunk ritmust, ha már a tojást is periódikus fényingerek érik, illetve ha ezek *in vitro* is folytatódnak. Azonban összehasonlítva ezt a korai ritmust a más kísérletekben vizsgált, idősebb embriók tobozmirigyének MT ritmusával, elmondható, 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. 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 E17-től kezdve a ritmus már egyértelmű állandó sötétben is, és 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.

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 teheték ezt evolúciós szinten is.

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 reagáltak PACAP *in vitro* beadását követően. Az átlagosan 2-3 óra hosszú PACAP válaszoktól eltekintve a hormontermelés mintázata azonban teljesen megfelelt az azonos körülmények között keltetett, de PACAP-al nem ingerelt embriók mirigyeinek hormontermelésével (Faluhelyi és tsai. 2004 és 2005). 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), az általunk kezelt és a kontroll állatok *in vitro* MT szekréciója azonos maradt, tehát – ilyen paraméterek mellett - a PACAP hiánya nem változtatott a MT szekréció fejlődésén (Faluhelyi és tsai. 2006).

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. Saját eredményeink 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 (Faluhelyi és tsai. 2006).

A PACAP-al és VIP-vel kapcsolatos vizsgálataink szerint mindkét neuropeptid receptora és a MT szintézist befolyásoló jelátvitel E14-től (vagy még korábbtól) 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.

Eredményeink összefoglalása

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 szekréció *in vitro* körülmények között is érzékeny a rendkívül alacsony, néhány lux intenzitású megvilágításra.
3. A fényreceptorok már az E14 naptól közvetítik a megvilágítás MT szekréció-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 behatásoktól a környezeti megvilágításig.
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 neuropeptidek, a PACAP és a VIP nem játszanak jelentős szerepet.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Csernus Valér professzor úrnak, aki kutatásunk feltételeit biztosította, és akitől a kutatómunkáról szerzett minden tudásom származik. Köszönet Godáné Brumán Beának, Mercz Tündének és Bothné Végi Gabriellának a perifúziós kísérletekben nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért, valamint a több ezer assay-cső hormontartalmának fáradtságos meghatározásáért. Köszönöm Matkovits Attilának mind a kísérletek során mind a dolgozat ellenőrzésében, átírásban nyújtott nagyon értékes segítségét. Köszönöm az Anatómia Intézet minden munkatársának támogatását, segítségét. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak, és elsősorban feleségemnek türelmét és támogatását, ami nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.

5. 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 (elsőszerzős): 11 (8)

Tudományos előadások hazai konferenciákon, kongresszusokon (elsőszerzős): 11 (10)

6. Irodalom

Akasaka K, Nasu T, Katayama T és Murakami N (1995). *Brain Research* 692, 283-286.

Arimura A (1998). *Jpn.J.Physiol* 48, 301-331.

Binkley SA, Riebman JB és Reilly KB (1978). *Science* 202, 1198-1200.

Chen D, Buchanan GF, Ding JM, Hannibal J és Gillette MU (1999). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13468-13473.

Collin JP, Juillard MT és Voisin P (1984). *Ophthalmic Research* 16, 107-113.

Csernus V, Ghosh M és Mess B (1998). *General & Comparative Endocrinology* 110, 19-28.

Csernus V (2003). 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). *General & Comparative Endocrinology* 135, 62-69.

Dunlap JC (1999). *Cell* 96, 271-290.

Erhardt NM, Fradinger EA, Cervini LA, Rivier JE és Sherwood NM (2001). *Endocrinology* 142, 1616-1625.

Gwinner E, Zeman M és Klaassen M (1997). *Journal of Pineal Research* 23, 176-181.

Harrington ME és Hoque S (1997). *Neuroreport* 8, 2677-2680.

Harrington ME, Hoque S, Hall A, Golombek D és Biello S (1999). *Journal of Neuroscience* 19, 6637-6642.

Herichova I, Zeman M, Mackova M és Griac P (2001). *Neuroscience Letters* 298, 123-126.

Hollósy T, Józsa R, Jakab B, Németh J, Lengvári I és Reglódi D (2004). *Regulatory Peptides* 123, 99-106.

Józsa R, Somogyvári-Vígh A, Reglódi D, Hollósy T és Arimura A (2001). *Peptides* 22, 1371-1377.

Kazimi N és Cahill GM. (1999). *Brain Res Dev Brain Res.*117 (1), 47-52.

Korf HW és Vígh-Teichmann I (1984). *Ophthalmic Research* 16, 96-101.

Korf HW és Wicht H. (1992). *Prog Brain Res.* 91, 285-97.

Korf HW (1994). *Annals of the New York Academy of Sciences* 719, 13-42.

- Lamosova D, Zeman M, Mackova M és Gwinner E (1995).** *Experientia* 51, 970-975.
- Mess B, Rékasi Z, Ghosh M és Csernus V (1996).** *Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 47, 313-322.
- Nakahara K, Abe Y, Murakami T, Shiota K és Murakami N (2002).** *Brain Research* 939, 19-25.
- Rékasi Z, Csernus V, Horváth J, Vigh S és Mess B (1991).** *Journal of Neuroendocrinology* 3, 563-568.
- Takahashi JS, Hamm H és Menaker M (1980).** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 77, 2319-2322.
- van Veen T, Elofsson R, Hartwig HG, Gery I, Mochizuki M, Cena V és Klein DC (1986).** *Experimental Biology* 45, 15-25.
- Vigh B és Vigh-Teichmann I (1988).** *Pineal.Res.Rev.* 6, 1-65.
- Vigh-Teichmann I és Vigh B (1992).** *Microscopy Research & Technique* 21, 227-241.
- Vuilleumier R, Besseau L, Boeuf G, Piparelli A, Gothilf Y, Gehring WG, Klein DC és Falcón J. (2006).** *Endocrinology.* 147 (5), 2273-2279.
- Zatz M, Kasper G és Marquez CR (1990).** *Journal of Neurochemistry* 55, 1149-1153.
- Zawilska JB, Berezinska M, Rosiak J, Skene DJ, Vivien-Roels B és Nowak JZ (2004).** *J.Pineal Res.* 36, 80-86.
- Zeman M és Illnerova H (1990).** *Comparative Biochemistry and Physiology A - Comparative Physiology* 97, 175-178.
- Zeman M, Gwinner E és Somogyiova E (1992).** *Experientia* 48, 765-768.
- Zeman M, Gwinner E, Herichova I, Lamosova D és Kostal L (1999).** *Journal of Pineal Research* 26, 28-34.