

*Jerzy Z. Nowak, Jolanta B. Zawilska*

## **ZEGAR BIOLOGICZNY I RYTMIKA OKOŁODOBOWA**

Zakład Amin Biogennych PAN w Łodzi

*The rhythmic structure of biological systems  
can be considered a principle  
complementary to that of homeostasis*

Jurgen Aschoff (1979)

Ziemia, będąc integralną częścią Wszechświata, podlega wszystkim prawom jakie warunkują jego istnienie. W odniesieniu do naszej planety, działanie „sił kosmicznych” ujawnia się w takich zjawiskach jak obieg Ziemi wokół Słońca, obrót Ziemi dookoła własnej osi, czy obieg Księżyca wokół Ziemi. Zjawiska te wykazują czasową cykliczność i mają zasadniczy wpływ na większość organizmów żywych występujących na naszej planecie.

Ruchy rotacyjne Ziemi leżą u podstaw dobowych i rocznych fluktuacji naturalnego środowiska planety, wyrażających się przede wszystkim zmianami w natężeniu światła i temperatury. Obrót Ziemi dookoła własnej osi powoduje występowanie dnia i nocy, natomiast obieg planety wokół Słońca, w powiązaniu z nachyleniem osi Ziemi w stosunku do ekliptyki<sup>1</sup>, warunkuje następstwo pór roku. Sezonowa i dobowy zmienność środowiska naturalnego zmusza organizmy żywe do cyklicznego przestrajania swoich procesów fizjologicznych tak, aby zapewnić im właściwy dla pory dnia i roku poziom metabolizmu i odpowiednią funkcję. W konsekwencji, obserwujemy występowanie różnorodnych rytmów biologicznych w funkcjonowaniu zarówno naszego organizmu, jak też organizmów zwierzęcych i roślinnych; rytmy te dotyczą niemalże wszystkich procesów życiowych. Cechą charakterystyczną większości rytmów biologicznych jest ich endogenne pochodzenie. Oznacza to, że przebieg rytmu jest

---

<sup>1</sup> Sezonowe zmiany klimatyczne związane są z tym, że oś obrotu Ziemi nie jest pionowa, lecz lekko nachylona (o 23,5°) w stosunku do płaszczyzny jej obiegu dookoła Słońca. W wyniku takiego nachylenia w czasie ruchu dookoła Słońca – jeden obrót w ciągu całego roku – oświetlenie Ziemi nie jest jednakowe: promienie słoneczne padają na jej północną i południową półkulę bądź bardziej prostopadle – latem, bądź bardziej ukośnie – zimą.

niezmienny w tak zwanych stałych warunkach środowiskowych, np. w utrzymującej się przez okres co najmniej kilku dni ciemności lub ekspozycji na światło. Utrzymywanie się rytmów biologicznych u zwierząt pozbawionych informacji o zmianach zachodzących cyklicznie w środowisku, np. zmianach natężenia oświetlenia, implikuje rolę zegara biologicznego (oscylatora) odmierzającego czas w oparciu o dotychczasowe informacje środowiskowe. Zewnętrzną wskazówką synchronizującą rytm endogenego oscylatora może być przebieg jednego lub więcej rytmów w środowisku. Zatem rytmy środowiskowe (nazywane również rytmami egzogennymi) są naturalnymi synchronizatorami, albo „wskazówkami czasu” (ang. *time cues*), albo „dawcami czasu” (*Zeitgeber*s; z niemieckiego: *Zeit* – czas, *Geber* – dawca) dla endogenego oscylatora<sup>2</sup>

W toku ewolucji życie na Ziemi rozwinęło szereg systemów zegarowych zdolnych do pomiaru czasu w cyklu dobowym, rocznym, a także cyklu lunarnym (odpowiedzialnym za rytmy pływowe). Przykładami zjawisk występujących u kręgowców i przebiegających w **rytmie sezonowym** są, np. cykl wzrostu i reprodukcji, migracje (spotykane u wielu gatunków niższych kręgowców – takich jak ryby czy gady, ptaków, a nawet ssaków), czy sen zimowy (hibernacja) występujący u niektórych ssaków. Natomiast przykładem zjawiska przebiegającego w **rytmie okołodobowym** (albo **cirkadialnym**: *circa* – około, *dies* – dzień) jest rytm snu i czuwania. Można przyjąć, że większość z czynności wykonywanych w warunkach naturalnych przez istoty żywe (wyjątkiem – ale tylko do pewnego stopnia – może być człowiek współczesny, który zdołał się wyemancypować z naturalnych uwarunkowań), służy „czasowej” organizacji funkcji tkanek, narządów, a także całych organizmów w odniesieniu do cyklicznego następstwa dnia i nocy. Ten fakt, pomimo całej swej oczywistości, jest najistotniejszym elementem chronobiologii – nauki zajmującej się badaniem zjawisk cyklicznych w świecie żywym. W niniejszym opracowaniu uwagę skupimy na rytmice okołodobowej i mechanizmach zegara biologicznego zawiadującego taką rytmiką w świecie kręgowców, ze szczególnym uwzględnieniem ssaków.

## Rytmy okołodobowe

*A self-sustained oscillator with an inherent frequency underlies human 24-hour periodicity*

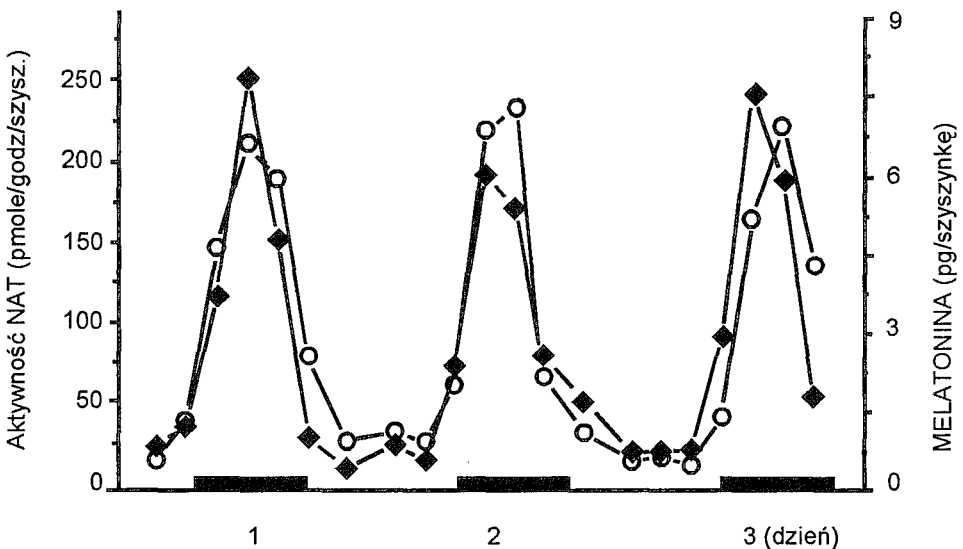
Jurgen Aschoff (1965)

Różne procesy biochemiczne, fizjologiczne i funkcje behawioralne, u praktycznie wszystkich organizmów – od struktur jednokomórkowych do

---

<sup>2</sup> Przytoczone terminy: synchronizator, wskazówki czasu, dawcy czasu, są stosowane wymiennie; termin *Zeitgeber(s)* zaproponowany przez wybitnego niemieckiego chronobiologa Jurgena Aschoffa prawie 40 lat temu jest terminem używanym często (a nawet preferencyjnie) przez dużą część badaczy rytmów okołodobowych.

człowieka – żyjących w warunkach naturalnych, charakteryzują się rytmiką okołodobową uwarunkowaną przede wszystkim zmianami oświetlenia środowiska wynikającymi z następstwa dnia i nocy (ryc. 1). Większość obserwowanych rytmów utrzymuje się także u osobników przebywających w środowisku pozbawionym synchronizatorów czasowych, np. w warunkach stałej ciemności. W warunkach bezsygnalowych rytm okołodobowy ulega stopniowemu przesuwaniu się w czasie przy zachowanej amplitudzie zmian (tzw. dryfowanie rytmu). Taki dryfujący rytm nazywamy rytmem swobodnie biegnącym (ang. *free-running rhythm*) (Aschoff, 1963, 1965; Pittendrigh, 1965; Menaker i wsp., 1978; Brady, 1982; Arendt, 1983; Jacklet, 1985; Minors i Waterhouse, 1986; Rusak, 1989; Touitou i Haus, 1992; Turek, 1994; Hastings, 1995).



Ryc. 1. Okołodobowy rytm poziomów melatoniny i aktywności głównego enzymu regulacyjnego w torze biosyntezy hormonu – serotoninowej *N*-acetylotransferazy w szyszynce kręgowców. Przedstawione dane pochodzą z badań własnych wykonanych na kurczętach (utrzymywanych w 12-godz. cyklu oświetlenia światło-ciemność; pogrube kreski oznaczają fazy ciemne cyklu) i są reprezentatywne dla praktycznie wszystkich zwierząt i człowieka

**O rytmie okołodobowym (cirkadialnym) mówimy wówczas, gdy rytmika procesu utrzymuje się w warunkach bezsygnalowych, np. kiedy organizmy żywe przbywają przez okres co najmniej kilku dni w środowisku całkowicie zaciemnionym.**

Cechą charakterystyczną rytmu okołodobowego jest jego wrażliwość na światło (i rzadziej temperaturę)<sup>3</sup>. Jakiegokolwiek przesunięcia w długości trwania fazy jasnej cyklu oświetleniowego spowodują przesunięcia fazy rytmu – przyspieszenie (ang. *phase-advance*) lub opóźnienie (ang. *phase-delay*). Do zakłóceń rytmu może dojść również wtedy, kiedy w czasie fazy ciemnej niespodziewanie pojawi się światło, nawet w formie krótkiego pulsu. Często krótkotrwały bodziec świetlny może zakłócić przebieg badanego parametru w danym cyklu (tzw. efekt „ostrego” światła), nie powodując jednocześnie przesunięcia faz rytmu okołodobowego. W tym aspekcie decydujące znaczenie ma czas trwania i natężenie bodźca świetlnego, oraz moment jego zadziałania (względem faz rytmu). Mechanizmy leżące u podstaw „ostrego” i „przesuwającego fazy rytmu” („synchronizującego”) efektu światła są na ogół różne. Kontrola biosyntezy melatoniny w siatkówce kurczenia stanowi dobry przykład dwojakiego działania światła na rytm okołodobowy. Supresyjny „ostry” efekt impulsu świetlnego na rytm produkcji hormonu wiąże się z szybkim uruchomieniem syntezy dopaminy w subpopulacji komórek amakrynowych siatkówki. Po uwolnieniu z miejsc syntezy i dotarciu do komórek fotoreceptorowych (gdzie zachodzi synteza siatkówkowej melatoniny) neuroprzekaźnik łączy się ze specyficznymi dla siebie receptorami  $D_4$  powodując zahamowanie kolejno: dokomórkowego napływu  $Ca^{2+}$ , zależnej od  $Ca^{2+}$ /kalmoduliny produkcji cAMP (niezbędnej dla podtrzymania syntezy melatoniny) i, w konsekwencji, do gwałtownego spadku poziomu hormonu (Nowak i Zawilska, 1994). Mechanizmy dopaminergiczne nie uczestniczą natomiast w „synchronizującym” efekcie światła, tj. w działaniu przesuwającym okołodobowy rytm biosyntezy siatkówkowej melatoniny (Zawilska, 1994). Przypuszcza się, że u podstaw tego zjawiska leżą utrzymujące się w czasie zmiany jonowe we wnętrzu fotoreceptora, które pośrednio prowadzą do ekspresji odpowiednich genów i zmian w rytmie dobowym generowanym przez oscylator (Cahill i Besharse, 1995).

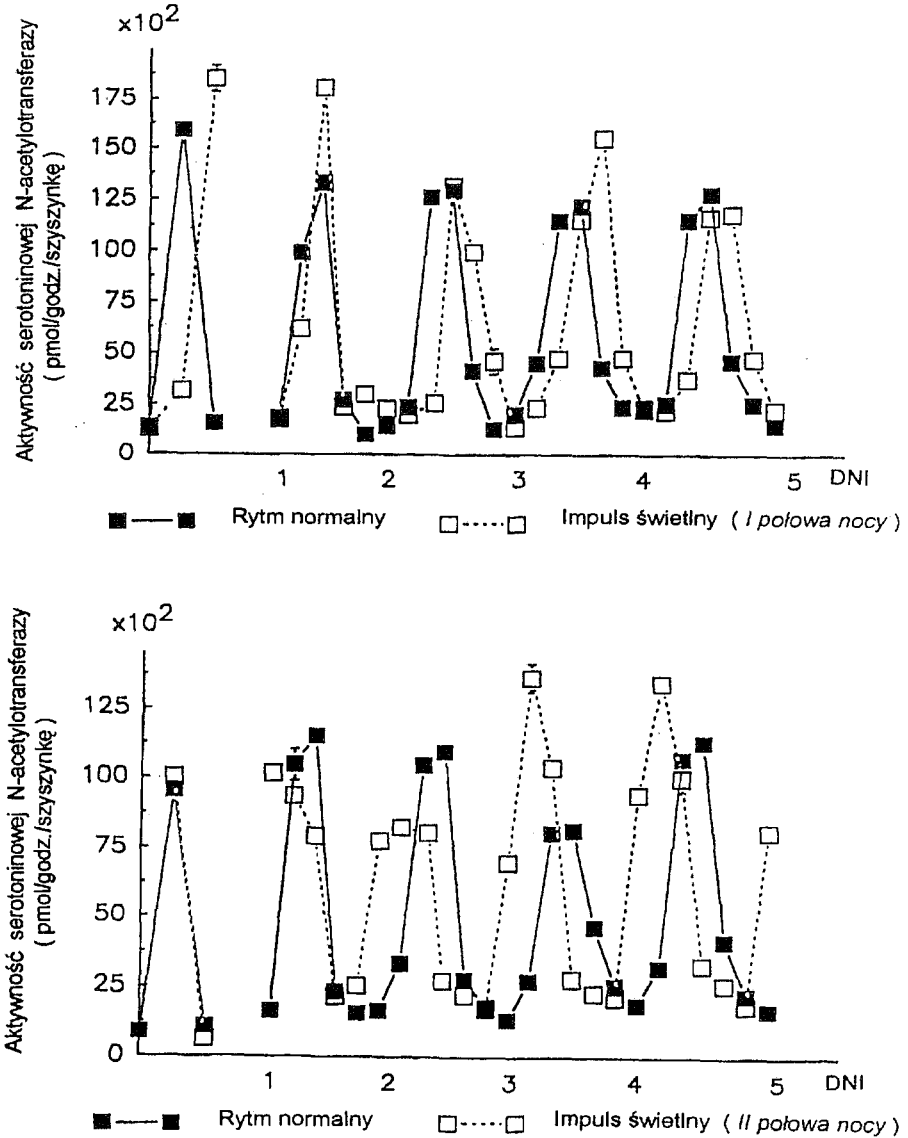
Zwierzęta prowadzące nocny tryb życia (np. szczury) są znacznie bardziej wrażliwe na bodźce świetlne niż zwierzęta o dziennym trybie życia (np. niektóre gatunki ptaków). Dane dotyczące człowieka nie są spójne – rozbieżności jednakże mogą wiązać się z warunkami eksperymentu. Lewy i wsp. (1980) donosili, że wysokie nocne poziomy melatoniny w osoczu ulegają obniżeniu do niskich dziennych wartości po 2-godzinnej ekspozycji na światło o natężeniu  $>1500$  luks, natomiast Laakso i wsp. (1993) podobną supresję obserwowali po 1-godzinnym bodźcu świetlnym o natężeniu 500 luks. Z kolei, badania Boivina i wsp. (1996) dotyczące okołodobowego rytmu temperatury ciała wykazały

---

<sup>3</sup> Nieznane są mechanizmy, na drodze których dochodzi do funkcjonalnego „odwrócenia” rytmu aktywności bioelektrycznej zwojów górnych szyjnych (*superior cervical ganglia*; SCG) względem SCN. Szlak łączący SCN z SCG jest szlakiem polisynaptycznym, a substancje sygnałowe wykorzystywane przez poszczególne neurony tego szlaku w dużej części nie są zidentyfikowane.

znamiennie przesunięcie fazy rytmu po zastosowaniu trzykrotnej 5-godzinnej ekspozycji pacjentów na światło o natężeniu 180 luks.

Na rycinie 2 przedstawiono wpływ bodźca świetlnego zastosowanego w pierwszej i drugiej połowie fazy ciemnej cyklu oświetleniowego na okołodobowy rytm aktywności serotoninowej N-acetylotransferazy (kluczowego enzymu regulacyjnego w torze biosyntezy melatoniny) w szyszynce, powodującego odpowiednio opóźnienie i przyspieszenie fazy rytmu.



Ryc. 2. Synchronizujący efekt pulsu świetlnego na okołodobowy rytm aktywności serotoninowej N-acetylotransferazy w szyszynce kręgowców (badania własne)

W świecie roślin i zwierząt rytm aktywności życiowej związanej z następstwem dnia i nocy jest zwykle bardziej wyraźny i regularny niż analogiczny rytm u człowieka. Niemniej jednak organizm człowieka współczesnego (świadomie wymykającego się spod kontroli uwarunkowań naturalnych) wytwarza różnorodne rytmy biologiczne – metaboliczne, hormonalne, czynnościowe, co niebicie wskazuje na zachowaną funkcję dobowego oscylatora (Brady, 1982; Minors i Waterhouse, 1986). Dotyczy to zarówno ludzi o typie aktywności porannej (ludzie „skowronki”), jak i aktywności wieczorno-nocnej (ludzie „sowy”), albowiem to właśnie endogenny zegar biologiczny wyznacza u nas porę aktywności psychofizycznej (włączając w to sprawność intelektualną) i rytmikę okolo-dobową wielu parametrów metaboliczno-czynnościowych (np. temperatura ciała, poziomy wielu hormonów – m.in. kortyzolu i melatoniny we krwi).

### Zegar biologiczny – lokalizacja, budowa i funkcja

*The clocks are accounted for as „open systems”  
depending upon subtle geophysical rhythms*

Frank A. Brown, Jr. (1959)

Koncepcja zegara biologicznego ma swoją długą historię. Być może jej pomysłodawcą był Karol Linneusz, który w latach 30. XVIII wieku, w oparciu o znane mu dobowe rytmy zakwitania różnych gatunków kwiatów, „skonstruował” żywy zegar działający na kształt falującego w miarę upływu dnia dywanu kwiatowego. Jeszcze nie tak dawno pojęcie zegara biologicznego stanowiło rodzaj „czarnej skrzynki”, która reagując na zmiany głównie oświetlenia środowiska odmierza czas astronomiczny i w sposób dla siebie właściwy przekazuje tę informację do organizmu. W miarę upływu lat i poszerzania naszej wiedzy z zakresu fizjologii i biochemii pojęcie zegara biologicznego stawało się coraz bardziej sprecyzowane. Wyniki dowodzą, że u zwierząt za regulację rytmów okolo-dobowych odpowiadają określone struktury ośrodkowego układu nerwowego (OUN) pełniące funkcję dobowych oscylatorów<sup>4</sup>.

Obecnie wiadomo, że wśród kręgowców lokalizacja zegara biologicznego jest różna. U ryb, gadów i ptaków dobowy oscylator znajduje się w szyszynce (np. Takahashi i wsp., 1989; Zatz, 1989; Ali, 1991); u płazów, ptaków i ssaków podobny zegar występuje także w fotoreceptorach siatkówki (Underwood i wsp., 1990; Reme i wsp., 1991; Zawilska i Wawrocka, 1993; Zawilska, 1994; Cahill i Besharse, 1995; Tosini i Menaker, 1996). Również u ślimaków zegar biologiczny zlokalizowano w oku (Jacklet, 1985; Block i wsp., 1993). U ssaków rolę

<sup>4</sup> Termin „zegar biologiczny” nie precyzuje jednostek odmierzanego czasu (dzień, miesiąc, rok, itd.); jednakże w dużej części specjalistycznych publikacji jest on utożsamiany z zegarem pracującym w rytmie dobowym. W takim znaczeniu termin ten jest stosowany wymiennie z innymi terminami, np. dobowy oscylator, rozrusznik (ang. *pacemaker*).

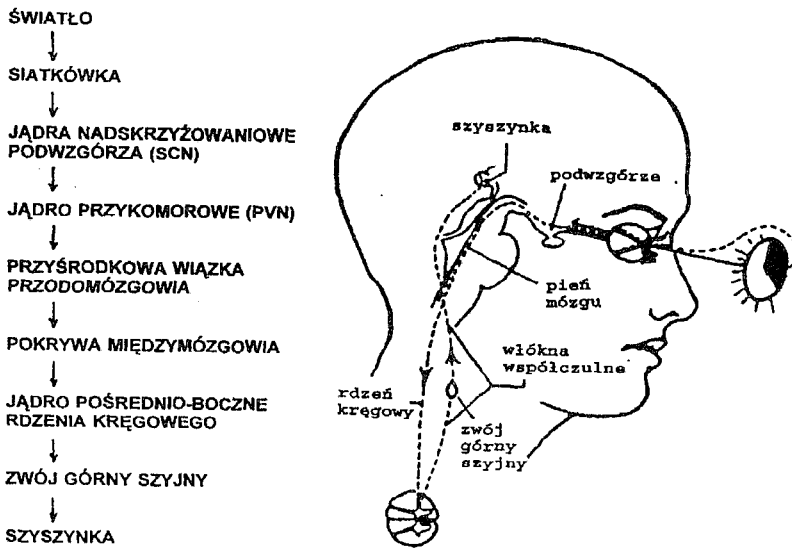
nadrzędnego zegara biologicznego pełnią parzyste jądra nadskrzyżowaniowe (ang. *the suprachiasmatic nuclei*; SCN), zlokalizowane w mózgu w okolicy przedniego podwzgórza (Meijer i Rietveld, 1989; Klein i wsp., 1991).

Pojęcie i lokalizacja zegara biologicznego zostały zdefiniowane: u kręgowców **oscylatorem okołodobowym jest określona struktura ośrodkowego układu nerwowego wytwarzająca samotrzymujący się w stałych warunkach rytm aktywności o okresie trwania ok. 24 godzin.**

SCN u ssaków zawiera, w zależności od gatunku, od 8 do 13 tysięcy gęsto upakowanych małych neuronów. Struktura ta odpowiada za regulację praktycznie wszystkich – behawioralnych, fizjologicznych i biochemicznych – rytmów 24-godzinnych. Spośród wielu danych doświadczalnych, przemawiających za kluczową rolę SCN jako zegara biologicznego, najbardziej przekonującego argumentu dostarczają badania z przeszczepianiem tej struktury mózgu. Zniszczenie SCN za pomocą lezji powoduje arytmiczność zwierząt. Przeszczepienie takim zwierzętom embrionalnego SCN prowadzi do ponownego pojawienia się u nich rytmiki okołodobowej, przy czym rejestrowane rytmy reprezentują rytm eksplantu macierzystego organizmu (embriona). Powyższe doświadczenia dowodzą, że charakterystyka przywróconego rytmu okołodobowego zależy wyłącznie od fenotypu transplantowanego SCN, a nie od fenotypu reszty całego zwierzęcia (Ralph i Lehman, 1991).

Badania elektrofizjologiczne prowadzone na skrawkach SCN szczura i chomika, oraz na preparatach komórkowych uzyskanych z SCN, sugerują, że rytmy okołodobowe mogą być wytwarzane przez pojedyncze neurony (Bos i Mirmiran, 1990; Welsh i wsp., 1995). Nie wiemy, czy wszystkie neurony SCN posiadają endogenne oscylatory, czy też istnieją specjalne komórki (bądź grupy współpracujących ze sobą komórek) generujące rytmikę okołodobową, przekazywaną następnie na sąsiednie neurony. Należy podkreślić, że aktywność bioelektryczna pojedynczych neuronów SCN (rejestrowana w warunkach *in vitro*) nie jest skoordynowana i długość jednego cyklu rytmu waha się w szerokich granicach 16-32 godzin. W warunkach *in vivo* SCN – jako całość – wytwarza tylko jeden zsynchronizowany sygnał okołodobowy, który reguluje cykliczność przebiegu określonych zjawisk w organizmie (Bos i Mirmiran, 1990; Bouskila i Dudek, 1995).

U ssaków zegar biologiczny jest funkcjonalnie wkomponowany w tzw. **system okołodobowy**, składający się z trzech elementów: nadrzędnego oscylatora (SCN), szyszynki i siatkówki. Współpraca w/w elementów jest konieczna dla generacji zsynchronizowanego rytmu i autokontroli jego przebiegu (na zasadzie sprzężeń zwrotnych), jak również stwarza możliwość propagacji w organizmie informacji o rytmie oscylatora poprzez cyklicznie – zgodnie z wytycznymi SCN – produkowany i uwalniany do krwiobiegu hormon szyszynkowy – melatoninę (ryc. 3). U ssaków, w przeciwieństwie do ptaków i niższych kręgowców, jedynym narządem wyspecjalizowanym do odbioru sygnałów świetlnych jest siatkówka; u zwierząt ze zdegenerowanymi fotoreceptorami, lub



Ryc. 3. Szlak przepływu informacji świetlnej od siatkówki do szyszynki u ssaków. Trzy wymienione struktury: siatkówka, jądra nadskrzyżowaniowe podwzgórza (SCN; główny zegar biologiczny) i szyszynka tworzą tzw. system okołodobowy

przeciętym nerwem wzrokowym, wytwarzany przez SCN rytm okołodobowy jest rytmem swobodnie bieżącym, a więc niezsynchronizowanym z warunkami świetlnymi środowiska. Takie rytmy występują np. u ludzi niewidomych.

### Szlaki aferentne SCN – czyli jak sygnał świetlny dociera do zegara biologicznego

Jak wspomniano wcześniej, zegar biologiczny – pomimo genetycznie zakodowanego rytmu aktywności 24-godzinnej (patrz dalej), nie pracuje w warunkach *in vivo* niezależnie od dobowych zmian w środowisku. Wyznaczone przez 24-godzinne obroty Ziemi dokola własnej osi zmiany w oświetleniu planety, manifestujące się następstwem dnia i nocy (a w eksperymencie następstwem odpowiednio fazy jasnej i fazy ciemnej dobowego sztucznego cyklu oświetleniowego, np. 12 godzin światła i 12 godzin ciemności), stanowią czynnik synchronizujący (*Zeitgeber*) aktywność endogenego oscylatora.

U ssaków, informacja o warunkach oświetlenia środowiska jest rejestrowana przez siatkówkę oka i dociera do SCN bezpośrednim szlakiem siatkówkowo-podwzgórzowym (ang. *the retino-hypothalamic tract*; RTH), utworzonym z aksonów komórek zwojowych siatkówki (ryc. 4). Neuroprzekaźnikiem w tym szlaku neuronalnym jest aminokwas pobudzający – kwas glutaminowy (Ebling, 1996). Brak zależnej od światła impulsacji glutaminianergicznej docierającej do SCN powoduje utratę synchronizacji rytmu aktywności SCN z naturalnym (dzień-noc) bądź sztucznym (światło-ciemność) cyklem oświetlenia środowiska.



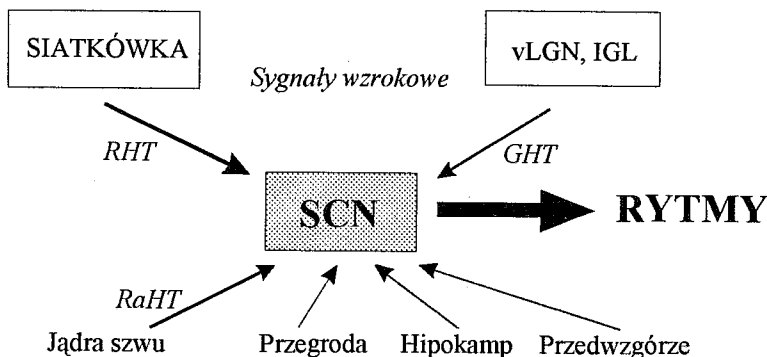
Rytm aktywności SCN zaczyna wówczas dryfować (rytm swobodnie biegnący), wykazując tendencje w kierunku wydłużania czasokresu jednego cyklu (>24 godziny). Przywrócenie sygnałów środowiskowych (bądź skoordynowanej impulsacji glutaminianergicznej) powoduje zsynchronizowanie pracy oscylatora do nowych warunków świetlnych (bądź zdeterminowanych farmakologicznie), co wyraża się odpowiednim przestrojeniem regulowanej przez SCN rytmiki okołodobowej.

Nowsze badania sugerują, iż synchronizacja rytmu zegara biologicznego z warunkami środowiskowymi (a więc z rytmem egzogennym) jest bardziej skomplikowana, niż sądzono pierwotnie. Pomimo tego, że do uzyskania pełnej aktywności SCN wystarcza sygnalizacja przebiegająca szlakiem RTH, prawdopodobnie inne szlaki neuronalne także uczestniczą w procesie przekazywania informacji środowiskowych do zegara biologicznego. Okazało się, że leżące tzw. ciała kolankowatych bocznych (ang. *the lateral geniculate complex*, LGC) – struktury zlokalizowanej w obrębie wzgórza, pomimo zachowanej ciągłości RTH, uniemożliwiały uzyskanie synchronizacji rytmu aktywności SCN z cyklem oświetlenia środowiska. Obserwacje te stały się podstawą hipotezy o istnieniu projekcji neuronalnej łączącej LGC z SCN, tzw. szlak kolankowato-podwzgórzowy (ang. *the geniculo-hypothalamic tract*, GHT). Dalsze badania wykazały, że GHT bierze początek z funkcjonalnie i morfologicznie odrębnej populacji komórek LGC, zwanej listkiem międzykolankowatym (ang. *the intergeniculate leaflet*, IGL). Głównym neuroprzekaznikiem neuronów tego szlaku jest neuropeptyd Y (NPY).

Badania elektrofizjologiczne i immunocytochemiczne wskazują na kolejną funkcjonalnie istotną projekcję neuronalną wpływającą na aktywność SCN – szlak łączący twór siatkowaty (a właściwie dwa jądra szwu – środkowe i grzbietowe) z SCN (ang. *the raphe-hypothalamic tract*, RaHT). Neuroprzekaznikiem tego szlaku jest serotonina (5-hydroksytryptamina; 5HT). Wydaje się, że szlak ten może pośredniczyć w przekazywaniu informacji o oświetleniu środowiska albowiem – jak wykazały badania elektrofizjologiczne – neurony tej struktury żywo reagują na sygnały świetlne. W istocie, występowanie projekcji bezpośrednio łączącej siatkówkę z tworem siatkowatym opisano już u kilku przedstawicieli ssaków, z naczelnymi włącznie (Nakagawa i wsp., 1988).

Wyniki intensywnie prowadzonych badań wskazują, że główne neuroprzekazniki omówionych powyżej szlaków neuronalnych, a więc kwas glutaminowy (Shigenobu i wsp., 1994; Ebling, 1996), neuropeptyd Y (np. Weber i Rea, 1997) i serotonina (Medanic i Gillette, 1992; Meyer-Bernstein i wsp., 1997), w sposób wyraźny i określony wpływają na rytmikę zegara biologicznego, dowodząc tym samym zasadniczą rolę transmisji RHT, GHT i RaHT w generacji sygnału okołodobowego.

Rycina 4 schematycznie przedstawia szlaki aferentne, a więc dochodzące do SCN, u ssaków.



Ryc. 4. Szlaki neuronalne docierające do nadrzędnego zegara biologicznego (zlokalizowanego w jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza (SCN) u ssaków. RHT – szlak siatkówkowo-podwzgórzowy, GHT – szlak kolankowato-podwzgórzowy, RaHT – szlak łączący twór siatkowaty z podwzgórzem, LGN – jądra kompleksu kolankowatego bocznego, IGL – listek międzykolankowaty

### Wtórne przekaźniki informacji i funkcja zegara biologicznego

Cykliczny 3',5'-adenozynomonofosforan (cAMP), cykliczny 3',5'-guanozynomonofosforan (cGMP) i jony wapniowe ( $\text{Ca}^{2+}$ ) odgrywają bardzo ważną rolę w wielu procesach komórkowych u praktycznie wszystkich organizmów żywych. Można zatem sądzić, że wymienione wtórne przekaźniki informacji będą pełnić istotną rolę w mechanizmach zegara biologicznego. Jednakże uzyskiwane wyniki w tym zakresie wskazują na istnienie zasadniczych różnic międzygatunkowych. Cykliczny AMP wydaje się regulować rytm aktywności bioelektrycznej dobowego oscylatora u tak różnych organizmów jak *Neurospora* i gryzoni, natomiast w szyszynce ptaków jego rola wydaje się być bardziej związana z mechanizmami efektorowymi (jak np. rytmiczna synteza melatoniny) niż z rozrusznikiem jako takim.

W badaniach wykonanych na skrawkach przedniego podwzgórza szczura (zawierających SCN) wykazano, że dodanie do środowiska inkubacyjnego niehydrolizujących analogów cAMP powodowało szybką synchronizację rytmiki okołodobowej aktywności bioelektrycznej neuronów SCN. Podobne wyniki uzyskiwano po zastosowaniu związków podnoszących poziom cAMP na drodze stymulacji jego syntezy i zahamowania katabolizmu – odpowiednio, forskoliny – bezpośredniego aktywatora cykazy adenylanowej, i inhibitora cAMP-fosfodiesterazy (Gillette i Prosser, 1988, 1989). Wpływ cAMP na rytm pracy zegara obserwowano tylko w określonych przedziałach czasowych w odniesieniu do cyklu oświetleniowego, w którym przebywały zwierzęta przed pobraniem SCN. Wyniki te wskazują na fazową zależność reakcji oscylatora na zastosowany bodziec chemiczny i przypominają podobną reakcję dobowego rozrusznika na bodziec świetlny (Prosser i Gillette, 1989; Gillette, 1991). Badania wykonane

na tym samym modelu wykazały, że także cGMP indukuje przesunięcia fazy rytmu aktywności bioelektrycznej neuronów SCN, przy czym efekty tego nukleotydu, w przeciwieństwie do cAMP, były widoczne tylko wówczas, kiedy związek zastosowano w godzinach nocnych. Ponadto, podanie chomikom inhibitora zależnej od cGMP kinazy białkowej zapobiegało efektowi przyspieszenia fazy okołodobowego rytmu aktywności ruchowej zwierząt wywołanemu przez impuls świetlny (Weber i wsp., 1995). Wyniki te wskazują, że cAMP i cGMP wpływają na rytm aktywności bioelektrycznej SCN poprzez różne mechanizmy zachodzące w obrębie zegara biologicznego, sugerując regulacyjną rolę obu wtórnych przekazywaczy w generacji rytmu okołodobowego oscylatora.

W kontekście powyżej przedstawionych danych warto nadmienić, że szeroko zakrojone badania dwóch grup amerykańskich kierowanych przez M. Zatza i J.S. Takahashi'ego nie potwierdzają roli cAMP w generacji rytmu okołodobowego oscylatora w pinealocytach kurcząt, wskazując jednakże na doniosłe znaczenie tego nukleotydu w wytwarzaniu okołodobowego rytmu biosyntezy melatoniny (np. Takahashi i wsp., 1989; Zatz, 1989). W szyszynkach kurcząt cAMP wydaje się funkcjonować jako tzw. sygnał wyjściowy (ang. *output signal*) zegara biologicznego, nie natomiast jako sygnał wejściowy (ang. *input signal*) regulujący jego endogenną rytmikę.

Badania nad rolą  $Ca^{2+}$  w mechanizmach zegara biologicznego również nie są jednoznaczne. Wyniki niektórych prac wskazują na udział tych jonów w procesach odpowiedzialnych za synchronizację rytmu oscylatora w szyszynce kurcząt (Zatz i Heath, 1995), natomiast inne wyniki, uzyskane na tym samym modelu, sugerują funkcję  $Ca^{2+}$  jako sygnału wyjściowego (Nikaido i Takahashi, 1996). Szereg danych doświadczalnych uzyskanych dla szyszynki i siatkówki kurcząt wskazuje na to, że mechanizmy wapniowe mogą regulować wewnątrzkomórkowe poziomy cAMP, a zatem i procesy zależne od tego nukleotydu (Iuvone i wsp., 1991; Zatz, 1992; Zawilska i wsp., 1992). Dane dotyczące roli  $Ca^{2+}$  w mechanizmach synchronizujących rytm oscylatora u ślimaków (Colwell i wsp., 1992) oraz innych organizmów zajmujących niskie szczeble filogenezy (Edmunds, 1992) są niejednolite i nie upoważniają do wyciągnięcia definitywnych wniosków.

### Molekularne mechanizmy zegara biologicznego

Badania mechanizmów molekularnych zawiadujących rytmiką pracy dobowego oscylatora u ssaków nastrożają sporo trudności technicznych; dlatego też postęp dotyczący szczegółowej wiedzy o zjawiskach rytmicznych u tych zwierząt dokonywał się stosunkowo powoli. Znacznie więcej informacji na ten temat pochodzi z doświadczeń wykonanych na bardziej prymitywnych organizmach, takich jak jednokomórkowe glony (*Gonyaulax polyedra*), grzyby (np. pleśń chlebowa – *Neurospora crassa*), morskie ślimaki (*Aplysia californica*, *Bulla gouldiana*), czy owady (np. muszka owocowa – *Drosophila melanogaster*). Dla zrozumienia istoty zegara biologicznego fundamentalne znaczenie miały

dwie obserwacje: (1) pojedyncze komórki (reprezentujące niezależne organizmy albo należące do tzw. systemu okołodobowego u organizmów złożonych) mogą wytwarzać rytmy o okresie trwania cyklu  $\approx 24$  godzin oraz (2) cykliczna biosynteza białek jest niezbędna dla utrzymania sinusoidalnego, rozciągniętego w czasie rytmu okołodobowego. Te obserwacje nasunęły przypuszczenie, że tajemnica rytmiki okołodobowej leży w genach. W istocie, badania ostatnich kilku lat wykazały, że w obrębie systemu okołodobowego występuje rytmiczna aktywacja bądź supresja ekspresji określonych genów. Sądzi się, że na początku cyklu dobowego sygnał świetlny aktywuje indukcję pewnych genów tzw. wczesnej odpowiedzi komórkowej (ang. *immediate early genes*, IEGs); po upływie pewnego czasu produkty ich ekspresji – w procesie zależnym od rytmu oscylatora – stymulują bądź hamują ekspresję innych genów.

### Światło reguluje ekspresję genów wczesnej odpowiedzi komórkowej (IEGs)

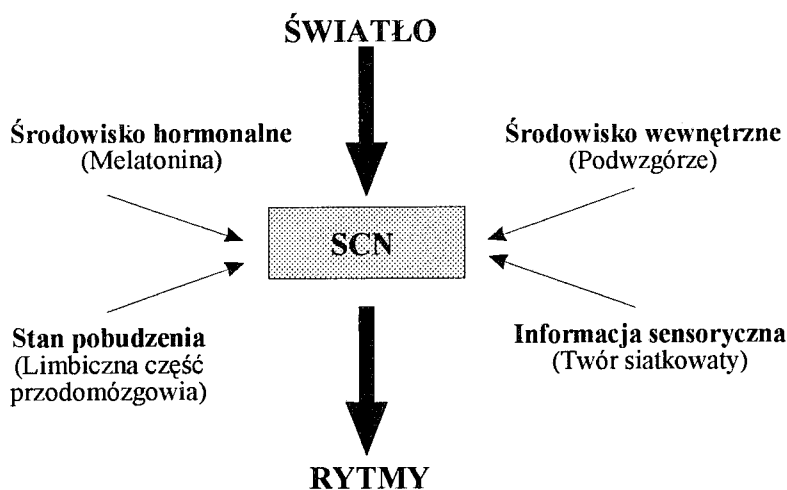
W wielu doświadczeniach wykonanych na *Neurospora* i *Aplysia*, a także niektórych ssakach (szczur, chomik), zaobserwowano, że inhibitory biosyntezy białka hamowały przesunięcia faz rytmu wywołane ekspozycją organizmów na światło, sugerując tym samym istotną rolę ekspresji genów w działaniu synchronizującym światła na rytmikę okołodobową. Podobne wyniki uzyskano w badaniach zależnej od światła ekspresji IEGs w SCN ssaków (Kornhauser i wsp., 1994). Wśród aktywowanych przez światło genów wymienia się m.in. *c-fos*, *jun-B*, *NGFI-A* (znany także jako *egr-1*) i *NGFI-B* (*nur77*). Prawdopodobnie lista aktywowanych przez światło genów będzie się wydłużać w miarę uzyskiwania nowych wyników. Produkty białkowe ekspresji wszystkich wymienionych genów są czynnikami transkrypcyjnymi, a więc cząsteczkami regulującymi ekspresję innych genów.

Większość zgromadzonych danych doświadczalnych dotyczy indukowanej przez światło ekspresji IEGs genu *c-fos* u gryzoni. Uzyskiwane wyniki stanowią istotny krok naprzód w zrozumieniu molekularnych podstaw rytmiki okołodobowej. Ustalono bowiem, że: (1) wywołana przez bodziec świetlny indukcja *c-fos* występowała najintensywniej w subregionach SCN i IGL, do których dochodzą aksony komórek zwojowych siatkówki (szlaki neuronalne RTH i GHT); (2) ekspresja *c-fos* zachodziła tylko w tych przedziałach czasowych cyklu, w których światło zmieniano fazy okołodobowego rytmu aktywności ruchowej zwierząt; (3) zależna od zegara biologicznego (i światła) indukcja *c-fos* podlegała regulacji przez tzw. CREB (ang. *cAMP response-binding protein*); (4) światło indukowało zdolność AP-1, heterodimeru utworzonego z białek Fos i Jun-B (lub innym z tej serii), do wiązania się z DNA. Sądzi się, że ekspresja białek Fos i Jun-B, jak również zdolność AP-1 do wiązania się z odpowiednimi rejonami DNA, są integralnymi składowymi złożonego mechanizmu leżącego u podstaw zależnej od światła synchronizacji endogennego rytmu oscylatora z egzogenным rytmem środowiska.

## Jak zegar biologiczny kontroluje rytmy okołodobowe

### *Systemy neuroprzekąźnikowe w obrębie SCN*

Pomimo stosunkowo niewielkiej liczby komórek składających się na SCN, struktura ta wykonuje szereg skomplikowanych zadań. Oprócz odbioru i analizy informacji o oświetleniu środowiska (warunkujących powstanie zsynchronizowanego okołodobowego rytmu aktywności bioelektrycznej neuronów zegara biologicznego), SCN otrzymuje i integruje sygnały z różnych części mózgu (ryc. 4 i 5). Sygnały te są niezwykle ważne dla funkcji oscylatora albowiem zawierają „informacje” o stanie funkcjonalnym wielu struktur ośrodkowego układu nerwowego (komunikacja transsynaptyczna) i wielu narządów obwodowych (komunikacja hormonalna).



Ryc. 5. Zegar biologiczny (okołodobowy oscylator) umiejscowiony w jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza (SCN) otrzymuje informacje zarówno ze środowiska zewnętrznego jak i wewnętrznego. Wypadkową oddziaływań i interakcji dochodzących informacji jest wytwarzany przez oscylator sygnał okołodobowy narzucający rytmikę okołodobową wielu parametrów funkcjonalnych w organizmie

Badania anatomiczno-histochemiczne wykazały obecność szlaków neuronalnych łączących SCN z niemalże wszystkimi funkcjonalnie zdefiniowanymi obszarami mózgowia, m.in. ze strukturami limbicznymi (stanowiącymi anatomiczny substrat dla reakcji emocjonalnych), tworem siatkowatym (regulującym stan snu i czuwania), oraz wieloma jądrami podwzgórza (zaangażowanymi w regulację czynności trzewnych). Badania receptorowe, wykorzystujące techniki autoradiografii i specyficznego wiązania receptorowo-selektywnych ligandów znakowanych trytem [ $H^3$ ] i/lub jodem [ $I^{125}$ ], pozwoliły na wykazanie obecności i komórkowej lokalizacji receptorów dla uznanych neuroprzekąźników,

modulatorów i hormonów. Uwzględniając liczbę neuronów tworzących SCN (ok. 10 tysięcy) i liczbę synaps przypadających na jeden neuron w obrębie SCN (ok. 1200-1400) można przypuszczać, że łączna pula receptorów dla substancji sygnałowych w obszarze zegara biologicznego jest nadzwyczaj duża. Badania immunocytochemiczne wykazały obecność przynajmniej 25 układów neuroprzebieżnikowych funkcjonujących w obrębie SCN. Wśród nich wymienia się takie substancje sygnałowe jak: serotonina (5-hydrokstytryptamina), kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA), acetylocholina, dopamina, noradrenalina, kwas glutaminowy, histamina, jak również szereg substancji peptydowych, m.in. wazopresyna, neurofizyna, enkefalina, naczyniowo-aktywny peptyd jelitowy (VIP), neuropeptyd Y (NPY), hormon adrenokortykotropowy (ACTH), substancja P (SP), cholecystokinina (CCK), somatostatyna (SS) i prolaktyna. Zgromadzone dane doświadczalne na temat neuromodulatorów SCN wskazują, że wszystkie w/w substancje (oraz prawdopodobnie szereg innych) tworzą bogatą sieć połączeń i interakcji interneuronalnych w obrębie SCN – są funkcjonalnie istotne dla funkcji zegara biologicznego, pełniąc rolę albo sygnałów wejściowych (ang. *input signals*) do, albo sygnałów wyjściowych (ang. *output signals*) z dobowego oscylatora.

Z przytoczonych danych wynika, że SCN jest strukturą o niezwyklej kompleksowości anatomicznej i funkcjonalnej, umożliwiającej jednoczesne wykonywanie wielu zadań o typie analizy, integracji, oraz wytwarzania rytmu i jego synchronizacji zarówno wewnętrznej, jak i do warunków środowiska. Przypuszcza się, że sygnał okołodobowy wytworzony przez SCN jest następnie przenoszony wzdłuż szlaków eferentnych SCN, łączących zegar biologiczny z efektorowymi strukturami OUN. W strukturach tych, np. w szyszynce, dochodzi do przetworzenia rytmicznego sygnału neuronalnego (wytworzonego w SCN) w rytmiczny i charakterystyczny dla typu i funkcji struktury docelowej rytmiczny sygnał efektorowy (np. neuroendokryny w szyszynce).

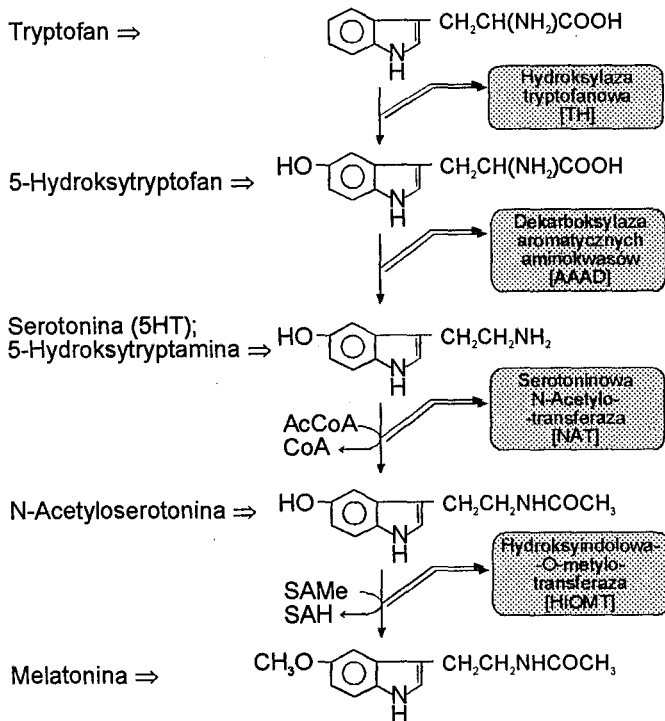
### ***Ekspresja genów kontrolowana przez zegar biologiczny***

Dotychczas opisano szereg genów, których ekspresja jest regulowana przez zegar biologiczny, np. u kręgowców – gen jodopsyny w komórkach fotoreceptorowych (Pierce i wsp., 1993), gen kodujący fotoreceptorowe białko „nocturnin” (Green i Besharse, 1996), gen kodujący fotoreceptorową i szyszynkową hydroksylazę tryptofanową (Florez i wsp., 1996; Green i wsp., 1995), czy zidentyfikowany w roku 1997 gen kodujący kluczowy enzym regulacyjny z toru biosyntezy melatoniny – serotoninową N-acetylotransferazę (NAT)(Bernard i wsp., 1997a,b). Ekspresja tego ostatniego genu charakteryzuje się silnie wyrażonym rytmem okołodobowym, ze szczytami w fazie ciemnej naturalnego bądź narzuconego (sztucznego) cyklu oświetleniowego środowiska. Produkt ekspresji – enzym NAT – jest szczególnie istotny dla funkcji zegara biologicznego, bowiem od jego obecności (a pojawia się on tylko w fazie ciemnej cyklu oświetleniowego) zależy rytmiczna w ciągu doby produkcja hormonu melatoniny, o przebiegu równoległym z rytmem dobowej aktywności NAT (patrz ryc. 1). Wyprodukowana w szyszynce melatonina

spełnia podwójną rolę: z jednej strony jest elementem systemu okołodobowego (ogniwo sprzężenia zwrotnego z mechanizmami dobowego oscylatora – patrz dalej), z drugiej zaś – sygnałem informującym organizm o porze dnia i roku. Rola melatoniny jako chemicznego zegara i kalendarza opiera się na cyklicznym pojawianiu się tego związku w organizmie. Poziomy melatoniny są niskie w ciągu dnia i wysokie w nocy, przy czym czasokres podwyższonych poziomów hormonu jest proporcjonalny do długości nocy (w zimie – długie noce oznaczają dłuższą w ciągu doby produkcję hormonu, natomiast w lecie – krótkie noce – krótszy czasokres syntezy związku). Ponadto, sygnał melatoninowy dostarcza informacji o zbliżającej się porze roku (wydłużający się dzień i proporcjonalne obniżenie produkcji melatoniny w sekwencji: zima→wiosna→lato, i odwrotnie, wydłużająca się noc i proporcjonalne zwiększenie syntezy hormonu w sekwencji: lato→jesień→zima). Ten ostatni aspekt ma ogromne znaczenie dla fizjologii wszystkich zwierząt.

### Melatonina – ogniwo mechanizmu sprzężenia zwrotnego w systemie okołodobowym

Melatonina (*N*-acetylo-5-metoksytryptamina) jest syntetyzowana z aminokwasowego prekursora L-tryptofanu głównie w szyszynce i, w mniejszym stopniu, w siatkówce (ryc. 6). Hormon szyszynkowy zostaje wydzielony do krwiobiegu



Ryc. 6. Biosynteza melatoniny z aminokwasowego prekursora L-tryptofanu

(i płynu mózgowo-rdzeniowego) i dociera następnie do wszystkich narządów w organizmie; jego inaktywacja zachodzi przede wszystkim w wątrobie (Reiter, 1991; Nowak i Zawilska, 1998). Z kolei melatonina zsyntetyzowana w siatkówce oka podlega szybkiej lokalnej degradacji, co jest zgodne z powszechnie akceptowaną tezą o jej roli jako siatkówkowego neuromodulatora (Zawilska i Nowak, 1992). W obu strukturach produkcja melatoniny przebiega w sposób rytmiczny, osiągając wysokie poziomy w nocy i niskie w dzień. W działaniach biologicznych melatoniny pośredniczą specyficzne dla niej receptory o nazwach  $Mel_{1a}$ ,  $Mel_{1b}$  i  $Mel_{1c}$  (Zawilska i Nowak, 1997b) i ich obecność decyduje o reaktywności komórki (narządu) na hormon.

Receptory melatoninowe mają zróżnicowane rozmieszczenie tkankowe (Zawilska i Nowak, 1997b). W OUN ssaków występowanie receptorów melatoninowych jest ograniczone tylko do pewnych struktur, wśród których trzy zasługują na wyróżnienie ze względu na dużą gęstość receptorów: część guzowata (*pars tuberalis*) przysadki mózgowej, siatkówka i SCN. Obecność receptorów melatoninowych w SCN determinuje wrażliwość zegara biologicznego na działanie hormonu.

Wyróżniamy dwa rodzaje oddziaływań melatoniny na spontaniczną aktywność bioelektryczną neuronów SCN, które przypominają efekty pulsu świetlnego, a mianowicie: efekt „ostry” – polegający na supresji aktywności bioelektrycznej i metabolicznej neuronów SCN (np. Stehle i wsp., 1989; Liu i wsp., 1997) i efekt „synchronizujący” – a więc przesuwały fazy rytmu aktywności SCN (np. Cassone i wsp., 1986; Lewy i wsp., 1992; Benloucif i Dubocovich, 1996; Liu i wsp., 1997). W wyniku supresyjnego działania melatoniny na aktywność neuronów SCN dochodzi do ich uniewrażliwienia na ewentualne uboczne sygnały o typie „synchronizującym”, mogące się pojawić zarówno w organizmie (sygnały endogenne, np. uwolnienie odpowiedniego neuroprzekaźnika w wyniku przypadkowej aktywacji systemu sygnałowego), jak i w środowisku (sygnały egzogenne, np. hałas wzmagający czujność zwierząt, uruchamiający w OUN kaskadę określonych procesów neurochemicznych). Efekt „synchronizujący” uważany jest za element systemu determinującego (światło) i korygującego (melatonina) okołodobowy rytm oscylatora z aktualnym rytmem egzogenным. Istota tego systemu polega na zharmonizowanym, lecz różnym w czasie, współdziałaniu dwóch czynników: światła – w dzień, i melatoniny – w nocy. Wymienione efekty hormonu pojawiają tylko w wąskim przedziale czasowym – pod koniec fazy jasnej cyklu oświetleniowego, a więc wówczas, kiedy gęstość receptorów melatoninowych jest najwyższa. W tym kontekście warto nadmienić, że np. u szczura czy chomika melatonina wywiera najsilniejszy wpływ na okołodobowy rytm aktywności ruchowej po jej wstrzyknięciu właśnie pod koniec fazy jasnej dobowego cyklu oświetleniowego.

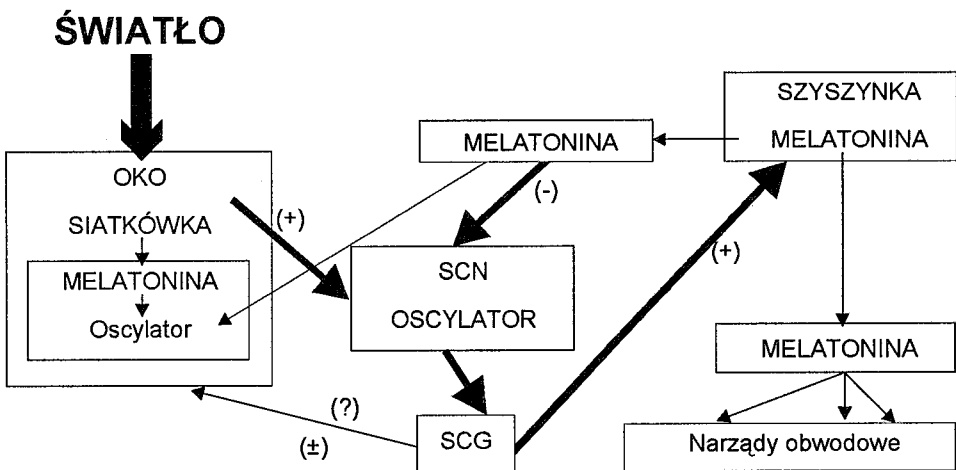
Dwie obserwacje wskazują na to, że działanie „synchronizujące” melatoniny wynika z jej bezpośredniego oddziaływania na SCN: (1) efekt hormonu był widoczny w badaniach *in vitro* na skrawkach przedniego podwzgórza zawierających



ŚCN (McArthur i wsp., 1991,1997; Starkey 1996) oraz (2) SCN gryzoni zawiera dużą liczbę receptorów melatoninowych (Dubocovich i wsp., 1994), których gęstość oscyluje w zależności od cyklu oświetleniowego środowiska, w którym przebywają zwierzęta (Laitinen i wsp., 1989).

Ostatnie badania wykonane w zespole S.M. Repperta na „normalnych” myszach (których SCN zawiera dwa typy receptorów:  $Mel_{1a}$  i  $Mel_{1b}$ ) i mutantach nie posiadających receptora  $Mel_{1a}$  wykazały, że efekt „ostry” melatoniny wymaga obecności receptora  $Mel_{1a}$ , natomiast efekt „synchronizujący” – receptora  $Mel_{1b}$  (Liu i wsp., 1997). Zatem, dwa funkcjonalnie różne oddziaływania melatoniny na zegar biologiczny wynikają z uruchomienia odrębnych mechanizmów związanych z pobudzeniem dwóch podtypów receptorów melatoninowych.

Nasza wiedza nt. funkcjonowania zegara biologicznego i roli melatoniny jako regulatora w systemie okołodobowym staje się coraz bogatsza. W oparciu o aktualne dane można nakreślić zarys obrazu mechanizmów „zegarowych” u ssaków wraz z interakcją: melatonina → oscylator (ryc. 7).



Ryc. 7. Interakcje i rola melatoniny w obrębie systemu okołodobowego kręgowców. SCN – jądra nadskrzyżowaniowe podwzgórza, SCG – zwój górny szyjny. Objasnienia w tekście

Neurony SCN generują uwarunkowane genetycznie rytmy aktywności bioelektrycznej i metabolicznej o okresie trwania pełnego cyklu 16-32 godziny. W wyniku interakcji interneuronalnych w obrębie zegara dochodzi do częściowego zsynchronizowania rytμών (do okresu  $\approx 24$  godzin). Pełna synchronizacja rytμών z rytmem egzogennym, wytyczanym przez następstwo dnia i nocy, jest związana z rytmicznie pojawiającym się sygnałem świetlnym odbieranym przez fotoreceptory siatkówki. U ssaków spontaniczna aktywność bioelektryczna i metaboliczna neuronów SCN jest najwyższa w fazie jasnej dobowego cyklu oświetleniowego. W tej samej fazie impulsacja szlaku współczulnego łączącego

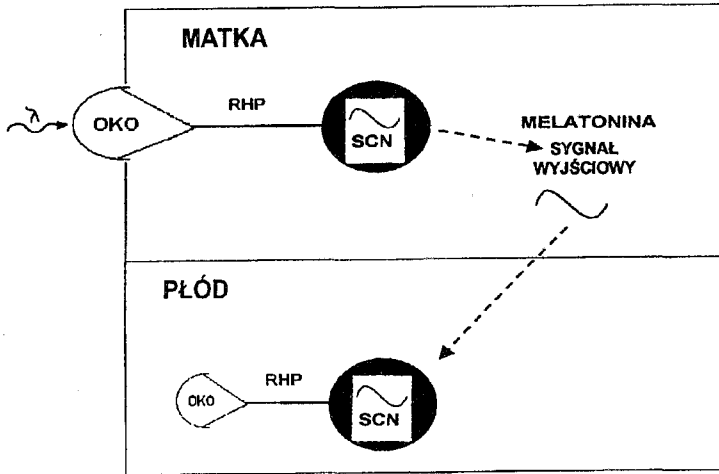
(unerwiane przez SCN) zwoje górne szyjne (SCG) z szyszynką jest znikoma<sup>5</sup>. W konsekwencji, wydzielanie neuroprzekaźnika noradrenaliny (NA) z zakończeń współczulnych unerwiających pinealocyty jest w tej fazie bardzo niskie. Z nastaniem nocy dochodzi do odwrócenia o 180° natężenia wymienionych parametrów. Pojawienie się NA w szczelinie synaptycznej powoduje jednoczesne pobudzenie szyszynkowych receptorów adrenergicznych typu  $\beta$  (dodatnio sprzężonych z cyklazą adenylanową) oraz typu  $\alpha_1$  (sprzężonych z fosfolipazą C), co prowadzi do uruchomienia we wnętrzu pinealocytów kaskady procesów (w uproszczeniu): zwiększenie produkcji cAMP  $\rightarrow$   $\uparrow$  aktywności cAMP-zależnej kinazy białkowej (PKA)  $\rightarrow$   $\uparrow$  ekspresji genu kodującego aktywność serotoninowej N-acetylotransferazy (NAT)  $\rightarrow$   $\uparrow$  produkcji melatoniny. Wydzielona (w nocy) z miejsc syntezy do krwiobiegu i płynu mózgowo-rdzeniowego melatonina dociera do SCN, gdzie wchodzi w interakcję z receptorami  $Mel_{1a}$  – prowadząc do supresji aktywności bioelektrycznej i metabolicznej neuronów zegara biologicznego, i receptorów  $Mel_{1b}$  – związanych z działaniem „synchronizującym” hormonu. Wydaje się prawdopodobne, że sygnał melatoninowy pojawiający się w określonym czasokresie doby koordynuje – na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego – rytmy aktywności okołodobowej neuronów SCN, przyczyniając się do powstania jednolitego rytmu zegara biologicznego. Ponadto, zależny od długości fazy ciemnej cyklu oświetleniowego wzrost syntezy i poziomów melatoniny, wraz z jej oddziaływaniem supresyjnym na aktywność neuronów „zegarowych”, będzie utrzymywał neurony SCN w stanie niewrażliwym na uboczne sygnały „synchronizujące” – zarówno endogenne, jak i egzogenne (patrz wyżej). Gęstość receptorów melatoninowych w SCN wykazuje rytm dobowy z fazą odwrotną do poziomów hormonu; nasilającej się w czasie (od chwili nastania nocy) syntezy melatoniny towarzyszy spadek ilości receptorów. Zjawisko to najprawdopodobniej leży u podstaw zachowania homeostazy informacyjnej: melatonina  $\rightarrow$  SCN. Należy pamiętać, że w warunkach naturalnych przejście dnia w noc (i odwrotnie) nie jest procesem nagłym (jak to najczęściej ma miejsce w warunkach eksperymentu), ale zachodzi stopniowo. W czasie zmierzchu i świtu stopniowo uruchamiają się mechanizmy właściwe dla określonej pory dnia i właśnie w tych przedziałach czasowych – jak się przypuszcza – rola „powstającej” melatoniny jako sygnału zwrotnego dla SCN będzie najistotniejsza.

Inną ważną rolą melatoniny, o której należy pamiętać w kontekście interakcji z zegarem biologicznym, jest jej rola jako dawcy czasu dla płodu. Melatonina łatwo penetruje przez błony biologiczne; zatem hormon pochodzący od matki bez trudu przechodzi przez łożysko i po dotarciu do tkanek płodu pełni

---

<sup>5</sup> Nieznane są mechanizmy, na drodze których dochodzi do funkcjonowania „odwrócenia” rytmu aktywności bioelektrycznej zwojów górnych szyjnych (*superior cervical ganglia*; SCG) względem SCN. Szlak łączący SCN z SCG jest szlakiem polisynaptycznym, a substancje sygnałowe wykorzystywane przez poszczególne neurony tego szlaku w dużej części nie są zidentyfikowane.

rolę chemicznego informatora (synchronizatora) dla kształtujących się rytmów we wzrastającym organizmie; ta funkcja melatoniny jest szczególnie istotna w końcowym okresie rozwoju embrionalnego (ryc. 8).



Ryc. 8. Rola melatoniny jako sygnału okołodobowego dla rozwijającego się płodu w łonie matki

Poznanie roli melatoniny jako jednego z sygnałów kontrolujących rytmikę dobowego oscylatora (efekty „ostre” i „synchronizujące” – przesuwające fazy rytmu) ma również aspekt praktyczny. Dostarczony do organizmu o odpowiedniej porze doby hormon (w postaci np. tabletek, kapsulek, lingwetek), bądź związek agonistyczny wobec receptorów melatoninowych (np. S-20098; Martinet i wsp., 1996), będzie działał podobnie jak związek endogeny. Melatonina, jako jeden z podstawowych czynników kontrolujących okołodobowe rytmy biologiczne, głównie rytm sen-czuwanie, może zatem stanowić podstawę terapii tych zaburzeń snu, u podstaw których leży dysfunkcja zegara biologicznego. Daleko zaawansowane badania kliniczne dowodzą, że melatonina jest skutecznym lekiem w terapii tzw. chronobiologicznych zaburzeń snu, a więc takich jak: zespół opóźnionej/przyspieszonej fazy snu, zaburzenia snu w przebiegu pracy zmianowej, u osób niewidomych i pacjentów geriatrycznych (włącznie z pacjentami cierpiącymi na chorobę Alzheimer’a), zaburzenia snu (oraz innych rytmów biologicznych) powstałych na skutek szybkiego przekraczania stref czasowych (tzw. choroba „długu czasowego” albo „transatlantycka”; ang. *jet-lag*), zaburzenia snu u dzieci autystycznych (Nowak i Zawilska, 1996, 1998; Zawilska i Skalski, 1996; Zawilska i Nowak, 1997a).

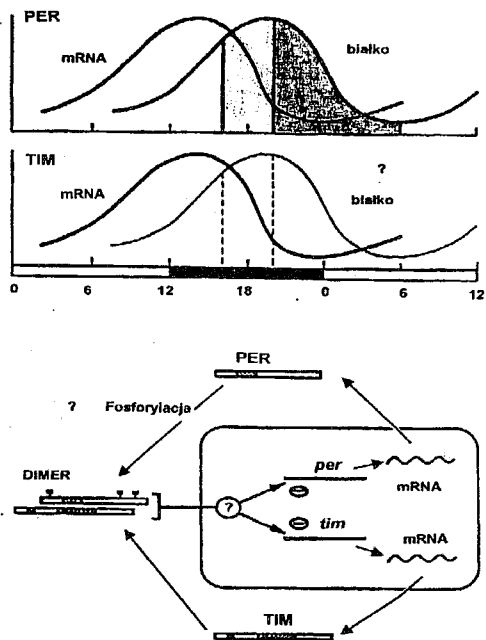
### Identyfikacja genów „zegarowych” u *Drosophila* i *Neurospora* – molekularny model funkcjonowania dobowego oscylatora

W roku 1971 Ronald J. Konopka i Seymour Benzer jako pierwsi wykryli u muszki owocowej *Drosophila* gen „zegarowy” odpowiedzialny za wyznaczanie

długości okresu rytmu aktywności ruchowej i rytmu wylęgu z poczwarek; nadali mu nazwę *period* (*per*). Poddając zwierzęta działaniu mutagenów autorzy zaobserwowali wystąpienie trzech mutacji genu *per*: mutacji *per<sup>S</sup>* powodującej skrócenie okresu rytmu do 19 godzin, mutacji *per<sup>L</sup>* – odpowiedzialnej za wydłużenie rytmu do 29 godzin, oraz mutacji *per<sup>O</sup>* – powodującej całkowity zanik rytmiki. Wyizolowanie w I połowie lat 80. genu *per* zaowocowało licznymi dalszymi badaniami w dziedzinie biologii molekularnej rytmiki okołodobowej. Wykazano, że poziomy *per*-RNA jak i produktu ekspresji genu *per*, tj. białka PER, w istocie wykazują okołodobowe oscylacje zgodne z cyklami świetlnymi środowiska, jak również oscylacje swobodnie biegnące w warunkach środowiska bezsygnalowego. Wykazano również, że w obecności PER dobowe oscylacje PER-mRNA ulegały spłaszczeniu, a nawet eliminacji (przy odpowiednio wysokim stężeniu białka), wskazując na istnienie mechanizmu ujemnego sprzężenia zwrotnego leżącego u podstaw omawianego rytmu. Równoległe do badań na muszce owocowej prowadzone były inne badania nad rytмами okołodobowymi u *Neurospora*, uwieńczone opisaniem u tych organizmów genu „zegarowego” o nazwie *frequency* (*frq*) (Aronson i wsp., 1994); jego ekspresja wykazuje rytmikę podobną do rytmiki ekspresji genu *per*. Te pionierskie badania definitywnie wykazały, że PER-mRNA i FRQ-mRNA kodujące białka „zegarowe” PER i FRQ są produkowane w regularnym cyklu 24-godzinnym; w przypadku *Drosophila* procesy te zachodzą w tych komórkach mózgu, które u muszki pełnią funkcję dobowego oscylatora. Zarówno PER jak i FRQ okazały się być czynnikami transkrypcyjnymi, a więc białkami regulatorowymi kontrolującymi ekspresję innych genów.

Intensywnie prowadzone badania nad rytмами okołodobowymi u *Drosophila* doprowadziły zaledwie kilka lat temu do wykrycia nowej mutacji zlokalizowanej na chromosomie 2 nazwanej *timeless* (*tim*), która wywołuje zachowania arytmiczne i – co istotne – powoduje supresję okołodobowych oscylacji PER-mRNA. Mutacja *tim* hamowała ekspresję *per*, ale przede wszystkim regulowała translokację białka PER do jądra komórkowego (Sehgal i wsp., 1994, 1995; Vosshall i wsp., 1994; Myers i wsp., 1995; Gekakis i wsp., 1995). Wyizolowanie genu „zegarowego” *tim* i wykazanie funkcjonalnej interakcji pomiędzy *tim* i *per* rzuciło nowe światło na mechanizmy zegara biologicznego (Barinaga, 1995; Hall, 1995; Reppert i Sauman, 1995; Sehgal i wsp., 1996). Rycina 9 w dużym uproszczeniu przedstawia zależności *per-tim* w kontekście rytmiki okołodobowej i dobowego cyklu oświetleniowego środowiska.

Geny *per* i *tim*, oraz produkty ich ekspresji – białka PER i TIM, są integralnymi elementami molekularnymi mechanizmu zegarowego u *Drosophila*. W procesie transkrypcji obu genów powstają odpowiednie łańcuchy PER-mRNA i TIM-mRNA, które po opuszczeniu jądra komórkowego uruchamiają w cytosolu procesy syntezy białka PER i TIM. Białko PER jest supresorem transkrypcji zarówno genu *per* jak i genu *tim* (podobna rola białka TIM nie jest jak dotychczas definitywnie dowiedziona). Jednakże, zanim dojdzie do zahamowania



Ryc. 9. Mechanizmy zegara biologicznego na poziomie genów u muszki owocowej *Drosophila melanogaster* – model funkcjonowania dobowego oscylatora

przez PER ekspresji obu genów, białko to musi wnikać do jądra komórkowego. Proces ten następuje w ściśle określonym czasokresie cyklu okołodobowego i znajduje się pod kontrolą białka TIM. Ponadto, translokacja PER jest poprzedzona częściowym ufosforylowaniem jego cząsteczki. Sądzi się, że nadmierne ufosforylowanie PER może być sygnałem uruchamiającym procesy proteolityczne odpowiedzialne za szybką degradację białka pod koniec cyklu okołodobowego. Zależna od TIM kontrola stężenia (i działania) PER polega na heterodimeryzacji w cytosolu obu białek, co w specyficzny sposób warunkuje wejście PER do jądra komórkowego. Pojawienie się białka TIM w zdefiniowanym (przez czynniki środowiskowe – patrz dalej) czasokresie doby, oraz interakcja pomiędzy TIM i PER, decyduje zatem nie tylko o cytosolowej kumulacji PER, ale także o cyklicznej translokacji PER do miejsca jego działania, a więc decyduje o jego jądrowej lokalizacji. Zasadniczą częścią molekularnej maszyny leżącej u podstaw wytwarzania rytmu jest występowanie opóźnienia pomiędzy ekspresją odpowiednich genów a hamowaniem transkrypcji przez własne produkty białkowe (bez tego opóźnienia ekspresja genów osiągnęłaby stan równowagi, tracąc zdolność wytworzenia sygnału okołodobowego). Zależna od

stężenia heterodimeryzacja PER-TIM, tak istotna dla uruchomienia ujemnego sprzężenia zwrotnego w odniesieniu do procesu transkrypcji, staje się funkcjonalnym substratem dla takiego opóźnienia.

Regulacyjna rola *tim* polega również – a może przede wszystkim – na tym, że dobowe oscylacje TIM podlegają precyzyjnej regulacji przez warunki oświetlenia środowiska. Otóż, poziomy TIM ulegają obniżeniu pod koniec nocy (albo fazy ciemnej sztucznego cyklu oświetleniowego światło-ciemność) – znacznie wcześniej niż poziomy PER – i utrzymują się na niskim pułapie przez okres całego dnia. Ponadto, stymulacja świetlna zastosowana o każdej porze doby powoduje zahamowanie ekspresji *tim* w neuronach „zegarowych” muszki owocowej, tj. w tzw. neuronach bocznych głowy oraz w komórkach fotoreceptorowych. Ekspresja „fotoreceptorowa” zanika w ciągu 30 min., podczas gdy ekspresja *tim* w neuronach bocznych utrzymuje się dłużej, jednakże z reguły nie przekracza 90 min. (Hunter-Ensor i wsp., 1996).

Opisana zależność ekspresji *tim* od światła jest najprawdopodobniej najważniejszym czynnikiem w tworzeniu opóźnienia pomiędzy poziomami TIM-mRNA i PER-mRNA z jednej strony a szczytowymi poziomami TIM i PER – z drugiej. Biorąc pod uwagę dwa fakty: (1) niezbędność TIM dla utrzymania stabilności PER (Price i wsp., 1995) oraz (2) wrażliwość ekspresji *tim* na światło, można przyjąć, że synteza i kumulacja zarówno PER, jak i TIM może odbywać się tylko pod koniec dnia i na początku nocy. Wzrosty poziomów mRNA kodujących oba białka obserwuje się już w połowie dnia (lub fazy jasnej sztucznego cyklu oświetleniowego). Akumulacja PER i TIM jest zatem zdecydowanie opóźniona w czasie (opóźnienie potranskrypcyjne) w stosunku do odpowiadających im cząsteczek mRNA. Innymi słowy, *tim* wydaje się regulować okołodobowe rytmy transkrypcji *per* i *tim* na drodze mechanizmu ograniczającego kumulację PER-mRNA i białka PER do określonych czasokresów cyklu okołodobowego.

Powyższy schemat molekularnych mechanizmów „zegarowych” z pewnością nie jest ostateczny i należy oczekiwać, że nowe dane doświadczalne będą zarówno uzupełniać, jak i weryfikować dotychczasowy obraz zjawisk. Aktualnie prowadzone są intensywne badania na różnych modelach, wśród nich na hodowanych komórkach szyszynki ptaków – pinealocytach (głównie kurcząt; np. Bernard i wsp., 1997a,b), oraz na preparatach *eye-cups* żaby (Green i Besharse, 1996), jak również na hodowanych fotoreceptorach siatkówki kurcząt (Bernard i wsp., 1997b). Dotychczas zidentyfikowane mechanizmy „zegarowe” u ptaków i płazów wykazują wiele wspólnych cech biochemicznych i czynnościowych, oraz wiele podobieństw z mechanizmami opisywanymi u gryzoni. Jednakże, kwestią najbardziej interesującą nas i większość chronobiologów jest to, czy procesy obserwowane u organizmów zajmujących niskie szczeble drabiny ewolucyjnej mogą być przekładane na mechanizmy zachodzące u zwierząt charakteryzujących się złożoną budową i dużą specjalizacją funkcji. Wydaje się bardzo prawdopodobne, że odrębność gatunkowa i rozwój filogenetyczny będą rzutować na szczegóły, natomiast ogólna zasada działania zegara biolo-

gicznego może być podobna u wszystkich przedstawicieli świata ożywionego, z ludźmi włącznie.

Próg do jakościowo nowej ery badań rytmiki okołodobowej u ssaków już został przekroczony. Tym progiem było sklonowanie przez grupę Josepha S. Takahashi'ego z Evanston (USA.) genu „zegarowego” *clock* u myszy (Vitaterna i wsp., 1994; King i wsp., 1997). U zwierząt tych wykryto dwa geny o dużym stopniu homologii z genem *per* muszki owocowej, które nazwano *Per1* i *Per2*. Ekspresja tych genów wykazywała rytmikę okołodobową i występowała w SCN oraz w oczach (Shearman i wsp., 1997). Obecność *Per1* i *Per2* stwierdzono również w tkankach człowieka (Shearman i wsp., 1997). Ostatnie prace donoszą, że ekspresja genu *vgf* wyizolowanego z SCN mózgu chomika podlega regulacji świetlnej i wykazuje rytmikę okołodobową (Wisor i Takahashi, 1997). Być może *vgf* jest właśnie genem „zegarowym” u chomika; chociaż, z drugiej strony, gen ten może być częścią mechanizmu efektorowego zegara biologicznego. Najbliższe badania tę kwestię rozstrzygną. Biorąc pod uwagę niebywałą intensywność prowadzonych badań można mieć nadzieję, że być może już w niedługim czasie poznamy ludzki odpowiednik genów *clock* i *vgf*, które, razem z genami *Per1* i *Per2*, będą decydować o funkcji zegara biologicznego w naszym organizmie.

## Podsumowanie i perspektywy

*The biological clock: it's all in the genes*

Joseph S. Takahashi (1995)

Pomiar czasu w systemach biologicznych interesował ludzkość od dawna; jednakże zasadniczy postęp w zrozumieniu mechanizmów zawiadujących funkcją zegara biologicznego nastąpił w ostatnim ćwierćwieczu. W tym czasie pojęcie zegara biologicznego (okołodobowego oscylatora, rozrusznika), zyskało konkretną podbudowę neuroanatomiczną, molekularną i czynnościową. Prowadzone przez liczne rzesze naukowców – chronobiologów – badania umożliwiają dokonanie pewnych ogólnych ustaleń dotyczących kręgowców:

1. Pomimo ogromnego zróżnicowania organizacji systemu okołodobowego na poziomie fizjologicznym, tylko kilka struktur OUN pełni funkcję okołodobowego oscylatora. Są to: jądra nadskrzyżowaniowe podwzgórza (SCN) – u ssaków, szyszynka – u ptaków, i siatkówka – u płazów. U ssaków, te trzy struktury współpracują ze sobą tworząc okołodobowy system odpowiedzialny za regulację rytmów behawioralnych.
2. Zdolność pojedynczych komórek: neuronów SCN, pinealocytów szyszynki i fotoreceptorów siatkówki, do wytwarzania okołodobowej rytmiki bioelektrycznej i metabolicznej sugeruje komórkowy charakter zegara biologicznego. Należy podkreślić, że pinealocyty ptaków i niższych kręgowców oraz fotoreceptory wielu gatunków zwierząt (z ssakami włącznie),

posiadając zdolność do jednoczesnej fotorecepcji, odmierzania czasu i biosyntezy melatoniny, funkcjonują jak jednokomórkowe systemy okołodobowe.

3. Endogenny okołodobowy rytm zegara biologicznego podlega synchronizacji z egzogennym dobowym rytmem (bądź rytмами) środowiska. Najważniejszym synchronizatorem (dawcą czasu) jest bodziec świetlny, który w warunkach naturalnych jest zdeterminowany następstwem dnia i nocy. Informacja o warunkach oświetlenia środowiska jest przekazywana do zegara biologicznego w różny sposób, jednakże charakterystyczny dla gatunku (szlakiem siatkówkowo-podwzgórzowym u ssaków, czy w wyniku bezpośredniej percepcji u np. ptaków).
4. Melatonina, hormon szyszynkowy, produkowana tylko w nocy (lub w fazie ciemnej dobowego cyklu oświetleniowego: światło-ciemność) wydaje się pełnić rolę sygnału zwrotnego w systemie okołodobowym. Melatonina wywiera dwa różne działania na pracę SCN: efekt „ostry” supresyjny na aktywność bioelektryczną i metaboliczną neuronów SCN, oraz efekt „synchronizujący”, a więc przesuwały fazy rytmu aktywności zegara.
5. Wyniki badań prowadzonych na organizmach reprezentujących różne szczeble filogenezy wskazują na uniwersalność zasad funkcjonowania zegara biologicznego.
6. Okołodobowe wytwarzanie rytmu zegara biologicznego wymaga cyklicznej syntezy białka i jest uwarunkowane rytmiczną ekspresją określonych genów, np. genów „zegarowych” *frq*, *per*, *tim*, *clock*, *Per1* i *Per2* zidentyfikowanych u różnych organizmów.

Wyniki wielu badań, szczególnie tych ostatnich – prowadzonych z zastosowaniem technik biologii molekularnej – wskazują, że tajemnica zegara biologicznego tkwi w genach. Druga połowa lat 80. i lata 90. to okres niesłychanego przyspieszenia badań chronobiologicznych. Poznajemy coraz więcej szczegółów z zakresu organizacji molekularnej zegara biologicznego, a zasada jego działania staje się bardziej wyrazista i zrozumiała. Niewątpliwym imperatywem do intensyfikacji dalszych badań jest powszechność rytmów okołodobowych i ich fundamentalne znaczenie dla funkcji każdego organizmu i kontynuacji szeroko pojętego życia na Ziemi. Nie dziwi zatem fakt, iż chronobiologia (wraz z jej rozgałęzieniami w postaci chronofizjologii, chronofarmakologii czy chronopatologii) przeżywa nienotowany dotychczas rozkwit. Taki stan rzeczy nie może dziwić również i z tego powodu, że człowiek współczesny – cywilizowany świadomie wymyka się z uwarunkowań naturalnych, co może być (a u wielu z nas już jest) źródłem różnorodnych patologii i dysfunkcji organizmu. BOWIEM PRAWDLIWY ODBIÓR I WŁAŚCIWA INTERPRETACJA narzuconych przez Wszechświat zmieniających środowiskowych przez każdy organizm ma zasadnicze znaczenie dla przebiegu takich procesów fizjologicznych, które są odpowiednie dla danej pory dnia i roku – zgodnie z wytycznymi natury.



**Piśmiennictwo**

- Ali M.A. (Ed.): Rhythms in Fishes. NATO ASI Series A: Life Sciences, vol. 236, Plenum Press, New York, 1992.
- Arendt J.: Biological rhythms. *Int. Med.*, 1983, 3, 6-9.
- Aronson B.D., Johnson K.A., Loros J.J., Dunlap J.C.: Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation of the clock gene *frequency*. *Science*, 1994, 263, 1578-1584.
- Aschoff J.: Comparative Physiology: diurnal rhythms. *Ann. Rev. Physiol.*, 1963, 25, 581-600.
- Aschoff J.: Circadian rhythms in man. *Science*, 1963, 148, 1427-1432.
- Barinaga M.: New clock gene cloned. *Science*, 1995, 270, 732-733.
- Benloucif S., Dubocovich M.L.: Melatonin and light induce phase shifts of circadian rhythms in the C3H/HeN mouse. *J. Biol. Rhythms*, 1996, 11, 113-125.
- Bernard M., Klein D.C., Zatz M.: Chick pineal clock regulates serotonin N-acetyltransferase mRNA rhythm in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 304-309.
- Bernard M., Iuvone P.M., Cassone V.M., Roseboom P.H., Coon S.L., Klein D.C.: Avian melatonin synthesis: photic and circadian regulation of serotonin N-acetyltransferase mRNA in the chicken pineal gland and retina. *J. Neurochem.*, 1997, 68, 213-224.
- Block G.D., Khalsa S.B.S., McMahon D.G., Geusz M.S.: Biological clocks in the retina: cellular mechanisms of biological timekeeping. *Int. Rev. Cytol.*, 1993, 146, 83-144.
- Boivin D.B., Duffy J.F., Kronauer R.E., Czeisler C.A.: Dose-response relationships for resetting of human circadian clock by light. *Nature*, 1996, 379, 540-542.
- Bouskila Y., Dudek F.E.: Can a population of suprachiasmatic nucleus neurons with different period lengths produce a stable circadian rhythm? *Brain Res.*, 1995, 670, 333-336.
- Brady J. (Ed.): Biological Timekeeping. Cambridge University Press, Cambridge, 1982.
- Cahill G.M., Besharse J.C.: Circadian rhythmicity in vertebrate retinas: regulation by a photoreceptor oscillator. *Prog. Retinal Eye Res.*, 1995, 14, 267-291.
- Cassone V.M.: Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci.*, 1990, 13, 457-463.
- Cassone V.M., Chesworth M.J., Armstrong S.M.: Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol. Behav.*, 1986, 36, 1111-1121.
- Colwell C.S., Khalsa S.B.S., Block G.D.: Cellular mechanisms of entrainment. *Chronobiol. Int.*, 1992, 9, 163-179. Ebling F.P.: The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Prog. Neurobiol.*, 1996, 50, 109-132.
- Dubocovich M.K., Benloucif S., Masana M.I.: Melatonin receptors in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *Behav. Brain Res.*, 1996, 73, 141-147.
- Edmunds L.N.: Cellular and molecular aspects of circadian oscillators: models and mechanisms for biological timekeeping. W: Y. Touitou, E. Haus (Eds.): *Biologic Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine*. Springer-Verlag, Berlin, 1992, 35-54.
- Florez J.C., Seidenman K.J., Barrett R.K., Sangoram A.M., Takahashi J.S.: Molecular cloning of chick pineal tryptophan hydroxylase and circadian oscillation of its mRNA levels. *Mol. Brain Res.*, 1996, 42, 25-30.
- Gekakis N., Saez L., Delahaye-Brown A.M., Myers M.P., Seghal A., Young M.W., Weitz C.J.: Isolation of *timeless* by PER protein interaction: defective interaction between *timeless* protein and long-period mutant PER<sup>L</sup>. *Science*, 1995, 270, 811-815.
- Gillette M.U.: Electrophysiology in vitro: rhythmic activity and endogenous clock properties. W: D.C. Klein, R.Y. Moore, S.M. Reppert (Eds.): *Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock*. Oxford University Press, Oxford, 1991, 125-143.
- Gillette M.U., Prosser R.A.: Circadian rhythm of the rat suprachiasmatic brain slice is rapidly reset by daytime application of cAMP analogs. *Brain Res.*, 1988, 474, 348-352.
- Green C.B., Cahill G.M., Besharse J.C.: Regulation of tryptophan hydroxylase expression by a retinal circadian oscillator in vitro. *Brain Res.*, 1995, 677, 283-290.

- Green C.B., Besharse J.C.: Identification of a novel vertebrate circadian clock-regulated gene encoding the protein nocturnin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 14884-14888.
- Hall J.C.: Tripping along the trail to the molecular mechanisms of biological clocks. *Trends Neurosci.*, 1995, 18, 230-240.
- Hastings M.: Circadian rhythms: peering into the molecular clockwork. *J. Neuroendocrinol.*, 1995, 7, 331-340.
- Hunter-Ensor M., Ousley A., Seghal A.: Regulation of the *Drosophila* protein timeless suggests a mechanism for resetting the circadian clock by light. *Cell*, 1996, 84, 677-685.
- Iuvone P.M., Gan J., Avendano G.: K<sup>+</sup>-Evoked depolarization stimulates cyclic AMP accumulation in photoreceptor-enriched retinal cell cultures: role of calcium influx through dihydropyridine-sensitive calcium channels. *J. Neurochem.*, 1991, 57, 615-621.
- Jacklet J.W.: Neurobiology of circadian rhythms generators. *Trends Neurosci.*, 1985, 8, 69-73.
- King D.P., Zhao Y., Sangoram A.M., Wilsbacher L.D., Tanaka M., Antoch M.P., Steeves T.D.L., Vitaterna M.H., Kornhauser J.M., Lowrey P.L., Turek F.W., Takahashi J.S.: Positional cloning of the mouse circadian *clock* gene. *Cell*, 1997, 89, 641-653.
- Klein D.C., Moore R.Y., Reppert S.M. (Eds.): *Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock*. Oxford University Press, Oxford, 1991.
- Kornhauser J.M., Mayo K.E., Takahashi J.S.: Light, immediate-early genes, and circadian rhythms. *Behav. Genet.*, 1996, 26, 221-240.
- Laakso M.L., Hatonen T., Stenberg D., Alila A., Smith S.: One-hour exposure to moderate illuminance (500 lux) shifts the human melatonin rhythm. *J. Pineal Res.*, 1993, 15, 21-26.
- Laitinen J.T., Castren E., Vakkuri O., Saavedra J.M.: Diurnal rhythm of melatonin binding in the rat suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology*, 1989, 124, 1585-1587.
- Lewy A.J., Ahmed S., Jackson J.M.: Melatonin shifts human circadian rhythms according to a phase-response curve. *Chronobiol. Int.*, 1992, 9, 380-392.
- Lewy A.J., Wehr T.A., Goodwin F.K., Newsome D.A., Markey S.P.: Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science*, 1980, 210, 1267-1269.
- Liu C., Weaver D.R., Jin X., Shearman L.P., Pieschl R.L., Gribkoff V.K., Reppert S.M.: Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*, 1997, 19, 91-102.
- Martinet L., Guardiola-Lemaître B., Mocaer E.: Entrainment of circadian rhythms by S-20098, a melatonin agonist, is dose and plasma concentration dependent. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1996, 54, 713-718.
- McArthur A.J., Gillette M.U., Prosser R.A.: Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res.*, 1991, 565, 158-161.
- McArthur A.J., Hunt A.E., Gillette M.U.: Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology*, 1997, 138, 627-634.
- Medanic M., Gillette M.U.: Serotonin regulates the phase of the rat suprachiasmatic circadian pacemaker in vitro only during the subjective day. *J. Physiol.*, 1992, 450, 629-642.
- Meijer J.H., Rietveld W.J.: Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol. Rev.*, 1989, 69, 671-707.
- Meyer-Bernstein E.L., Blanchard J.H., Morin L.P.: The serotonergic projection from the median raphe nucleus to the suprachiasmatic nucleus modulates activity phase onset, but not other circadian rhythm parameters. *Brain Res.*, 1997, 755, 112-120.
- Menaker M., Takahashi J.S., Eskin A.: The physiology of circadian pacemakers. *Ann. Rev. Physiol.*, 1978, 40, 501-526.
- Minors D.S., Waterhouse J.M.: Circadian rhythms and their mechanisms. *Experientia*, 1986, 42, 1-13.
- Moore R.Y.: The organization of the human circadian timing system. *Prog. Brain Res.*, 1992, 93, 101-117.
- Mrosovsky N.: Locomotor activity and non-photic influences on circadian clocks. *Biol. Rev.*, 1996, 71, 343-372.
- Myers M.P., Wager-Smith K., Wesely C.S., Young M.W., Seghal A.: Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, *timeless*. *Science*, 1995, 270, 805-808.

- Nakagawa S., Hasegawa Y., Tokushige A., Kubozono T., Nakano K.: Retinal projection to the formatio reticularis tegmenti mesencephali in the Old World monkeys. *Exp. Brain Res.*, 1988, 69, 373-377.
- Nikaido S.S., Takahashi J.S.: Calcium modulates circadian variation in cAMP-stimulated melatonin in chick pineal cells. *Brain Res.*, 1996, 716, 1-10.
- Nowak J.Z., Zawilska J.B.: Signal transduction mechanisms related to melatonin biosynthesis and receptors in the vertebrate retina. *Adv. Pineal Res.*, 1994, 8, 215-227.
- Nowak J.Z., Zawilska J.B.: Melatonina jako koordynator rytmów biologicznych: regulacja biosyntezy, działania fizjologiczne i znaczenie terapeutyczne. *Lęk i depresja*, 1996, 1, 189-211.
- Nowak J.Z., Zawilska J.B.: Melatonin and its physiological and therapeutic properties. *Pharmacy World Sci.* 1998 (w druku).
- Pierce M.E., Sheshberadaran H., Zhang Z., Fox L.E., Applebury M.L., Takahashi J.S.: Circadian regulation of iodopsin gene expression in embryonic photoreceptors in retinal cell culture. *Neuron*, 1993, 10, 579-584.
- Pittendrigh C.S.: Circadian systems: general perspective. W: *Handbook of Behavioral Neurobiology* (Ed. Aschoff J.), vol. 4, Plenum Press, New York, 1965, str. 57-80.
- Prosser R.A., Gillette M.U.: The mammalian circadian clock in the suprachiasmatic nuclei is reset *in vitro* by cAMP. *J. Neurosci.*, 1989, 9, 1073-1081.
- Prosser R.A., McArthur A.J., Gillette M.U.: cGMP induces phase shifts of a mammalian circadian pacemaker at night, in antiphase to cAMP effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 6812-6815.
- Ralph M.R., Lehman M.N.: Transplantation: a new tool in the analysis of the mammalian hypothalamic circadian pacemaker. *Trends Neurosci.*, 1991, 14, 362-366.
- Reiter R.J.: Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1991, 79, C153-C158.
- Reiter R.J.: Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.*, 1991, 12, 151-180.
- Reme C.E., Wirz-Justice A., Terman M.: The visual input stage of the mammalian circadian pacemaking system: I. Is there a clock in the mammalian eye? *J. Biol. Rhythms*, 1991, 6, 5-29.
- Reppert S.M., Weaver D.R.: Forward genetic approach strikes gold: cloning mammalian *clock* gene. *Cell*, 1997, 89, 487-490.
- Reppert S.M., Sauman I.: *period* and *timeless* tango: a dance of two clock genes. *Neuron*, 1995, 15, 983-986.
- Rusak B.: The mammalian circadian system: models and physiology. *J. Biol. Rhythms*, 1989, 4, 121-134.
- Sehgal A., Price J.L., Man B., Young M.W.: Loss of circadian behavioral rhythms and *per* RNA oscillations in the *Drosophila* mutant *timeless*. *Science*, 1994, 263, 1603-1606.
- Sehgal A., Rothenfluh-Hilfiker A., Hunter-Ensor M., Chen Y., Myers M.P., Young M.W.: Rhythmic expression of *timeless*: a basis for promoting circadian cycles in *period* gene autoregulation. *Science*, 1995, 270, 808-810.
- Shearman L.P., Zylka M.J., Weaver D.R., Kolakowski L.F., Reppert S.M.: Two *period* homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron*, 1997, 19, 1261-1269.
- Shigenobu S., Watanabe A., Hamada T., Ono M., Watanabe S.: N-Methyl-D-aspartate induces phase shifts in circadian rhythm of neuronal activity of rat SCN *in vitro*. *Am. J. Physiol.* 1994, 267 (RICP 36), R360-R364.
- Stehle J., Vanecek J., Vollrath V.: Effects of melatonin on spontaneous electrical activity of neurons in rat suprachiasmatic nuclei: an *in vitro* iontophoretic study. *J. Neural Transm.*, 1989, 78, 173-177.
- Takahashi J.S.: Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. *Ann. Rev. Neurosci.*, 1995, 18, 531-553.
- Takahashi J.S., Murakami N., Nikaido S.S., Pratt B.L., Robertson L.M.: The avian pineal, a vertebrate model system of the circadian oscillator: cellular regulation of circadian rhythms by light, second messengers, and macromolecular synthesis. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 1989, 45, 279-352.

- Tosini G., Menaker M.: Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science*, 1996, 272, 419-420.
- Touitou Y., Haus E. (Eds.): *Biological Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine*. Springer-Verlag, Berlin, 1992.
- Turek F.W.: Circadian rhythms. *Rec. Prog. Hormone Res.*, 1994, 49, 43-90.
- Underwood H., Barrett R.K., Siopes T.: The quail's eye: a biological clock. *J. Biol. Rhythms*, 1990, 5, 257-265.
- Van den Pol A.N.: Gamma-aminobutyrate, gastrin releasing peptide, serotonin, somatostatin, and vasopressin: ultrastructural immunocytochemical localization in presynaptic axons in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 1986, 17, 643-659.
- Van den Pol A.N., Tsujimoto K.L.: Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal systems. *Neuroscience*, 1985, 15, 1049-1086.
- Vitaterna M.H., King D.P., Chang A.M., Kornhauser J.M., Lowrey P.L., McDonald J.D., Dove W.F., Pinto L.H., Turek F.W., Takahashi J.S.: Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *clock*, essential for circadian behavior. *Science*, 1994, 264, 719-725.
- Vosshall L.B., Price J.L., Sehgal A., Saez L., Young M.W.: Block in nuclear localization of *period* protein by a second clock mutation, *timeless*. *Science*, 1994, 263, 1606-1609.
- Weber E.T., Rea M.A.: Neuropeptide Y blocks light-induced phase advances but not delays of the circadian activity rhythm in hamsters. *Neurosci. Lett.*, 1997, 231, 159-162.
- Weber E.T., Gannon R.L., Rea M.A.: cGMP-Dependent protein kinase inhibitor blocks light-induced phase advances of circadian rhythms *in vivo*. *Neurosci. Lett.*, 1995, 197, 227-230.
- Welsh D.K., Logothetis D.E., Meister M., Reppert S.M.: Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, 1995, 14, 697-706.
- Wisor J.P., Takahashi J.S.: Regulation of the *vgf* gene in the golden hamster suprachiasmatic nucleus by light and by circadian clock. *J. Comp. Neurol.*, 1997, 378, 229-238.
- Zatz M.: Relationship between light, calcium influx and cAMP in the acute regulation of melatonin production by cultured chick pineal cells. *Brain Res.*, 1989, 477, 14-18.
- Zatz M.: Agents that affect calcium influx can change cyclic nucleotide levels in cultured chick pineal cells. *Brain Res.*, 1992, 583, 304-307.
- Zatz M., Heath -III J.R.: Calcium and photoentrainment in chick pineal cells revisited: effects of caffeine, thapsigargin, EGTA, and light on the melatonin rhythm. *J. Neurochem.*, 1995, 65, 1332-1341.
- Zawilska J.B.: Stimulation of D4-like dopamine receptor suppresses serotonin N-acetyltransferase activity but does not phase-shift the circadian oscillator in chick retina. *Neurosci. Lett.*, 1994, 179, 107-110.
- Zawilska J.B.: Melatonin as a chemical indicator of environmental light-dark cycle. *Acta Neurobiol. Exp.*, 1996, 56, 757-767.
- Zawilska J.B., Nowak J.Z.: Regulatory mechanisms in melatonin biosynthesis in retina. *Neurochem. Int.*, 1992, 20, 23-36.
- Zawilska J.B., Nowak J.Z.: Receptory melatoninowe. W: J.Z. Nowak, J.B. Zawilska (Red.): *Receptory: Struktura, Charakterystyka, Funkcja*. PWN, Warszawa, 1997, 190-210.
- Zawilska J.B., Nowak J.Z.: Melatonina: regulacja biosyntezy, rola fizjologiczna i znaczenie terapeutyczne. *Farmacja Polska*, 1997, 53, 99-108.
- Zawilska J.B., Skalski M.: Melatonina – nowa broń w leczeniu zaburzeń snu? *Wszechświat*, 1996, 97, 96-98.
- Zawilska J.B., Wawrocka M.: Chick retina and pineal gland differentially respond to constant light and darkness: *in vivo* studies on serotonin N-acetyltransferase (NAT) activity and melatonin content. *Neurosci. Lett.*, 1993, 153, 21-24.
- Zawilska J.B., Wawrocka M., Żurawska E., Nowak J.Z.: Calcium channel blockers *in vivo* inhibit serotonin N-acetyltransferase (NAT) activity in chicken retina stimulated by darkness and not by agents elevating intracellular cyclic AMP level. *J. Pineal Res.*, 1992, 13, 101-106.