PL ISSN 0023-4249

Polskie Towarzystwo Przyrodników
im. KOPERNIKA

KOSMOS

RYTMY BIOLOGICZNE

Tom 40 WARSZAWA 1991 Numer 1(210)

WYDAWNICTWO NAUKOWE PWN

POLSKIE TOWARZYSTWO PRZYRODNIKÓW im. KOPERNIKA

Tom 40 Numer 1 (210)

KOSMOS

Rok założenia 1876

Warszawa 1991

Wydawnictwo Naukowe PWN

RADA REDAKCYJNA

LESZEK KUŹNICKI (wiceprzewodniczący), *WŁODZIMIERZ MICHAJŁOW*, *WŁODZIMIERZ OSTROWSKI*, *HENRYK SZARSKI*, *PRZEMYSŁAW TROJAN*, *ADAM URBANEK* (przewodniczący), *KAZIMIERZ ZIELIŃSKI*
sekretarz: *JADWIGA KOBUSZEWSKA*

KOMITET REDAKCYJNY

BRONISŁAW CYMBOROWSKI, *WŁADYSŁAW GOLINOWSKI*, *LUCYNA GRĘBECKA*
ANTONI HOFFMAN, *WŁODZIMIERZ MICHAJŁOW* (redaktor naczelny),
KRZYSZTOF STAROŃ, *KAZIMIERZ L. WIERZCHOWSKI*
(zastępca redaktora naczelnego), *JERZY ŻUK*
sekretarz: *JADWIGA KOBUSZEWSKA*

Redaktor numeru: Bronisław Cymborowski

Adres redakcji: 00-901 Warszawa, Pałac Kultury i Nauki, XIX p.,
Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika
(tel. 20-02-11, wewn. 25-44)

Wydano z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

WYDAWNICTWO NAUKOWE PWN — WARSZAWA, ul. MIODOWA 10

Ark. wyd. 9,5. Ark. druk. 7,5. Papier druk. mat. III 71 g. B-1
Oddano do składania w kwietniu 1991 r. Podpisano do druku
w sierpniu 1991 r. Druk ukończono we wrześniu 1991 r.

Skład: „PAMACOM". Druk i oprawa: Drukarnia — Warszawa, ul. Hajoty 50.

KOSMOS 1991, 40 (1): 3-5

WPROWADZENIE DO ZAGADNIEŃ RYTMÓW BIOLOGICZNYCH

Prawie 100 lat temu, francuski fizjolog Claude Bernard przedstawił swoją koncepcję homeostazy organizmu jako zespołu mechanizmów utrzymujących stałość środowiska wewnętrznego (milieu interieur). Dzisiaj wiemy, że odnosi się to tylko do średnich wartości określonych procesów, które podlegają wahaniom dobowym, sezonowym czy też wiążą się z przypływami morza. Zmiany te nazywamy rytmami biologicznymi (biorytmami), a dziedzinę biologii zajmującą się tymi zagadnieniami – chronobiologią (od grec. chronos – czas). Chronobiologia opisuje różne procesy biologiczne zmieniające się w czasie, co jest niezbędne do przedstawienia struktury czasu biologicznego. Pojęcie „struktura czasu biologicznego" obejmuje szereg dających się z góry przewidzieć zjawisk i procesów zachodzących w populacjach, w pojedynczym osobniku jako całości lub w jego tkankach i komórkach, a także na poziomie submikroskopowym (molekularnym).

Do pełnej charakterystyki struktury czasu biologicznego nie wystarczy dzisiaj tylko opis rytmicznie zmieniających się procesów życiowych, konieczne jest także poznanie mechanizmów regulujących procesy objęte pojęciem zegara biologicznego. Właśnie mechanizmom funkcjonowania zegara biologicznego poświęcony jest głównie niniejszy, specjalny tom KOSMOSU, prezentujący wybrane tematy wchodzące w zakres współczesnej chronobiologii.

Tom otwiera bogato ilustrowany artykuł Wolfganga Engelmanna, zawierający liczne przykłady rytmicznie zmieniających się procesów zarówno u roślin, zwierząt, jak i u człowieka. Autor wprowadza podstawowe pojęcia i terminy z zakresu chronobiologii, które – w formie słownika – podane są także w ostatniej pracy tego tomu.

Artykuł Krzysztofa Kwareckiego wprowadza w zagadnienia chronobiologii człowieka i chronomedycyny. Zawiera przykłady procesów fizjologicznych oraz mechanizmy ich regulacji, z uwzględnieniem zasad synchronizacji z cyklicznie zmieniającymi się warunkami życia człowieka. Oprócz uniwersalnych synchronizatorów-dawców czasu (takich jak cykl światło-ciemność czy cykle temperatury) działających na wszystkie istoty żywe, ważną rolę w synchronizacji procesów fizjologicznych człowieka odgrywają również czynniki natury socjalnej (tzw. kontakt socjalny). Autor zwraca szczególną uwagę na czynniki

zakłócające rytmy biologiczne, podkreślając przy tym praktyczny aspekt badań z zakresu chronomedycyny. Porusza też problem lokalizacji zegara biologicznego (rozrusznika rytmów okołodobowych), zwracając uwagę na procesy zachodzące w podwzgórzu mózgu człowieka.

Zagadnienia te zostały szerzej omówione w następnym artykule — W. J. Rietwelda i współpracowników. Podano w nim przykłady doświadczeń potwierdzających udział jądra nadskrzyżowaniowego podwzgórza w regulacji rytmiki dobowej kręgowców. Autorzy próbują odpowiedzieć na ważne pytanie: w jaki sposób zegar biologiczny oddziałuje na procesy zmieniające się w rytmie dobowym; chodzi tu o oddziaływanie zarówno na drodze bioelektrycznej, jak i neurohormonalnej.

Jednym z ważniejszych stanów życia, występującym okresowo u człowieka oraz u zwierząt stałocieplnych z wysoko rozwiniętym ośrodkowym układem nerwowym — jest sen. U większości ptaków, wielu ssaków i u człowieka sen występuje w rytmie dobowym, u ssaków ze słabo rozwiniętą korą mózgową i u osobników młodych — w rytmie częstszym niż dobowy. Zagadnienia te będą przedstawione w artykule Juliusza Narębskiego*

Mechanizmy procesów rytmicznych kręgowców są tematem rozważań w artykule Grażyny Barbackiej-Surowiak i Józefa Surowiaka. Autorzy zwracają szczególną uwagę na procesy biochemiczne, które z jednej strony są podstawowym ogniwem mechanizmu zegara biologicznego, a z drugiej mogą być jakby „produktem ubocznym" jego funkcji (świadczą o jego działaniu).

Rytmy biologiczne to nie tylko dobowe zmiany różnych procesów życiowych, to także zmiany sezonowe, jak na przykład sen zimowy i hibernacja. Należy do nich również diapauza owadów, polegająca na okresowym zahamowaniu procesów życiowych i umożliwiająca przetrwanie trudnych warunków otoczenia. Artykuł D.S. Saundersa przedstawia podstawowe mechanizmy indukcji i procesy prowadzące do przerwania diapauzy. Stwierdzono, że owady są w stanie „przewidzieć" nadejście nie sprzyjających okresów poprzez precyzyjny pomiar długości dnia i nocy. Oprócz „czasomierza" zwierzęta te są zaopatrzone u swego rodzaju „licznik" cykli dzień—noc, który mieści się w układzie neurosekrecyjnym ich mózgu. Dopiero informacje pochodzące równocześnie z obu tych ośrodków są w stanie wywołać określone zmiany w układzie endokrynalnym owada, prowadzące do wywołania lub przerwania diapauzy.

Owady są również dobrym obiektem badań nad molekularnym mechanizmem zegara biologicznego. Doświadczenia przeprowadzone na różnych gatunkach owadów, a przede wszystkim na muszce owocowej *Drosophila melanogaster* doprowadziły do wykrycia genu periodyczności (genu **per**). Badania genetycznych uwarunkowań zegara biologicznego przedstawia artykuł dwóch

---

* Niestety, z powodu choroby Autora, artykuł ten nie znalazł się w tym tomie; gdy tylko wpłynie do Redakcji, zamieścimy go w najbliższym numerze Kosmosu.

autorów: Macieja Pszczółkowskiego i B. Cymbrowskiego. Niewątpliwie jest to kierunek badań mający przyszłość, który doprowadzi do szerokiego poznania mechanizmów zegara biologicznego, umożliwiającego sterowanie rytmicznymi procesami zwierząt i człowieka.

Przedstawione w tym tomie prace stanowią oddzielne całości, z różnych dziedzin i specjalności naukowych i dla jasności wykładu — mogło się zdarzyć — pewne informacje zostały powtórzone. Mam nadzieję, że nie naruszyło to logicznego układu całego tomu.

Warszawa 6.03.1991 *Bronisław Cymborowski*

KOSMOS 1991, 40 (1): 7-30

WOLFGANG ENGELMANN

Instytut Biologii
Uniwersytet w Tybindze
Niemcy

ZEGARY ŻYWYCH ORGANIZMÓW

Żywe organizmy przystosowały się nie tylko do przestrzeni, ale również do struktury czasowej środowiska. Zwierzę „wie", kiedy ma spać, żerować, wędrować, roślina „wie", kiedy rozpoczyna się dzień, a kiedy nadchodzi noc, kiedy zbliża się zima lub pora kwitnienia, a człowiek bez informacji o położeniu Słońca czy Księżyca „planuje" przebieg własnej doby. Informacje te umożliwiają „planowanie" dzięki wewnętrznym „zegarom", które stanowią biologiczny pomiar czasu (rys. 1).

POCZUCIE CZASU U CZŁOWIEKA (KOPFUHR)

W czasach, gdy nie było jeszcze zegarów, ludzie wstawali we właściwym czasie, by polować, wiedzieli o jakiej porze i gdzie można napotkać dany gatunek zwierząt. Również dziś niektórzy ludzie potrafią obudzić się o wyznaczonej sobie godzinie w nocy, kierowani jakby wewnętrznym zegarem „w głowie" (Clauster 1954). Niestety mechanizmy tego interesującego zjawiska nie zostały jeszcze poznane (rys. 2).

ONTOGENEZA RYTMÓW DOBOWYCH

Więcej wiemy o przystosowaniu się małego dziecka do 24-godzinnego rytmu czasu. Na rysunku 3 widzimy rozproszone okresy snu (poziome linie) i karmienia (kropki) niemowlęcia, które ma własne pory aktywności i snu (bez wymuszania przez rodziców) [2]. Każda linia przedstawia pojedynczą dobę, czas w ciągu doby jest podany na skali poziomej (od 24 do 24 godzinny). Począwszy od 16 tygodnia życia niemowlę zaczyna spać głównie w nocy, w ciągu dnia są jedynie krótkie okresy snu. Karmienie (w dalszym ciągu nie wymuszane przez rodziców) ogranicza się wyraźnie do dnia. Przy dokładniejszej analizie można również stwierdzić pewną regularność we wzorze aktywności podczas pierwszych 15 tygodni życia. Wygląda to tak, jakby doba niemowlęcia wynosiła nieco

więcej niż 24 godziny. Każdego dnia bowiem obserwuje się to samo lub podobne, wynoszące około pół godziny, opóźnienie początku aktywności i karmienia. Sugeruje to przeprowadzona na wykresie linia. Co ciekawsze, także dorosły człowiek posiada wewnętrzny zegar „bijący" w rytmie dłuższym niż 24 godziny (średnio około 25 godzin). Fakt ten stwierdza się w warunkach wolnych od tzw. „dawców czasu" (np. informacji o zmieniającym się cyklicznie oświetleniu, temperaturze – przyp. tłum.) w jaskiniach, bunkrach i podczas polarnego lata. Z wykresu aktywności niemowlęcia (rys. 3) wynika brak bodźców zsynchronizowanych z 24-godzinnym rytmem doby. Na rysunku 4 przedstawiono analogiczny wykres aktywności niemowlęcia z Indii, który sugeruje, że synchronizacja z 24-godzinną dobą występuje od początku życia. Być może w południowych krajach sygnały środowiska są silniejszym bodźcem.

ZEGAR KWIATÓW *KALANCHOE*

U roślin można stwierdzić istnienie rytmów dobowych. Występująca jedynie na Madagaskarze *Kalanchoe blossfeldiana* (którą od pewnego czasu można spotkać w wielu naszych kwiaciarniach) otwiera kwiaty rano i zamyka wieczorem, ale robi to także wtedy, gdy zamiast naturalnej zmiany: światło – ciemność zastosuje się stale słabe światło zielone. Od tego momentu rytm przestaje być 24-godzinny i zaczyna się mieścić w przedziale 22-24-godzinnym (rys. 5). Fakt ten sugeruje istnienie wewnętrznego zegara, który bez sygnałów ze strony środowiska „biegnie" nieco szybciej niż doba. Na oglądanym pod mikroskopem przekroju pojedynczego płatka kwiatu *Kalanchoe* (rys. 6a) widać górną warstwę komórek o cienkich ściankach i z dużymi wakuolami. Najniższa warstwa, zbudowana z zazębiających się komórek, pełni rolę stabilnego podłoża (rys. 6c). Może się ona wyginać, ale nie rozciągać lub kurczyć. Zdolne są natomiast do tego komórki warstw leżących powyżej, które zgodnie ze stanem osmotycznym wakuoli pobierają lub oddają wodę. W stanie turgoru napięte komórki otwierają kwiat (rys. 7a), przy utracie wody zamykają (rys. 7b). Stężenie substancji, od których zależy ciśnienie osmotyczne, zmiania się rytmicznie w wakuolach komórki w ciągu doby (rys. 8). Udział w tym mają zarówno pompy jonowe, jak i kanały błony komórkowej. Gdzie znajduje się oscylator, który kieruje tym zjawiskiem, jak funkcjonuje – jeszcze nie wiadomo. W każdym razie wszystkie motoryczne komórki płatka są zdolne do zmian swojej objętości.

DESMODIUM – „ROŚLINA TELEGRAF"

Aby zrozumieć, jak powstają opisane wyżej wahania, należy znaleźć obiekt nadający się do rejestracji rytmu i odpowiednią metodę. Kwiaty *Kalanchoe* nadają się do tego celu, mają jednak tę wadę, że pełny cykl ruchu trwa całą dobę.

W tej sytuacji indyjska roślina *Desmodium gyrans* wydaje się dla biologa podarunkiem niebios. Ma ona dodatkowo, obok poruszających się w rytmie okołodobowym dużych liści końcowych, także szybko poruszające się liście boczne (rys. 9) [3]. W minutowym rytmie wędrują one ku górze i opadają na dół, tak jakby porzekazywały sobie wzajemnie informacje (niem. Telegrafenpflanzen). Między bocznymi listkami i ogonkiem liściowym jest „staw" liściowy o szczególnej strukturze. Naczynia przewodzące i wzmacniające, znajdujące się zazwyczaj na obwodzie, są umieszczone w tym wypadku centralnie. Dzięki temu możliwy staje się ruch. Wokół centralnej części liścia *Desmidium* znajdują się komórki motoryczne zbudowane i funkcjonujące podobnie jak analogiczne u kwiatu *Kalanchoe*. Gdy znajdują się one więc w stanie turgoru, staw napina się tak jak wąż ogrodowy napełniony wodą pod pełnym ciśnieniem i przy zamkniętym wylocie. Listek unosi się ku górze. Gdy turgor zmniejsza się, wówczas staw wiotczeje i listek opada ku dołowi.Te cykliczne ruchy kontynuowane są także przez listki odcięte od rośliny macierzystej.

Bernd A n t k o w i a k, należący do mojej grupy, przeprowadził elektrofizjologiczne badania [4] na tym właśnie stawie liściowym. Cienką, szklaną elektrodę wprowadzono do stawu, napełniono płynem i podłączono do urządzenia wzmacniającego i pomiarowego (rys. 10). W ten sposób można mierzyć potencjał elektryczny w stosunku do podobnej elektrody umieszczonej w płynie odżywiającym roślinę. A gdy jednocześnie rejestruje się ruch listków, można stwierdzić korelację między zmianami potencjału elektrycznego i obserwowanym ruchem (rys. 11). Posługując się elektrodami, w których umieszczono specjalny roztwór, można mierzyć aktywność jonów potasu i wodoru. Także w tym wypadku stwierdza się istnienie silnej korelacji z ruchem listków (rys. 12). Dzięki uzyskanym wynikom kształtuje się obraz wydarzeń zachodzących w stawie podczas ruchu dół/góra. Osmotycznie aktywne elementy, przede wszystkim jony potasu i chloru, zbierają się w komórkach motorycznych. Jest to możliwe dzięki silnie negatywnemu (ok. – 0,15 Volt) potencjałowi błony plazmatycznej. Wytwarza się on przez działanie pompy protonowej usuwającej dodatnio naładowane protony na zewnątrz. Wpływowi jonów potasu i chloru towarzyszą duże ilości cząsteczek wody: objętość komórki zwiększa się i listek unosi się ku górze. Gdy znajduje się w swoim najwyższym położeniu, potencjał błonowy, na skutek nieznanego mechanizmu, załamuje się. Błona staje się tak silnie przypuszczalna dla jonów potasu i chloru, że wypływają one z komórek motorycznych. Towarzyszy temu, przesunięty nieco w czasie, wypływ wody z komórki i opadanie listka. Osiągnięcie najniższego położenia związane jest ze zmniejszeniem się przypuszczalności błony, potencjał błonowy jest regenerowany i ruch może rozpocząć się od nowa.

JAK MIERZY SIĘ RYTMY?

Ruch bocznych listków daje się łatwo obserwować. Za pomocą stopera można określić czas między dolnym i górnym położeniem listka. Czas ten zależy od temperatury środowiska (rys. 13). Bardziej dokładna jest metoda przedstawiona na rys. 14, umożliwiająca uzyskanie co 15 s informacji o położeniu listka. Z zanotowanych czasów i kątów nachylenia można utworzyć krzywą ruchu. Użyteczne są automatyczne metody rejestracji, w których położenie listków jest rejestrowane za pomocą video [5]. W oznaczonych przedziałach czasowych (np. co 10 s) do pamięci komputera wprowadzona jest zmiana położenia centrum listka w polu oznaczonym przy rozpoczęciu rejestracji (rys. 15). W ten sposób udaje się przedstawić ruchy listków oraz określić czas trwania cyklu (rys. 16). Za pomocą tychże można wykazać, że na skutek blokowania wanadem mechanizmów transportu protonów zewnętrznej strony błony komórkowej rytmiczne ruchy ulegają spowolnieniu. Mechanizmy te muszą najwidoczniej być włączone bezpośrednio w oscylator komórki [6].

ZEGARY KOMÓRKOWE

Rytmiczne procesy pojawiają się już u organizmów jednokomórkowych. Przykładem może być morski glon *Gonyaulax polyedra*, wywołujący nocne świecenie na Pacyfiku, którego masowe pojawy prowadzą do napawającej strachem „czerwonej zarazy" (ryby zdychają, a ludzie odżywiający się rybami z rejonu Pacyfiku ulegają ciężkim zatruciom) (rys. 17). Glony te świecą lekko w ciągu nocy, maksymalne nasilenie świecenia przypada na jej środek (rys. 18). Wstrząsanie szklanego naczynia, w którym znajduje się hodowla *Gonyalax*, prowadzi do silnych błysków, których intensywność zależy od pory wstrząsania (rys. 18). Glony wstrząsane w ciągu dnia nie świecą. Także ten rytm jest pochodzenia endogennego, co oznacza, że zjawisko to można obserwować również w stałych warunkach, a okres rytmu wynosi wtedy w przybliżeniu tylko 24 rodziny. Zegar wewnętrzny kieruje syntezą lucyferazy, enzymu odpowiedzialnego za bioluminescencję, ale równocześnie produkcję białka wiążącego lucyferynę. Jeszcze przed kilku laty wierzono, że rytmy okołodobowe występują jedynie u *Eucaryota*. Ostatnio odkryto jednak rytmy okołodobowe także u *Procaryota*, a mianowicie wśród sinic. Sinice nie posiadają, tak jak bakterie, jądra komórkowego. Mogą jednak przeprowadzać fotosyntezę i po części absorbować azot w formie gazowej. Obydwa procesy przebiegają u niektórych gatunków sinic w rytmie dobowym i — w stałych warunkach — okołodobowych (rys. 19). Ponieważ nitrogenaza potrzebna do wiązania azotu jest blokowana przez tlen, procesy fotosyntezy (w którym powstaje tlen) i wiązania azotu muszą być rozdzielone przestrzennie i czasowo. Te dwa warunki są u sinic spełnione. Niektóre gatunki posiadają heterocysty, w których przebiega proces

wiązania azotu, podczas gdy w normalnych komórkach zachodzi w tym czasie fotosynteza. Inne gatunki wiążą azot tylko w nocy, gdy fotosynteza nie zachodzi. Czasowym rozdzieleniem tych dwóch ważnych biochemicznych procesów steruje zegar okołodobowy [8].

Nawet komórki drożdży wykazują rytm okołodobowy. Fred Kippert z naszej grupy hoduje drożdże gatunku *Schizosaccharomyces pombe* w temperaturze 12-14°C i może wykazać, że w tych warunkach podział komórek przebiega w rytmie okołodobowym [9]. Także odporność na szok temperaturowy (20 min, 50°C) waha się w rytmie okołodobowym (rys. 20) [10]. W wyższych temperaturach komórki dzielą się dużo szybciej i ultradianowy rytm w temperaturze 20°C wynosi 45 min (rys. 25). Takie komórki drożdzy mogą być użyte w nowoczesnych badaniach stosujących metody biologii molekularnej i w połączeniu z wieloma znanymi i stwarzanymi bezpośrednio dla potrzeb doświadczenia mutantami dają wiele informacji dotyczących mechanizmu opisanych rytmów.

Dobry zegar musi być nie tylko zdolny do synchronizacji z 24-godzinnym środowiskiem, ale także nie powinien przyspieszać w wyższych temperaturach i zwalniać w niższych [11]. I rzeczywiście, rytmy okołodobowe są mniej lub bardziej niezależne od zmian temperatury. Wyjątek stanowi słonowodna ameba *Thalassomyxa australis*, odkryta przed kilku laty przez Grella w Australii. Wykazuje ona cykliczne zmiany między formą nieruchliwą (*P*) i ruchliwą (α) (rys. 21). Okres rytmu zależy jednak od temperatury otoczenia i tylko w 20-23°C wynosi około 24 godzin, w 10°C przekracza 90 godzin. Być może organizm ten posiada zegar stanowiący rodzaj etapu ewolucyjnego w rozwoju zegarów okołodobowych, gdy zależność od temperatury jeszcze nie wystąpiła (lub nie jest potrzebna, bo temperatura w środowisku *Thalassomyxa* nie ulega silnym wahaniom).

ZEGARY OWADÓW

U zwierząt zjawiska okołodobowe są szeroko rozpowszechnione [13]. Karaluchy są aktywne nocą i w warunkach stałych aktywność ta przebiega w rytmie okołodobowym (rys. 22). Za pomocą odpowiednio przeprowadzonych operacji wykazano, że ich oscylator kontrolujący rytm aktywności ruchowej znajduje się w płatach wzrokowych między mózgiem i oczami złożonymi. Synchronizowany jest on poprzez zmiany światło – ciemność odbierane za pomocą oczu złożonych. Najprawdopodobniej istnieją również dalsze centra rytmiczne kontrolujące inne, przebiegające rytmicznie procesy. U much oscylator sterujący rytmicznymi zmianami aktywności ruchowej nie znajduje się w płatach wzrokowych, czego dowodzą doświadczenia z przeciętymi nerwami wzrokowymi (rys. 23) [14]. Także mutanty *Drosophila* pozbawione oczu lub posiadające silnie zredukowane płaty wzrokowe mutanty wykazują w dalszym

ciągu okołodobowy rytm aktywności ruchowej (rys. 24) [15]. Prawdopodobnie rytmiczne centra znajdują się w mózgu. Oczy złożone są co prawda wykorzystywane do synchronizowania aktywności ruchowej, ale także bez nich (mutanty!), czy z przeciętym nerwem wzrokowym zwierzęta mogą jeszcze ciągle podlegać synchronizacji z cyklicznymi zmianami światła i ciemności [14, 15]. Nieznane receptory są wrażliwe na światło niebieskie [16]. Prawdopodobnie na system okołodobowy much składają się dwie różne grupy oscylatorów, zbudowane z licznych pojedynczych oscylatorów. W jednej grupie znajdują się silne oscylatory o krótkich okresach, w drugiej słabsze — z dłuższymi okresami rytmu. Wzór aktywności jest określany poprzez sprzężenie między pojedynczymi oscylatorami i między grupami oscylatorów. Przy silnym sprzężeniu obserwuje się we wzorze aktywności ruchowej (rys. 23) tylko jeden komponent, o krótkim okresie rytmu. Stwierdza się to na przykład dla wzoru aktywności mutantów per^s *Drosophila* (s - od short — krótki okres rytmu). Przy słabym sprzeżeniu okres rytmu wydłuża się (per^l — od long, okres rytmu wynosi ok. 28 godz.) i jednocześnie na wykresie aktywności pojawiają się dodatkowe komponenty o krótkich okresach rytmu (rys. 24). W tej sytuacji sprzężenie jest na tyle słabe, że nie jest w stanie utrzymać szybkich oscylatorów w grupie, w efekcie „wyłamują" się one. Wreszcie sprzężenie może stać się tak słabe, że rytmu nie rozpoznaje się na wykresie aktywności (rys. 25), tak jak obserwuje się to na przykład u per^o (arytmiczny mutant *Drosophila*). Przypuszczamy jednak, że także u tego mutanta pojedyncze oscylatory w pełni funkcjonują, i jedynie brak sprzężenia doprowadza do pojawienia się arytmii [17].

AKTYWNOŚĆ RUCHOWA CHOMIKA

Na zegary okołodobowe można wpływać w różny sposób. Stosuje się na przykład cykliczne oświetlenia czy pulsy światła. Stałe światło, o różnej intensywności, prowadzi do pojawiania się zmian w długości okresu rytmu (rys. 26), podanie różnych substancji zmienia także okres rytmu. W ten sposób można było wykazać na przykładzie aktywności ruchowej chomika, że dodanie do wody pitnej soli litu powoduje spowolnienie zegara kierującego rytmem jego aktywności ruchowej (rys. 29) [18, 19]. Podobną reakcję stwierdza się także u małp i człowieka [19].

ZABURZENIA ZDROWIA Z POWODU „ŹLE CHODZĄCEGO ZEGARA"

To ostatnie odkrycie jest szczególnie istotne, ponieważ sole litu stosowane są z powodzeniem jako element terapii w depresji pochodzenia endogennego. Ze schorzeniem tym związane są zaburzenia w systemie okołodobowym [20].

Nie jest wykluczone, że one właśnie są przyczyną występowania pewnych form endogennej depresji, a sole litu poprzez spowolnienie zegara lub zmianę sprzężenia między jego elementami pełnią rolę normalizującą. Skutki zaburzeń w systemie okołodobowym szczególnie wyraźnie dostrzega się po locie międzykontynentalnym jako tzw. „jet-lag", czy w pracy zmianowej przy niekorzystnie zmiennych okresach pracy. Ludzie o skłonności do porannego wstawania (niem. Morgen typen, czyli tzw. skowronki) są szczególnie podatni na uboczne wpływy pracy zmianowej [21].

ORIENTACJA W PORZE ROKU

Rytmy okołodobowe pełnią wiele ważnych funkcji. Jedną z nich jest orientowanie się w porze roku. Dla zwierząt i roślin ze średnich i wyższych szerokości geograficznych niezwykle ważne jest odpowiednio wczesne przygotowanie się do nie sprzyjającej pory roku. Wiele roślin kwitnie w określonym czasie, a ich „kalendarzem" jest długość dnia, która zmienia się w ciągu roku. Fotoperiod „steruje" rozmnażaniem się wielu zwierząt, jak również diapauzą owadów [22, 23]. Długość dnia nie jest mierzona na zasadze podobnej do działania klepsydry, lecz przy korzystaniu z zegara okołodobowego*.

ORIENTACJA ZA POMOCĄ SŁONECZNEGO KOMPASU

Także orientowanie się za pomocą Słońca (kompas słoneczny) znajduje w wewnętrznym zegarze pewnego rodzaju punkt odniesienia. Można tu posłużyć się przykładem z życia pszczół. Robotnice podczas tańca informującego o źródle pokarmu biorą pod uwagę ruch Słońca.

ZEGARY, KTÓRYMI STERUJE KSIĘŻYC

Istnieją także zegary kierujące się Księżycem [24]. *Clunio marinus (Chironomidae)*, przechodzący w morzu stadia larwalne, wydostaje się jako imago z poczwarkowej kutikuli w czasie, gdy litoral, w którego glonach żyją zwierzęta, jest odpowiednio suchy na skutek zmian spowodowanych odpływem. Tak więc, w czasie tym samce kopulują z samicami, te zaś, zanim przyjdzie kolejny przypływ i zniesie dorosłe owady do wody, składają jaja i przyklejają je do glonów. Mechanizmy tych zachowań badał N e u m a n n [25] i jego grupa. Wykonano również ciekawy film o tym zjawisku (rys. 29).

---

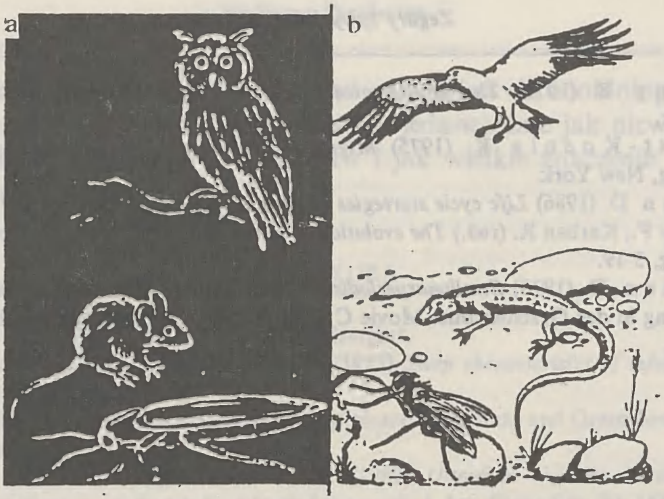
* Patrz artykuł D. S. Saundersa, str.73

Mam nadzieję, że ten krótki przegląd zagadnień chronobiologii ukazuje, jak fascynujące są obserwowane zjawiska, a jednocześnie jak niewiele wiemy o mechanizmach leżących u ich podstaw i jak wielkie znaczenie ma strona praktyczna tej dziedziny.

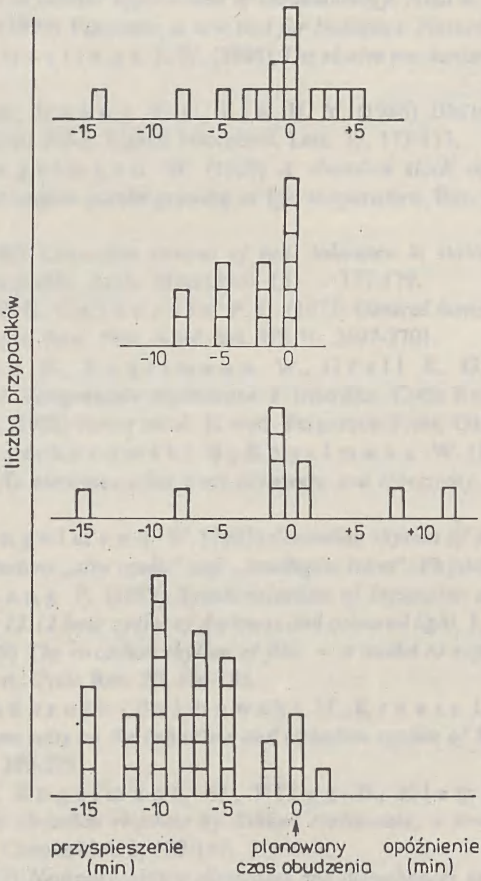
LITERATURA

1. Clauster G. (1954) *Die Kopfuhr*. Enke, Stutgart.
2. Kleitman N., Engelmann T. G. (1953) *Sleep characterisics of infants*. J. Appl. Physiol. 6. 269-282.
3. Bose J. C. (1913) *Researches on irritability of plants*. Longmans and Greenslow, New York, Bombay, Calcutta.
4. Antkowiak B., Engelmann W. (1989) *Ultradian rhythms in the pulvini of Desmodium gyrans — en electrophysiological approach*. J. Int. Cycle Res. 20, 164-165.
5. Schuster J., Engelmann W. (1990) *Recording of rhythms in organism using video-digitizing*. [W] *The clinical applications of chronobiology*. Alan R. Liss Inc., New York.
6. Simons T. J. B. (1979) *Vanadate, a new tool for biologists*. Nature 281, 337-338.
7. Johnson C. H., Hastings J. W. (1986) *The elusive mechanism of the circadian clock*. Am. Sci. 74, 29-36.
8. Grobbelaar N., Huang T. C., Lin H. Y. (1986) *Dinitrogen-fixing endogenous rhythm in Synechococcus FR-1*. FEMS Microbiol. Lett. 37, 173-177.
9. Kippert, F. Engelmann W. (1989) *A circadian clock controle the cell division cycle of Schizosaccharomyces pombe growing at low temperature*. Eur. J. Cell Biol. 48 (Suppl. 26), 81.
10. Kippert F. (1989) *Circardian control of heat tolerance in stationary phase cultures of Schizosacccharomyces pombe*. Arch. Mocrobiol. 151 — 177-179.
11. Pittendrigh C. S., Caldorola P. C. (1973) *General homeostasis of the frequency of circardian oscillations*. Proc. Nat. Acad. Sci. US 70, 2697-2701.
12. Silyn-Roberts H., Engelmann W., Grell K. G. (1986) *Thalassomyxa australis rhythmicity I. Temperature dependence*. J. Interdics. Cycle Res. 17,181-187.
13. Saunders D. S. (1982) *Insect clock*. II wyd. Pergamon Press, Oxford.
14. Helfrich C., Cymborowski B., Engelmann W. (1985) *Circadian activity rhythm of the house fly continues after tract severance and lobectomy*. Chronobiol. Intern. 2, 19-32.
15. Helfrich C., Engelmann W. (1983) *Circadian rhythm of the locomotor activity in Drosophila aned its mutans „sine oculis" and „smalloptic lobes"*. Physiol. Entom. 8, 257-272.
16. Blaschke I., Lang P. (1989) *Synchronization of locomotor activity rhythm of bling Drosphila mutants by 12:12 hour cycles of darkness and coloured light*. J. Int. Cycle Res 20, 172.
17. Forster C. (1989) *The circadian rhythm of flies — a model to explain different locomotor activity patterns*. J. Int. Cycle Res. 20, 184-185.
18. Delius K., Gunderoth-Palmowski M., Krause I., Engelmann W. (1984) *Effects of lithium salts on the behaviour and circadian system of Mesocricetus auratus* W. J. Int. Cycle Res. 15, 289-299.
19. Jahnsson SA., Engelmann W., Pflug B., Klemke W. (1983) *Period lengthening of human circadian rhythms by lithium carbaonate, a prophylactic for depressive discorders*. Intern. J. Chronobiol. 3, 129-147.
20. Halaris A. (1987) *Neuropsychiatric discorders and disturbances in the circadian system of man*. Elsevier.
21. Moore-Ede M. C., Sulzman F. M., Fuller C. A. (1982) *The clocks that time us*. Harvard Univ. Press. Cambridge, MA, London.

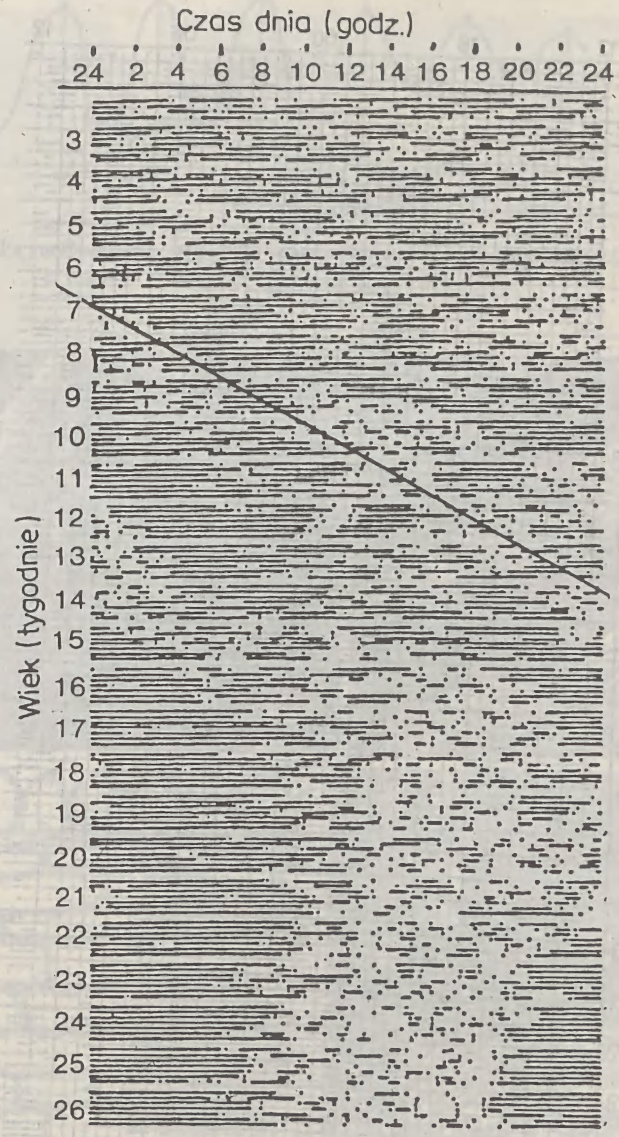
22. B u n n i n g E. (1973) *The physiological clock*. III wyd. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
23. S c h m i t t - K o e n i g K. (1975) *Migration and homing in animals*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
24. N e u m a n D. (1986) *Life cycle startegies of an intertidal midge between and arctic latitudes*. [W] Taylor F., Karban R. (red.) *The evolution of insect life cycles*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg, 3-19.
25. N e u m a n n D. (1973) *Semilunarperiodische Fotpflanzung von Clunio marinus*. Biologische Zeitmessung in der Gezeitenzone. Movie C 1091 of Insitut fur den Wissenschaftlichen Film, Gottingen.



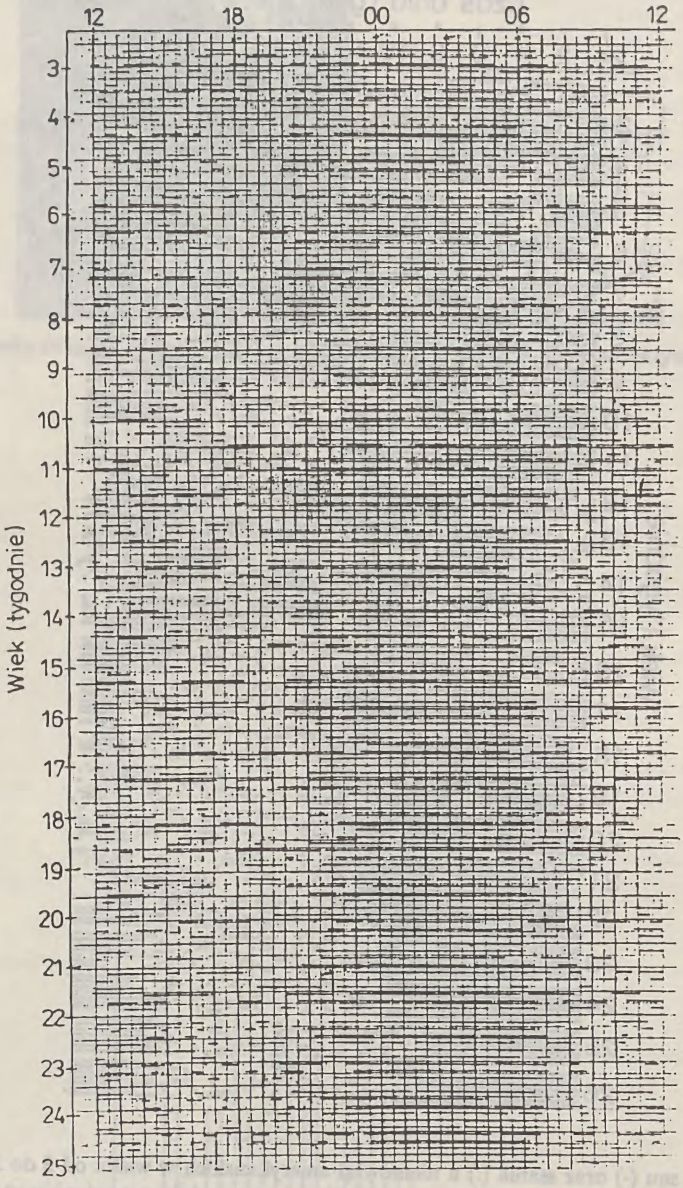
Rys. 1. Przykłady zwierząt aktywnych (a) w nocy (karaczan, mysz, sowa) oraz aktywnych w dzień (b) (mucha, jaszczurka, ptak (wg [14, 17])



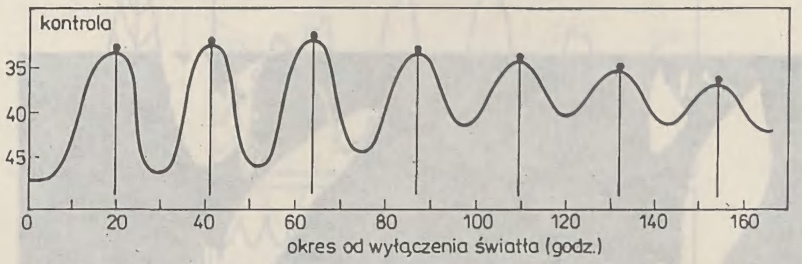
Rys. 2. Czas budzenia się o niezwykłej porze nocy w odniesieniu do czasu („0") planowanego (-: obudzenie się późniejsze od planowanego; +: obudzenie się wcześniejsze od planowanego) przez 4 różne osoby (wg [1])



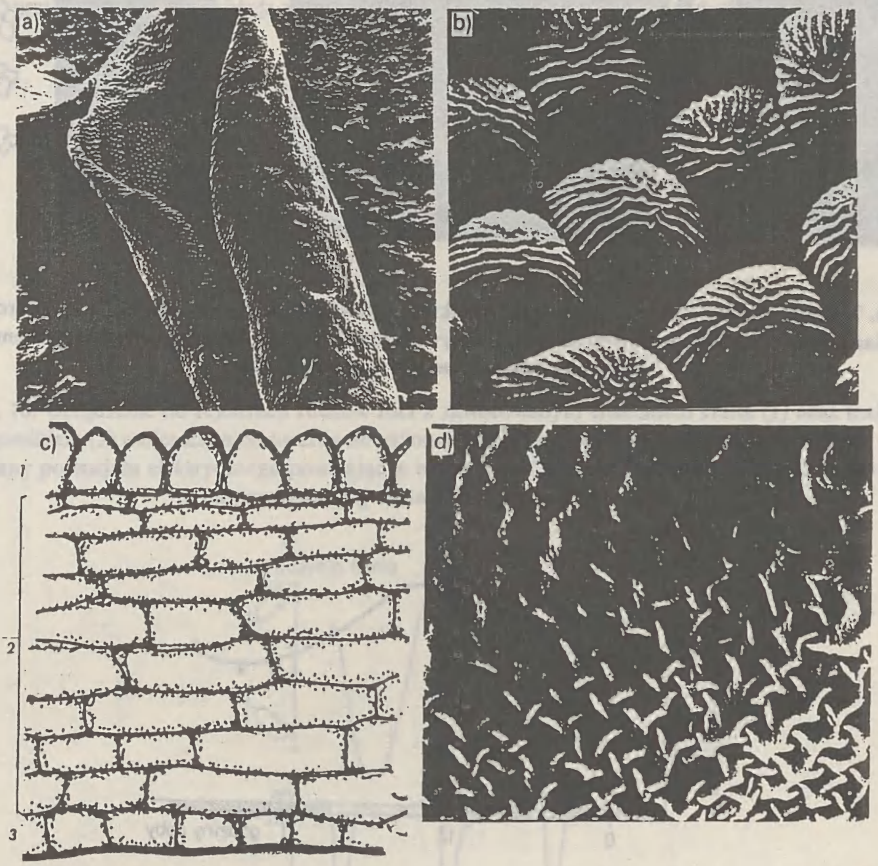
Rys. 3. Rytm snu (-) oraz ssania (.) u niemowląt amerykańskich w wieku od 3 do 25 tygodni po urodzeniu. Linia ukośna wskazuje na dryfowanie rytmu (rytm spontaniczny) (wg [2])



Rys. 4. Rytm snu (-) oraz ssania (.) u niemowląt indyjskich w wieku od 4 do 25 tygodni po urodzeniu (wg Marimuthu, dane nie opublikowane)

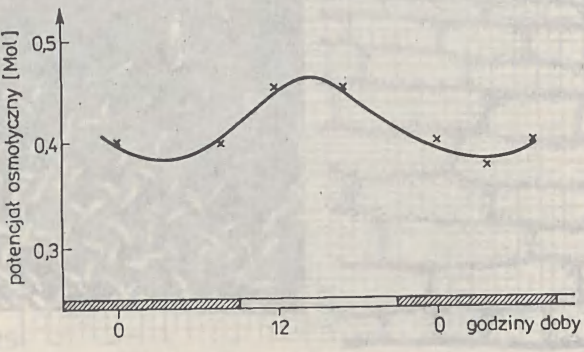


Rys. 5. Rytmika ruchów płatków kwiatu rośliny *Kalanchoe* w stałej ciemności. Na uwagę zasługuje stałe obniżanie się amplitudy rytmu

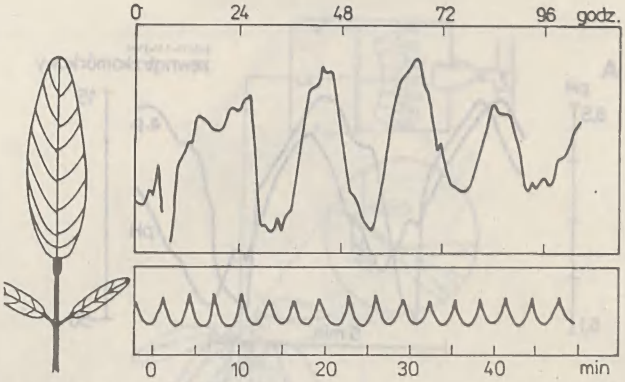


Rys. 6. Zdjęcie z mikroskopu skaningowego fragmentu płatka kwiatowego *Kalanchoe* z zamkniętymi górnymi komórkami epidermy (a) oraz komórek górnej (b) i dolnej epidermy (d), c — schemat rozmieszczenia komórek na poprzecznym przekroju płatka: 1 — komórki górnej epidermy, 2 — komórki miękiszu, 3 — komórki dolnej epidermy

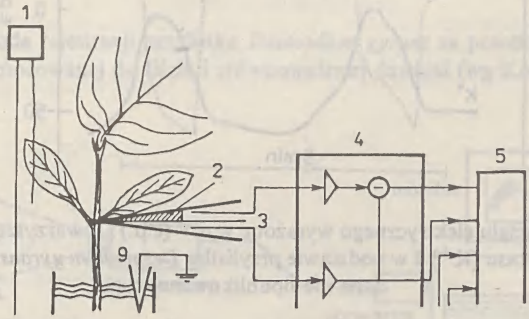
Rys. 7. Kwiat rośliny *Kalanchoe* w pozycji zamkniętej (lewa strona) oraz otwartej (prawa strona). Zmianę układu płatków kwiatowych wraz z upływem czasu w ciągu dnia przedstawiono schematycznie na podstawie serii wykonanych zdjęć



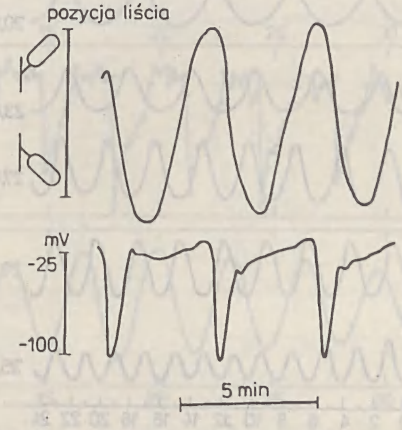
Rys. 8. Dobowa zmiana ciśnienia osmotycznego (wyrażonego w molach) w komórkach górnej epidermy płatków kwiatowych *Kalanchoe*. Pola zakreskowane to okresy ciemności cyklu dobowego



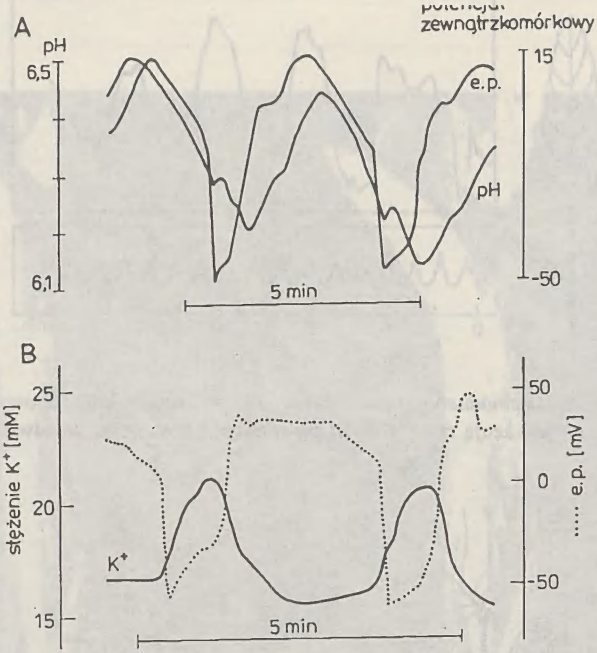
Rys. 9. Trójdzielny liść *Desmodium gyrans*. Główny liść wykazuje okołodobowy rytm uchów, zaś przylistki boczne wykazują rytm ultradialny o okresie trwającym zaledwie kilka minut



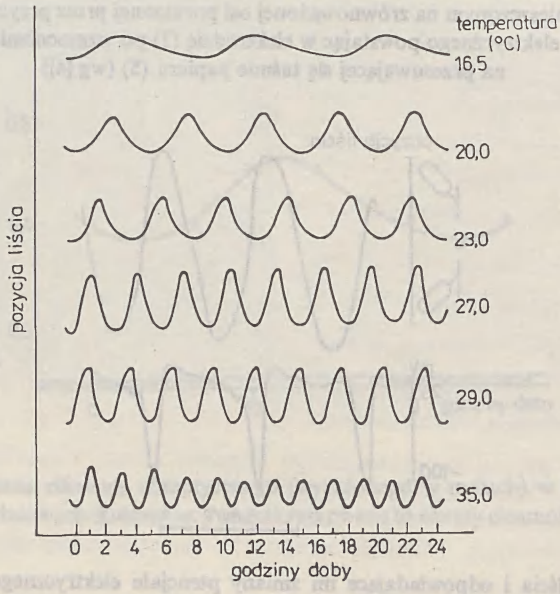
Rys. 10. Urządzenie do rejestracji ruchów liści z zastosowanym elementem Halla (1) oraz małym magnesikiem (2) umieszczonym na zrównoważonej osi poruszanej przez przyczepioną do liścia nić. Zmiany potencjału elektrycznego powstając w elektrodzie (3) po wzmocnieniu (4) są rejestrowane na przesuwającej się taśmie papieru (5) (wg [4])



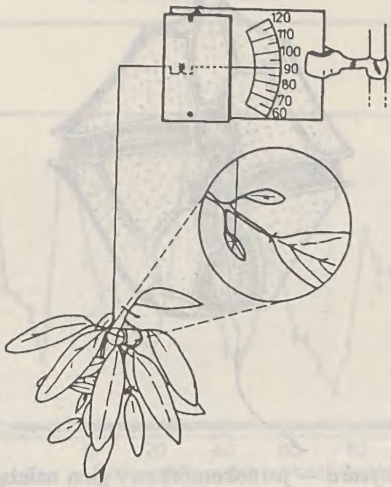
Rys. 11. Pozycje liścia i odpowiadające im zmiany ptencjału elektrycznego w mV zachodzące w podstawie przylistka *Desmodium gyrans* (wg Antkowiaka, dane nie opublikowane)



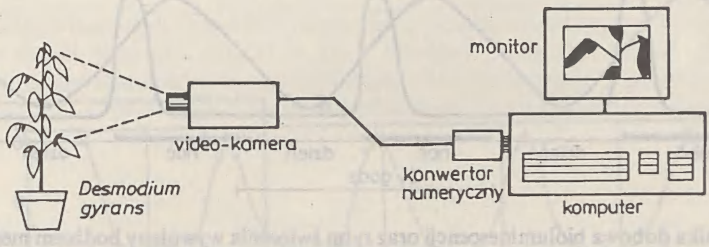
Rys. 12. Zmiany potencjału elektrycznego wyrażone w mV (e.p.) i towarzyszące im zmiany pH (A) oraz stężenia jonów potasu (K^+) 8 w podstawie przylistka *Desmodium gyrans* (B) (wg Antkowiaka, dane nie opublikowane)



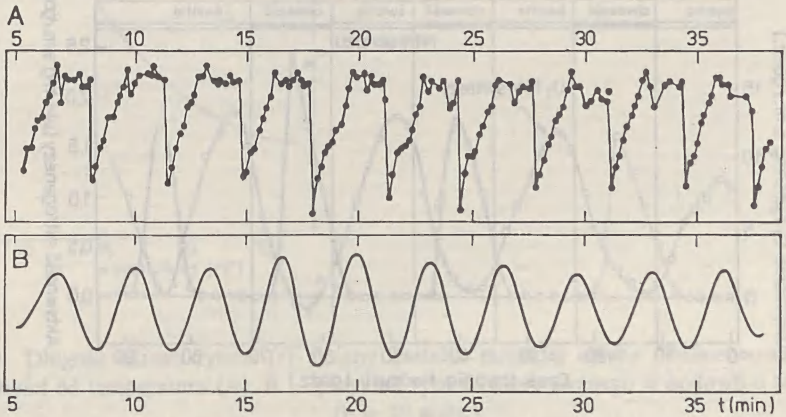
Rys. 13. Wpływ temperatury na dobowe ruchy przylistka *Desmodium gyrans* (wg Cihlara)



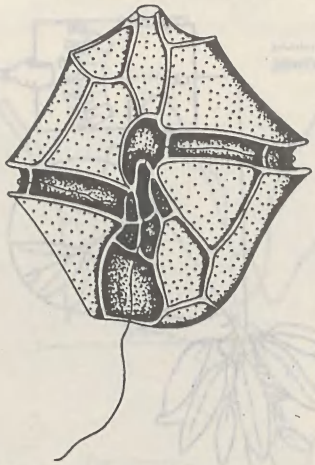
Rys. 14. Prosta metoda rejestracji przylistka *Desmodium gyrans* za pomocą bardzo cienkiej nitki przymocowanej do liścia i zrównoważonej dźwigni (wg Koukhari)



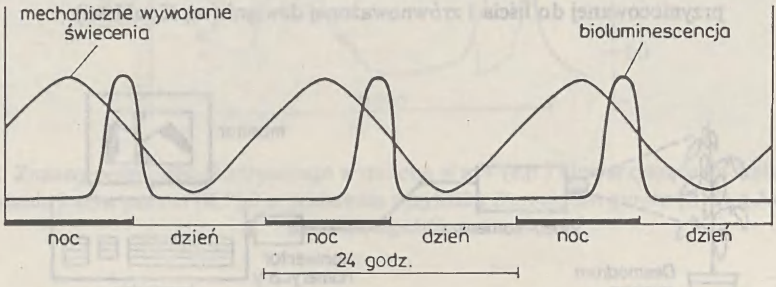
Rys. 15. Rejestracja ruchów liści *Desmodium gyrans* za pomocą kamery video oraz komputera



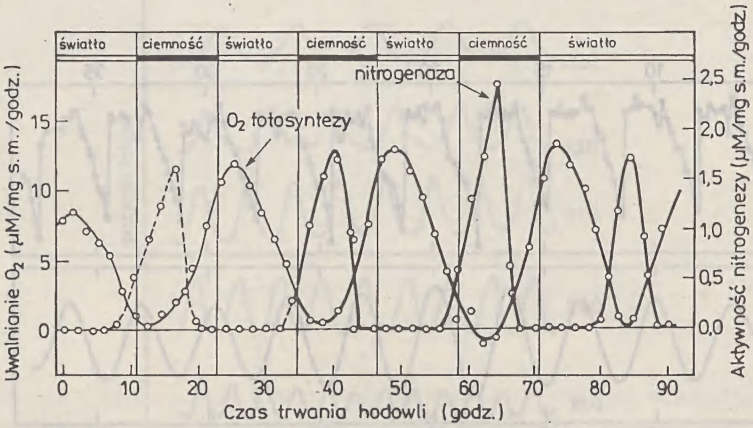
Rys. 16. Porównanie dwóch krzywych zapisu ruchów liści *Desmodium gyrans*. Krzywa A jest zapisem oryginalnym, natomiast B przedstawia zapis komputerowy



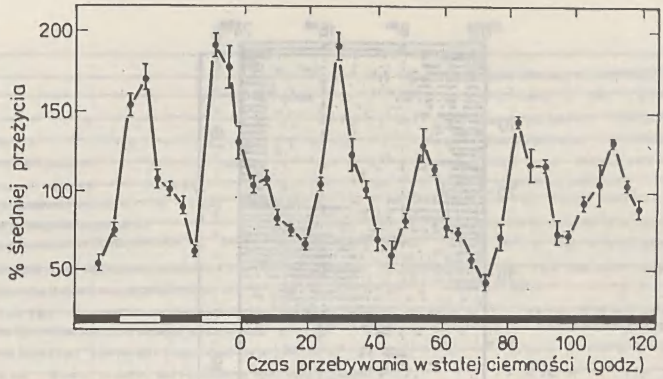
Rys. 17. *Gonyaulax polyedra* – jednokomórkowy glon należący do *Dinoflagellata* (wg Schussinga, 1954).



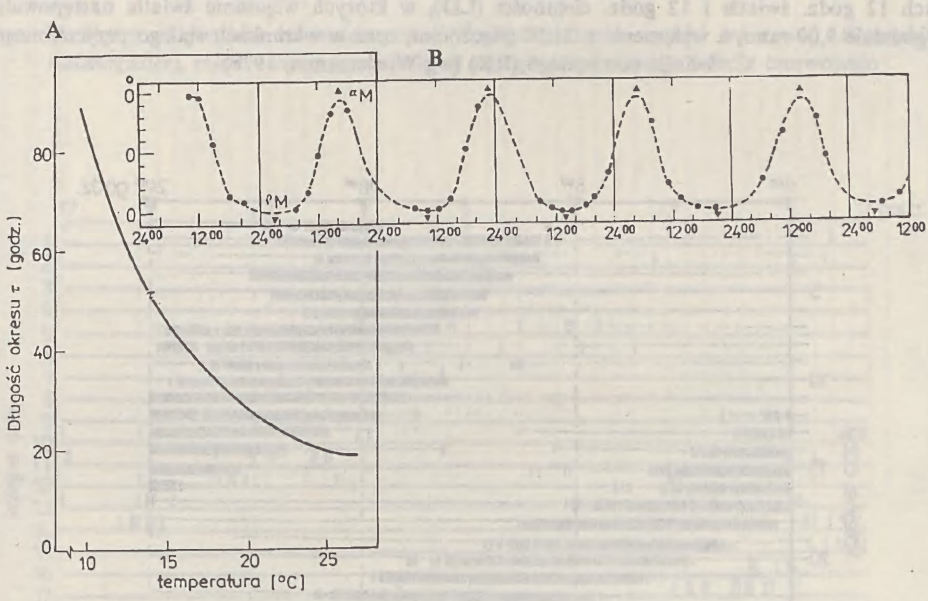
Rys. 18. Rytmika dobowa bioluminescencji oraz rytm świecenia wywołany bodźcem mechanicznym (wstrząsanie hodowli) *Gonyaulax polyedra* (wg Hastingsa)



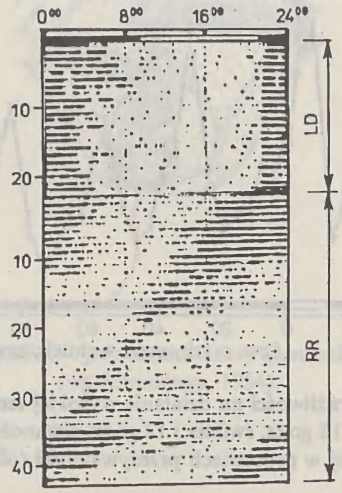
Rys. 19. Rytm produkcji tlenu związanego z procesem fotosyntezy (fazy świetlnej) oraz aktywność nitrogenezy u *Cyanobacterium* hodowanej w warunkach 12 godz. światła i 12 godz. ciemności oraz w stałym świetle (wg Mitsui i in., 1986)



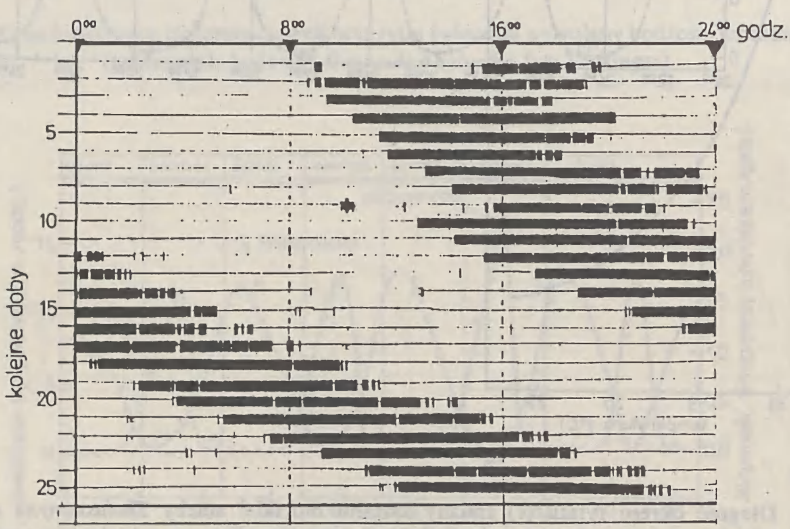
Rys. 20. Rytm okołodobowy wrażliwości na działanie wysokiej temperatury (szoku termicznego) komórek drożdży w warunkach 12 godz. światła i 12 godz. ciemności oraz w stałej ciemności (pole zaczernione) wyrażonej w procentach przeżywalności (oś rzędnych) (wg [10])



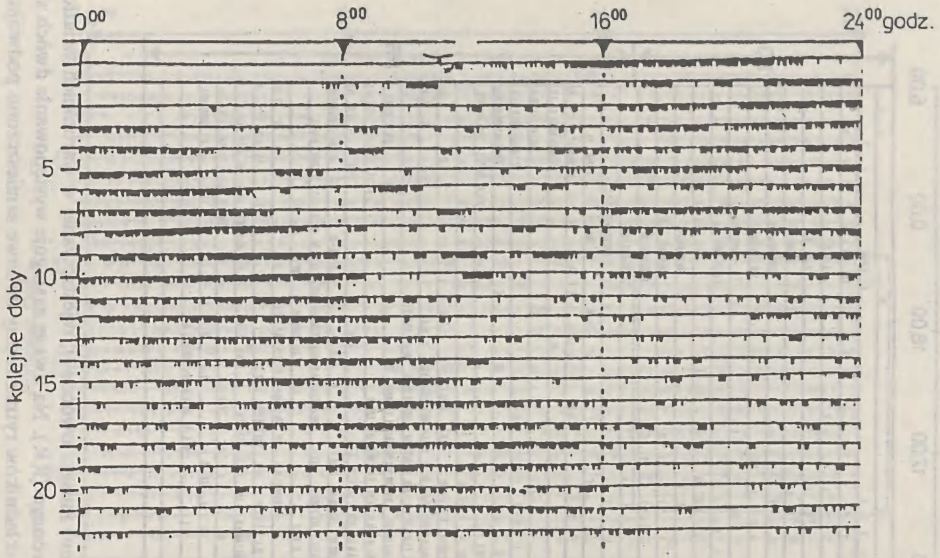
Rys. 21. Długość okresu rytmu (τ) zmiany kształtu morskiej ameby *Thalassomyxa australis* w zależności od temperatury (A). B — przykład rytmu obserwowanego w hodowli o temp. 19°C (τ = 29 godz.)



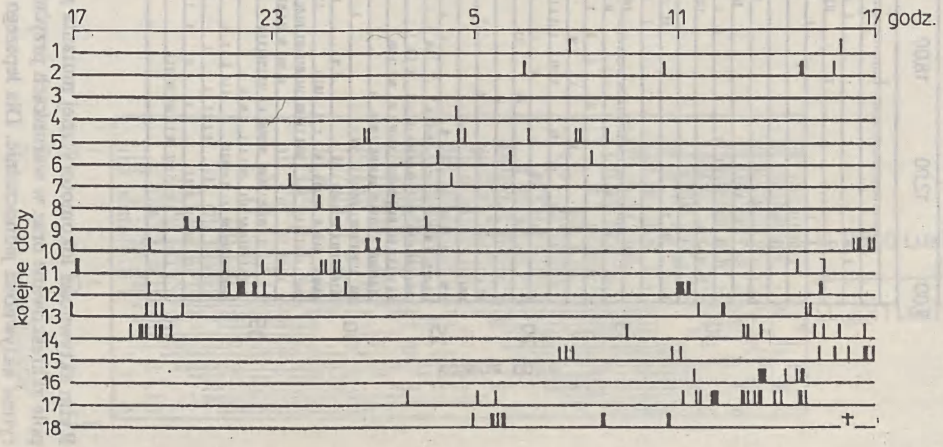
Rys. 22. Zapisy aktywności lokomotorycznej karaczana (*Periplaneta americana*) uzyskane w warunkach 12 godz. światła i 12 godz. ciemności (LD), w których włączanie światła następowało o godzinie 9.00 rano, a wyłączenie o 21.00 wieczorem, oraz w warunkach stałego przyćmionego światła czerwonego (RR) (wg Wiedemanna, 1978)



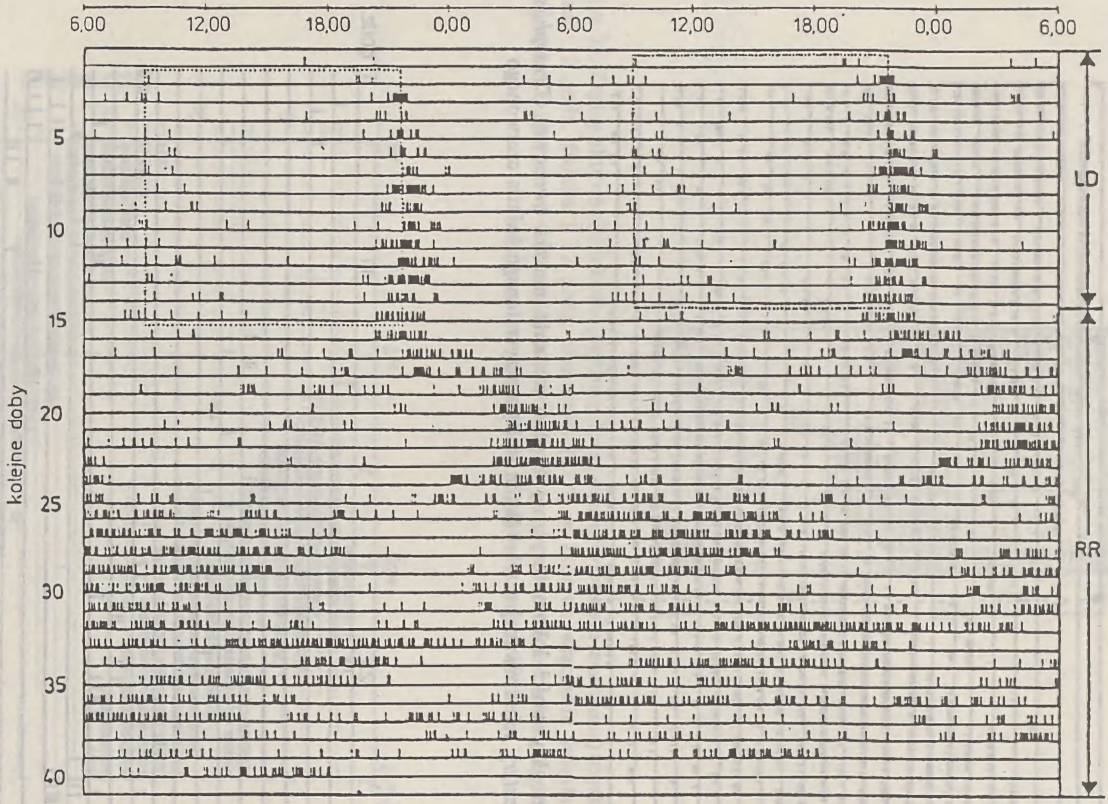
Rys. 23. Rytmika aktywności lokomotorycznej muchy domowej (*Musca demostica*), rejestrowanej w warunkach stałego przyćmionego światła czerwonego przed (dni: 1-9) i po obustronnym przecięciu nerwu wzrokowego (gwiazdka). Pola zaczernione to okresy aktywności



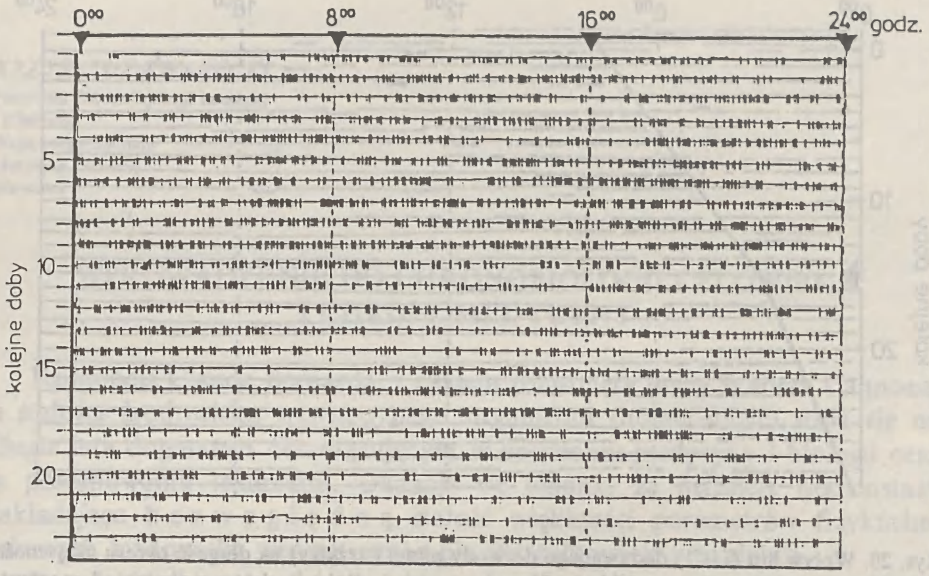
Rys. 24. Rytm aktywności lokomotorycznej ślepego mutanta muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*), rejestrowanej w warunkach stałego przyćmionego światła czerwonego



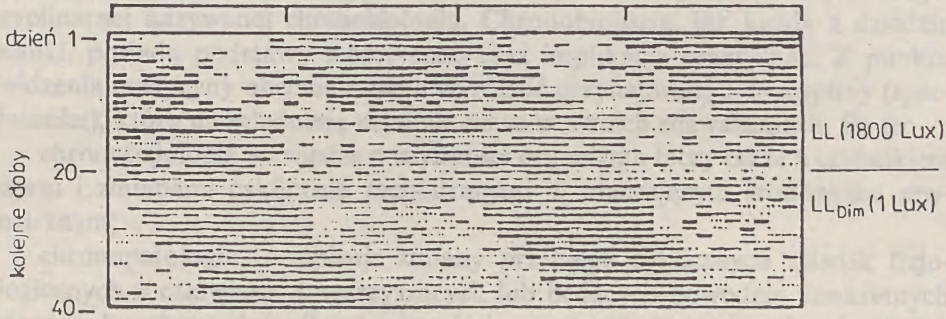
Rys. 25. Aktywność lokomotoryczna mutanta *per'* (krótki okres rytmu) muszki owocowej, rejestrowanej w warunkach opisanych na rys. 24. Na podkreślenie zasługuje występowanie tylko jednego składnika rytmu (porównaj z rys. 24),



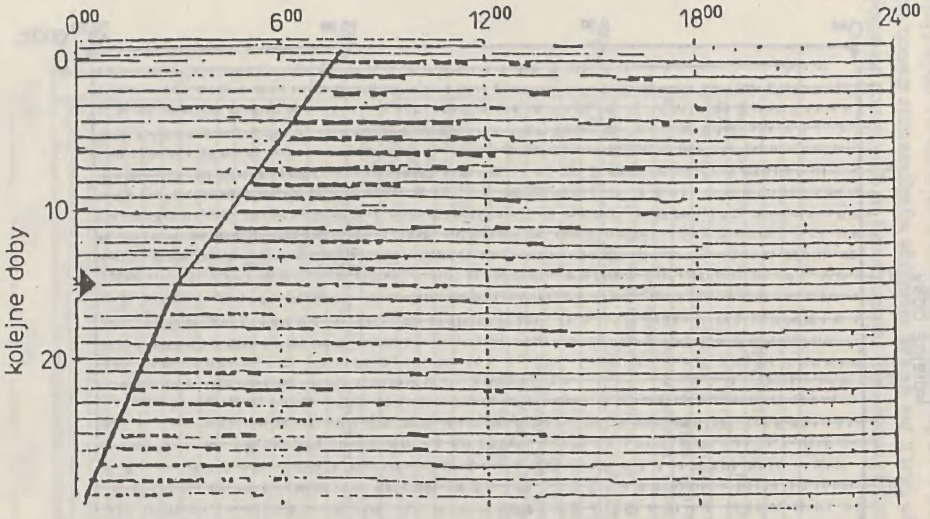
Rys. 26. Rytm aktywności lokomotorycznej mutanta *per*[1] (długi okres rytmu) muszki owocowej, rejestrowanej w warunkach światło/ciemność (LD) – pole zakreskowane oraz w warunkach przyćmionego światła czerwonego (RR). Na uwagę zasługuje występowanie dwóch składników rytmu aktywności jednocześnie. Dla lepszego uwidocznienia tych składników rytmu zapisy dobowe zamieszczono podwójnie



Rys. 27. Aktywność lokomotoryczna mutanta *per*⁰ (nierytmicznego) muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*). Uwagę zwraca brak jakichkolwiek cech rytmiczności



Rys. 28. Rytm aktywności lokomotorycznej wiewiórki ziemnej (?) (squirel monkey) — pola ciemne. Na uwagę zasługuje różna długość okresu rytmu w warunkach stałego oświetlenia 1800 luksów w porównaniu z krótszym okresem tego rytmu uzyskiwanym w warunkach światła przyćmionego (1 lux) (wg Sulzmann i in., 1979)



Rys. 29. Wpływ litu (LiCl) dodawanego do wody pitnej (strzałka) na długość okresu aktywności lokomotorycznej chomika syryjskiego. Uwagę zwraca wydłużenie się tego okresu od momentu podania litu. Aktywność rejestrowano w warunkach stałej ciemności (wg Gunderoth-Palmowsky, wyniki nie opublikowane)

KOSMOS 1991, 40 (1): 31-52

KRZYSZTOF KWARECKI
Pracownia Chronofizjologii Lotniczej
i Klinicznej
Wojskowego Instytutu
Medycyny Lotniczej
Warszawa

WPROWADZENIE DO CHRONOBIOLOGII CZŁOWIEKA I CHRONOMEDYCYNY

Koncepcja Claude Bernarda, z czasem rozwinięta przez Waltera Cannona, o stałości środowiska wewnętrznego organizmu (homeostazie) stała się na długie lata dogmatem obowiązującym w nauczaniu medycyny i biologii oraz w postępowaniu lekarskim. Okazuje się jednak, że definicja homeostazy zakładająca b e z w z g l ę d n ą stałość większości parametrów fizykochemicznych środowiska wewnętrznego nie jest całkowicie prawdziwa.

Ponad 100 różnych właściwości i przejawów życiowych organizmu człowieka wykazuje zróżnicowanie natężenia w ciągu doby. Powtarzające się okresowo zmiany intensywności zjawiska biologicznego zależnie od pory roku, doby lub mniejszych odcinków czasu przyjęto nazywać **rytmem biologicznym.** Występowanie rytmów biologicznych jest wspólną cechą świata roślin, zwierząt i człowieka, dotyczy ekosystemów, populacji, poszczególnych osobników, ale także narządów, tkanek, komórek i wreszcie struktur subkomórkowych.

Problemami rytmów biologicznych interesują się przedstawiciele wielu dyscyplin naukowych, co doprowadziło do wyłonienia gałęzi wiedzy interdyscyplinarnej nazywanej **chronobiologią**. Chronobiologia, jak każda z dziedzin nauki, posiada podstawy teoretyczne oraz implikacje praktyczne. Z punktu widzenia medycyny obecnie można wyróżnić przynajmniej 3 dyscypliny (specjalności), które uwzględniają czynnik czasu w swoich rozważaniach. Są to:

chronofizjologia — wiedzę o czynności organizmu łączy także z czynnikiem czasu i zmianami cyklicznie zachodzącymi w otaczającym środowisku zewnętrznym;

chronopatologia — opisuje zmiany przebiegu cyklicznych zjawisk fizjologicznych u człowieka, towarzyszących lub będących powodem konkretnych stanów chorobowych (najbardziej spekularne przykłady to choroby alergiczne, cywilizacyjne i nowotworowe);

chronofarmakologia — chronoterapia — stwarzają racjonalne przesłanki do stosowania terapii farmakologicznej. Dla wielu grup leków podawanie ich w równych dawkach w ciągu doby nie może być obecnie akceptowane przez lekarza. W niektórych porach doby ta sama dawka leku będzie zbyt mała, by

wywołać efekt terapeutyczny, w innych zaś dawka ta może zbliżać się do dawki toksycznej.

Zależnie od częstotliwości periodyki zjawiska biologicznego przyjęto wyróżniać 3 kategorie rytmów biologicznych, dzieląc je na:

– rytmy **okołodobowe** (zwane czasami cirkadialnymi od circa = około i dies = doba), ich okres trwa 20-28 godzin;

– rytmy **ultradialne**, o okresie krótszym od 20 godzin;

– rytmy **infradialne**, o okresie dłuższym niż 28 godzin.

Zakres niniejszego opracowania jest ograniczony do opisu przejawów oraz mechanizmu okołodobowych rytmów biologicznych człowieka, jako stosunkowo najlepiej poznanych. Częściowo omówiono też przejawy rytmów sezonowych. Wiedzę o rytmach okołodobowych i sezonowych u człowieka można już praktycznie wykorzystać dla potrzeb higieny, ale także w postępowaniu lekarskim – w diagnostyce i terapii stanów chorobowych.

W tym miejscu należy dokonać komentarza do ciągle jeszcze nieszczęśliwie nawracających **biorytmów** wynikających z **daty urodzin**.

Od pewnego czasu zauważa się zainteresowanie możliwością wykorzystywania biorytmów wynikających z daty urodzin w profilaktyce wypadków komunikacyjnych, wypadków w pracy itp. Na powstanie tej hipotezy złożyły się prace Svobody, Fliessa i Teltschera wykazujące – na podstawie subiektywnych odczuć osób ankietowanych – istnienie cykli trwających 23, 28 i 33 dni, odpowiedzialnych odpowiednio za sprawność fizyczną, emocjonalną oraz intelektualną. Każdy z cykli można opisać krzywą sinusoidalną, zawierającą fazy dodatnią i ujemną wraz z dwoma punktami przecięcia linii zerowej. Każdy cykl rozpoczynać się ma **jako półcykl dodatni w momencie urodzin**. Faza dodatnia łączy się z okresem, kiedy oceniana sprawność działania jest najwyższa, faza ujemna – okresowi niższej sprawności, punkty przecięcia z linią zerową określa się jako **dni krytyczne**. Okresowi krytycznemu przypisuje się szczególną podatność na wypadki, niepowodzenia itp. Jeżeli w tym samym dniu zbiegają się dni krytyczne 2 lub 3 ocenianych biorytmów, to mówi się o dniach katastrof itp.

W latach 70. hipoteza ta trafiła na podatny grunt szeroko rozumianej publiczności z uwagi na prostotę w ocenie aktualnych możliwości indywidualnego człowieka, dostępność prostych programów komputerowych – gdzie wprowadzając datę urodzin uzyskiwano receptę na powodzenie. Problem był oceniany przez organizatorów pracy, przez organa odpowiedzialne za powszechne bezpieczeństwo, służby ruchu lotnictwa wojskowego i cywilnego.

Dość wcześnie okazało się, w systematycznych badaniach naukowych z wykorzystaniem metod statystycznych, że nie występuje udowodniony związek między cyklem biorytmów wynikających z daty urodzin a skłonnością do ulegania lub powodowania wypadków w pracy, jak i w komunikacji. Wolcott i wsp. [26] zestawiają z danych bibliograficznych okoliczności 23 tys. wypadków komunikacyjnych i przemysłowych, nie wykazując znaczącej statys-

tycznie korelacji między wypadkiem a cyklem biorytmów. Ci sami autorzy w badaniach własnych ocenili 2 479 wypadków lotniczych zaistniałych w US Air Force, a zakwalifikowanych jako „wypadki zaistniałe z udziałem pilota". Wniosek z ich badań jest sformułowany dość kategorycznie: nie stwierdzono korelacji pomiędzy jakimkolwiek aspektem teorii biorytmów a występowaniem wypadków lotniczych. Nie obserwowali oni tendencji do wzrostu liczby wypadków ani w fazach ujemnych, ani nawet w szczytowych punktach faz ujemnych w indywidualnych cyklach czy wtedy, gdy wszystkie 3 cykle były w fazie ujemnej. Wydaje się, że zakończeniem prób wykorzystywania teorii biorytmów dla potrzeb ruchu lotniczego i bezpieczeństwa latania jest publikacja Englund i Nattoh [7]. I tym razem autorzy informują o braku związków pomiędzy fazami biorytmów wyliczonymi z daty urodzin a poziomem realizacji zadań lotniczych, sprawności fizycznej, intelektualnej u 26 ochotników, którzy poddali się 2-letnim systematycznym badaniom.

Problem ten komentuję tak szczegółowo, ponieważ ciągle pojawiają się osoby mające gotowe recepty na błyskawiczną poprawę bezpieczeństwa pracy lub komunikacji. Powołują się na niestety niewiarygodne źródła, często jednak znajdując jeżeli nie posłuch, to życzliwe zainteresowanie ze strony organizatorów pracy, władz przedsiębiorstw komunikacyjnych. Dość trafnie sprawę tę komentuje prof. Franz Halberg — twórca współczesnej chronobiologii z University of Minnesota (USA): „...biorytmy wyliczane z daty urodzin, pozwalające przewidywać dobre i złe dni, okazały się sukcesem handlowym. Nie spotkaliśmy uzasadnionych i udowodnionych naukowo dowodów za słusznością tej hipotezy". [8]

OKOŁODOBOWE RYTMY BIOLOGICZNE U CZŁOWIEKA

Poszukiwania i opis układu anatomicznego zdolnego do generowania okołodobowych rytmów biologicznych u człowieka i ssaków było poprzedzone udowodnieniem, że rytmika biologiczna jest natury endogennej, nie zależy od zmienności czynników środowiskowych. Jeszcze w latach 70. ukazywały się wyniki badań naukowych, które miały udowadniać, że rytmy biologiczne są skutkiem oscylacji dobowych w natężeniu naturalnych pól elektrycznych.

W chwili obecnej endogenna natura okołodobowych rytmów biologicznych jest już niekwestionowana.

U ludzi żyjących poza kołem podbiegunowym w lecie lub zimie, u zwierząt żyjących w jaskiniach lub w nich uwięzionych przez złą pogodę — znika możliwość odliczania czasu na podstawie dobowych zmian natężenia środowiskowych, naturalnych „dawców czasu". Izolację od naturalnych dawców czasu (synchronizatorów) można symulować w specjalnie przygotowanych laboratoriach. Przykładem wykorzystania warunków laboratoryjnych są badania prowadzone na ochotnikach, poddawanych różnym wariantom izolacji

specjalnej w podziemnych bunkrach (izolowanych nie tylko od naturalnego cyklu dzień-noc, ale także od subtelnych czynników geofizycznych) w Instytucie Maxa Plancka w Andechs (RFN) [2,25]. Zarówno w warunkach naturalnych, jak i laboratoryjnych, przy braku synchronizatorów środowiskowych, tak u ludzi jak i u zwierząt, zamiast ściśle 24-godzinnych rytmów biologicznych pojawiają się rytmy **swobodnie biegnące** (z ang. free-running rhythms). Okres rytmu swobodnie biegnącego, krótszy lub dłuższy od 24 godzin, jest charakterystyczny dla poszczególnych gatunków.

Badania doświadczalne rytmów swobodnie biegnących doprowadziły do poznania właściwości rytmów okołodobowych. Za charakterystyczne cechy rytmów okołodobowych uważa się:

a) utrzymywanie się rytmiki w stałych warunkach środowiskowych (tzn. przy braku synchronizatorów);

b) okres rytmu bliski 24 godzin;

c) zdolność kompensowania wpływu temperatury zewnętrznej;

d) zdolność synchronizowania rytmu do faz środowiskowych dawców czasu (zakres synchronizacji u człowieka 20-28 godz.);

e) przesuwanie fazy rytmu pod wpływem pulsów (błysków) świetlnych, wrażliwość na intensywność oświetlenia;

f) skracanie okresu rytmu swobodnie biegnącego w procesie starzenia się;

g) genetyczne uwarunkowania rytmiki okołodobowej;

h) dziedziczenie informacji o rytmice okołodobowej przez potomstwo zgodnie z prawami genetyki.

U ssaków fazy rytmów okołodobowych p ł o d ó w są zgodne z fazami rytmów okołodobowych matki. We krwi matki zmienia się w ciągu doby stężenie hormonów, substancji odżywczych, które przenikają do płodu przez barierę łożyskową. W badaniach doświadczalnych wykazano w szyszynce płodów szczurzych rytmikę okołodobowej aktywności transferazy N-acetyl-serotoninowej (NAT — enzymu kluczowego w syntezie hormonu szyszynki — melatoniny) zgodną z fazami światło-ciemność, w jakich żyje matka.

Tuż po urodzeniu u noworodków nie udaje się wykazać przejawów wyraźnej rytmiki dobowej. Dopiero po pewnym czasie pojawiają się cechy rytmicznej czynności poszczególnych układów. Z czasem rytmy te będą ukształtowane, a ich amplituda będzie wzrastać.

U człowieka w 3 miesiącu życia można wykazać synchronizację pewnych rytmów niemowląt do życia jego rodziców (przede wszystkim matki). W miarę starzenia się, w przeciwieństwie do jego właściciela — zegar biologiczny zaczyna „chodzić szybciej, spieszyć się". Oznacza to skrócenie okresu rytmu swobodnie biegnącego, zmniejsza się również amplituda tego rytmu. U gryzoni na przestrzeni całego życia skrócenie okresu rutmu swobodnie biegnącego szacuje się na 0,2-0,4 godziny. Skrócenie okresu rytmu w wieku starszym wiąże się być może ze zmniejszeniem wydzielania hormonów płciowych lub (i) ze zmianami morfologicznymi i czynnościowymi w rozruszniku rytmów okołodobowych.

SYNCHRONIZATORY OKOŁODOBOWYCH RYTMÓW BIOLOGICZNYCH U SSAKÓW I CZŁOWIEKA

U człowieka i innych ssaków rolę synchronizatorów może spełniać kilka cyklicznie zmieniających się warunków środowiska zewnętrznego. Najczęściej wymienia się następujące synchronizatory:

– cykl światło–ciemność (L–D);

– pora karmienia;

– dobowe wahania temperatury zewnętrznej. Należy wyróżnić tu wspomnianą uprzednio kompensację temperatury przez mechanizmy zegara biologicznego; rola dobowych wahań temperatury zewnętrznej sprowadza się w synchronizacji rytmiki okołodobowej do okresowej stymulacji receptorów skórnych – bez wpływu na temperaturę głęboką ciała;

– cykle kontakt socjalny–izolacja socjalna. Cykle te mogą mieć istotne znaczenie w przyśpieszeniu adaptacji rytmiki okołodobowej u człowieka po nagłej zmianie stref czasu;

– cykle hałas–cisza u człowieka nie mają chyba większego znaczenia.

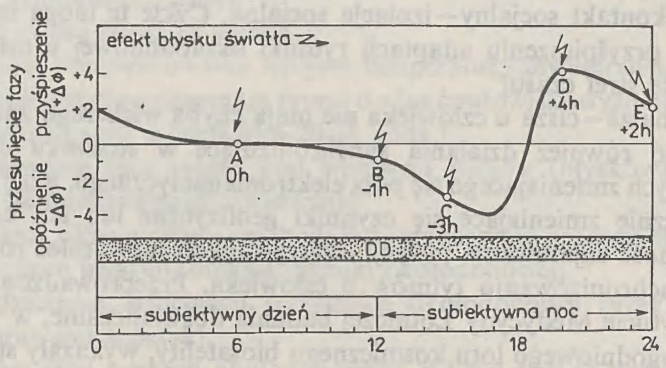
Wykazano również działania synchronizujące w stosunku do rytmów okołodobowych zmieniającego się pola elektromagnetycznego. Rolę taką mogą pełnić cyklicznie zmieniające się czynniki geofizyczne lub ich kombinacja. Naprzemienność zajmowania pozycji leżącej-stojącej może mieć również znaczenie w synchronizowaniu rytmów u człowieka. Przeprowadzone w Wojskowym Instytucie Medycyny Lotniczej badania doświadczalne, w warunkach realnego 3-tygodniowego lotu kosmicznego biosatelity, wykazały stabilizującą rolę ziemskiej grawitacji w stosunku do okołodobowych rytmów biologicznych wydalania nerkowego elektrolitów oraz hydroksyproliny u szczurów.

MECHANIZM SYNCHRONIZACJI RYTMÓW OKOŁODOBOWYCH

W badaniach nad mechanizmami synchronizacji rytmów okołodobowych wykorzystuje się obserwacje wpływu dawców czasu na fazę rytmów swobodnie biegnących. Zwierzęta przebywające w warunkach DD poddawane są, w różnych porach ich subiektywnej doby, działaniu krótkotrwałego, zwykle kilkuminutowego błysku (pulsu) światła. Zależnie od subiektywnej pory doby (zwierzę przebywa w DD) uzyskuje się wyraźne różnice w zachowaniu się fazy rytmu swobodnie biegnącego. Analiza uzyskanych wyników pozwoliła na dokonanie uogólnienia – wykreślenia k r z y w e j o d p o w i e d z i f a z o w e j (PRC = Phase Response Curve). Podstawowe cechy PRC to przyspieszenie fazy rytmu pod wpływem ekspozycji na światło w późnych godzinach nocnych oraz jej opóźnienie przy błysku światła w godzinach odpowiadających porom wczesnowieczornej i wczesnonocnej (rys. 1). Można więc z pewnym przybliżeniem stwierdzić, że synchronizacja rytmów okołodobowych pod wpływem światła sprowadza się w naturalnych warunkach L/D

do przyśpieszenia fazy rytmu w godzinach rannych (wschód Słońca); zachód Słońca opóźnia fazę. Zgodnie z rysunkiem 1, przy ekspozycji na światło przed wschodem Słońca obserwuje się przyśpieszenie fazy rytmu blisko o 2 godziny. Błysk światła po zachodzie Słońca opóźnia fazę rytmu o 1 godzinę. W warunkach rytmu swobodnie biegnącego ta różnica w PRC tłumaczy okres rytmu (średnio około 25 godz.). W warunkach naturalnych przewaga tendencji do przyśpieszenia fazy blisko o 1 godzinę nad opóźnieniem fazy może tłumaczyć przyczyny i mechanizm synchronizacji rytmów biologicznych człowieka i zwierząt do rytmu 24-godzinnego. Zrozumiałe jest, że reakcja na światło dotyczy tych jego długości, dla których istnieją receptory w siatkówce oka.

Znajomość przebiegu PRC może okazać się przydatna w analizowaniu reakcji organizmu człowieka poddanego w różnych porach doby działaniu



Rys. 1. Charakterystyka krzywej odpowiedzi fazowej na błysk światła w różnych porach doby (zwierzę przetrzymywane w stałych warunkach DD. (wg [17] zmodyf.)

innych poza światłem synchronizatorów rytmów okołodobowych. Podobny przebieg do PRC obserwuje się w odpowiedziach organizmu — zaburzeniach przebiegu rytmów okołodobowych — na działanie licznych stresorów fizycznych, chemicznych lub ich kombinacji.

UKŁAD GENERUJĄCY RYTMY OKOŁODOBOWE U CZŁOWIEKA

Układ generujący okołodobowe rytmy biologiczne u człowieka nie jest jeszcze poznany pod względem szczegółów tak anatomicznych, jak i fizjologicznych. Istniejące fakty upoważniają jednak już teraz do opisu tego układu, zwanego także układem cirkadialnym (circadian system). Centralną częścią układu cirkadialnego jest rozrusznik rytmów. Rozrusznikiem (pacemaker) rytmów okołodobowych mogą być komórki mające zdolność odliczania upływu czasu, zdolność uwarunkowaną genetycznie. Odliczanie czasu może polegać na spontanicznych oscylacjach komórek rozrusznika, niezależnych od faz środowiska zewnętrznego.

ROZRUSZNIK RYTMÓW OKOŁODOBOWYCH U SSAKÓW I CZŁOWIEKA

Lokalizację anatomiczną rozrusznika centralnego upatruje się w jądrze nadskrzyżowaniowym — *nucleus suprachiasmaticus* (SCN). SCN jest utworzone przez dwa symetrycznie położone skupienia neuronów, leżących ponad skrzyżowaniem nerwów wzrokowych. U gryzoni stosunkowo dawno dokonano opisu anatomicznego tego jądra podwzgórza, natomiast jeszcze do połowy lat 70. istnienie tego jądra u człowieka nie było w pełni oczywiste. Okazało się, że znane było ono uprzednio pod licznymi synonimami. SCN u człowieka tworzą małe neurony o średnicy 5-15 μm. Szczegóły budowy anatomicznej SCN były treścią licznych prac oryginalnych, ale także poglądowych [17, 22].

U gryzoni SCN jest jedyną strukturą anatomiczną ośrodkowego układu nerwowego (OUN) wykazującą zróżnicowanie rytmu aktywności metabolicznej zależnie od pory doby. W badaniach elektrofizjologicznych *in vivo* i *in vitro* wykazano istotne różnice w aktywności neuronów zależnie od pory doby (u zwierząt synchronizowanych do schematu L/D).

Poprzez analogię można spodziewać się podobnych właściwości SCN u ludzi. Nie wiadomo jednak, czy jest to jedyne miejsce, gdzie występuje rozrusznik rytmów, czy też podobną rolę mogą pełnić inne struktury zlokalizowane w podwzgórzu lub poza nim w OUN.

Badania nad lokalizacją centralnego rozrusznika rytmów okołodobowych prowadzi się często na zwierzętach oślepionych, by wyłączyć je spod wpływu cyklu L/D. U zwierząt tych wyodrębniają się z czasem rytmy swobodnie biegnące o ustalonym okresie. Uszkodzenie elektrolityczne części SCN powoduje zmianę okresu niektórych rytmów behawioralnych. Częściowe uszkodzenie SCN może jednak także powodować całkowite wypadnięcie czynności rytmicznych organizmów. Zanik rytmiki w tym ostatnim przypadku może być stały lub po pewnym okresie od urazu czynności rytmiczne mogą stopniowo powracać. Całkowite uszkodzenie obustronne SCN powoduje stałe i całkowite zaniknięcie przejawów rytmiki okołodobowej. Dane te mogą sugerować, że w SCN znajdują się regiony, które mogą być odpowiedzialne za generowanie pewnych rodzajów rytmów okołodobowych. Poszczególne neurony (oscylatory) SCN mogą być podzielone na osobne grupy czynnościowe.

O własnościach rozrusznika centralnego rytmów okołodobowych można przekonać się analizując zachowanie się rytmów swobodnie biegnących dla poszczególnych czynności fizjologicznych. U ludzi przebywających w izolacji socjalnej ujawniają się rytmy swobodnie biegnące o różnym okresie. Rytm sen-czuwanie, rytm wydalania jonów wapnia z moczem cechują się okresem 33,5 godziny, gdy rytm diurezy oraz wydalania z moczem jonów sodu i potasu — okresem 24,8 godziny [25]. Stan taki nosi nazwę

desynchronizacji wewnętrznej. Moore-Ede i wsp. [17] przyporządkowują grupy rytmów okołodobowych odpowiednim hipotetycznym rozrusznikom (lub składowym centralnego rozrusznika), które są odpowiedzialne za generowanie tych rytmów. Umownie rozruszniki te nazywają symbolami X i Y.

Umownemu rozrusznikowi X przypisano generowanie następujących rytmów: temperatury głębokiej ciała, wydzielania kortizolu, fazy snu paradoksalnego (REM), wydalania potasu z moczem; natomiast rozrusznikowi Y: temperatury skóry, wydzielania hormonu wzrostu, fazy snu wolnofalowego oraz wydalania wapnia z moczem. Warto zauważyć, że szczególnie ważne czynności życiowe — sen i termoregulacja znajdują się pod kontrolą obu rozruszników X i Y.

Potwierdzeniem istnienia przynajmniej dwóch grup oscylatorów centralnego rozrusznika okołodobowego rytmów biologicznych mogą być wnioski wynikające z badań Pittendrigha i Daana [18]. Wykazali oni, że w normalnych warunkach LD w rytmie aktywności motorycznej chomika można wydzielić dwa szczyty — aktywności rannej i wieczornej lub nocnej. Autorzy ci wprowadzili dla domniemanych oscylatorów generujących rytmikę motoryczną chomika terminy: oscylator M (morning) — sterujący aktywnością poranną oraz oscylator N (night) lub E(evening) — do sterowania aktywnością nocną lub wieczorną.

WTÓRNE OSCYLATORY BIOLOGICZNE RYTMÓW OKOŁODOBOWYCH

Zanik informacji ze strony centralnego rozrusznika rytmów okołodobowych oraz brak cykliczności środowiskowych dawców czasu mogą powodować pojawienie się rytmiki czynności narządów (układu) o cechach rytmu swobodnie biegnącego, generowanych przez wtórne oscylatory rytmów okołodobowych. Jest to dość czytelna analogia do rozruszników serca odpowiedzialnych za generowanie rytmu skurczów serca. Zanik impulsacji z węzła zatokowego powoduje ujawnienie się impulsacji generowanej przez węzeł przedsionkowo-komorowy.

Przykładem narządu obdarzonego cechami wtórnego oscylatora rytmów cirkadialnych może być kora nadnerczy. Z tych też przyczyn tam właśnie upatrywano lokalizacji centralnego rozrusznika zegara biologicznego.

ROLA MEDIATORÓW W CZYNNOŚCI UKŁADU GENERUJĄCEGO RYTMY OKOŁODOBOWE U SSAKÓW I CZŁOWIEKA

Pozwiązanie poszczególnych elementów układu cirkadialnego, od centralnego rozrusznika poprzez wtórne oscylatory, elementy pasywne do poszczególnych układów, narządów i tkanek i wreszcie pojedynczych komórek, obok

powiązania układu cirkadialnego z receptorami rejestrującymi zmiany w fazie synchronizatorów środowiskowych, odbywa się przez m e d i a t o r y, którą to rolę mogą pełnić hormony lub obwodowy układ nerwowy. Zarówno układ dokrewny, jak i układ nerwowy, spełniają warunki stawiane mediatorom, szybko osiągają narząd docelowy. Ponadto oba układy wykazują wyraźną rytmikę dobową swoich czynności.

Wykazano istnienie powiązań pomiędzy SCN a siatkówką. Jest to szlak siatkówkowo-podwzgórzowy. Przed kilkunastu laty szlak ten został wyodrębniony przez H o l l w i c h a [12] jako energetyczna część drogi wzrokowej. Kończy się ona w podwzgórzu, przekazuje informacje o intensywności oświetlenia. Komórki SCN, wrażliwe na informacje o zmianie natężenia światła w otaczającym środowisku, zmieniają częstość tonicznych impulsacji, zgodnie ze zmianami natężenia światła.

Jak dotychczas, tylko u królików wykazano istnienie pętli nerwowej siatkówkowo-siatkówkowej. Część pętli biegnąca od SCN do siatkówki, składająca się z włókien współczulnych, zmienia dobową wrażliwość narządu na poziom iluminacji otoczenia. Wrażliwość siatkówki na iluminację obniża się w ciągu dnia (fazy jasnej) i podwyższa w nocy (fazy ciemnej).

SZYSZYNKA

W układzie generującym rytmy okołodobowe, ale także sezonowe, szczególna rola przypada s z y s z y n c e. Rola ta jest jeszcze bardziej widoczna u ptaków, gdzie szyszynka pełni rolę oscylatora rytmów okołodobowych [24].

Przed przeszło 30 laty odkryto hormon szyszynki melatoninę. Hormon jest wydzielany cyklicznie, niezależnie od trybu życia zwierząt, zarówno aktywnych nocą jak i dniem, szczyt wydzielania przypada na godziny nocne.

U ssaków informacja o fazie LD dociera do narządu szlakiem nerwowym rozpoczynającym się w neuronach siatkówki, wspomnianą poprzednio częścią energetyczną drogi wzrokowej do SCN, dalej przez połączenia wieloneuronowe droga nerwowa prowadzi przez pień mózgu, rdzeń kręgowy, górne zwoje nerwowe szyjne. Pozazwojowe włókna współczulne kończą się w przestrzeniach okołonaczyniowych — blisko ciała pinealocytów.

W normalym cyklu L/D neurony SCN generują impulsy tylko w porze nocnej, światło wywiera efekt hamujący. W warunkach DD generowanie impulsów w SCN i przekazywanie ich dalej do szyszynki odbywa się z okresem charakterystycznym dla rytmu swobodnie biegnącego o okresie różniącym się ściśle od 24 godzin.

Ekspozycja człowieka na jaskrawe oświetlenie w porze nocnej, zwłaszcza w pierwszej połowie snu, powoduje gwałtowne zahamowanie syntezy i uwalniania melatoniny. Sygnałem stymulującym pinealocyty do syntezy melatoniny

Rys. 2. Schemat budowy pinealocyta na podstawie zdjęcia w mikroskopie elektronowym. Try – tryptofan, 5-HT – serotonina, Mel – melatonina, Erg – ergastoplazma, N – jądro, AG – aparat Golgiego, WNW – włókna nerwowe współczulne, pow – przestrzeń okołowłośniczkowa, per – perycyt, wk – włókna kolagenowe, strzałki oznaczają kierunek transportu substratu hormonalnego (tryptofan), miejsce syntezy melatoniny, kierunek wydzielania produktu hormonalnego (wg [15])

jest pojawienie się noradrenaliny, która działa na receptory *beta*-adrenergiczne, znajdujące się w błonie komórkowej pinealocytów. Związanie się noradrenaliny z receptorem błony komórkowej uwalnia znany łańcuch reakcji, z udziałem białka transportowego G, wiodący do wzrostu stężenia w cytoplazmie pinealocyta c-AMP. Pojawienie się c-AMP stymuluje rozpoczęcie syntezy melatoniny

[14, 24]. Działanie noradrenaliny na produkcję melatoniny jest ułatwione w nocy z powodu wzrostu ekspresji receptorów *beta*-adrenergicznych na powierzchni komórki o tej porze doby. Melatonina prawie natychmiast po zsyntetyzowaniu w pinealocycie jest uwalniana do krwiobiegu (rys. 2).

Synteza melatoniny zachodzi także poza szyszynką, a producentami hormonu mogą być: gruczoły Harderiana, siatkówka, erytrocyty, niektóre okolice i regiony układu pokarmowego. Jak się jednak wydaje, wyprodukowana w tych narządach melatonina wykorzystywana jest lokalnie i nie trafia do krwiobiegu. Byłoby to działanie melatoniny parakrynne.

Szyszynka nie posiada zdolności gromadzenia melatoniny, dlatego stężenie hormonu w surowicy lub jej metabolitów w moczu jest wykładnikiem syntezy w szyszynce. Zależnie od gatunku zwierząt dokonano arbitalnej klasyfikacji wzorców wydzielania hormonu w ciągu doby [20]. Wyróżniono typy sekrecji melatoniny oznaczonej symbolami A, B, i C. Typ A – występuje przede wszystkim u gryzoni (chomik syryjski, gerbil mongolski) i charakteryzuje się pojawieniem wzrostu wydzielania hormonu w postaci dyskretnego szczytu w drugiej części pory zaciemnienia. Typ B wydzielania melatoniny – dotyczy także człowieka, opisano go u wiewiórek, szczura białego – polega na stopniowym narastaniu produkcji hormonu, w środku pory ciemnej występuje maksimum sekrecji. Wreszcie typ C – opisany u kota domowego, owcy – polega na gwałtownym wzroście sekrecji z chwilą zaciemnienia, osiągnięciu i utrzymywaniu się plateau aż do początku fazy jasnej, gdy wydzielanie hormonu zmniejsza się równie gwałtownie jak narastało. W warunkach naturalnych, zależnie od proporcji L/D, zmniejsza się lub wydłuża czas produkcji i wydzielania melatoniny przez szyszynkę. Być może szczególna rola szyszynki może sprowadzać się do przystosowania organizmu człowieka (i oczywiście ssaków) do naprzemienności pór roku w przyrodzie.

Szyszynka w hierarchii układu cirkadialnego u człowieka odgrywa rolę elementu pasywnego. Utrata powiązania szyszynki z SCN doprowadza do zaniku rytmu wydzielania melatoniny.

MELATONINA

Neurohormon szyszynki został odkryty przez Aarona L e r n e r a w roku 1969. Regulacyjna rola melatoniny w stosunku do rytmów okołodobowych, a zapewne i sezonowych, może polegać na modulowaniu czynności układu dokrewnego. Modulowanie to może dotyczyć jąder podwzgórza – ośrodków neurosekrecyjnych, gdzie odbywa się synteza i wydzielanie liberyn i statyn. Szyszynka wpływałaby więc nie na konkretny narząd docelowy, ale pełniłaby rolę „regulatora regulatorów".

W tłumaczeniu mechanizmu działania melatoniny rozpatruje się dwie obecnie obowiązujące hipotezy:

– hipoteza związana z czasem utrzymywania się wysokiego stężenia melatoniny w płynach biologicznych (z ang. duration hypothesis). OUN na podstawie wysokiego stężenia melatoniny informowany jest o okresie doby (nocy) lub sezonie (proporcja nocy do długości doby):

– hipoteza koincydencji. W organizmie mogą występować dwa 24-godzinne rytmy syntezy i wydzielania melatoniny oraz wrażliwości komórek na melatoninę. W rytmie wrażliwości występuje w ciągu doby „okno" i jeżeli w tym okresie pojawi się w płynach biologicznych melatonina, wówczas informacja o obecności hormonu będzie odczytana. Natomiast brak koincydencji obu rytmów powoduje ignorowanie informacji o obecności hormonu.

Istotnym postępem w zrozumieniu mechanizmów odpowiedzialnych za czynność układu cirkadialnego u człowieka były wyniki badań nad receptorami melatoniny u ludzi. Zwłaszcza ważne wydają się wyniki badań nad lokalizacją receptorów melatoniny w komórkach OUN. W badaniach przeprowadzonych *in vitro* na skrawkach podwzgórza ludzi w kilka lub kilkanaście godzin po śmierci poprzez inkubację skrawków w roztworze z 125-I-melatoniną, a następnie opierając się na wynikach badań autoradiograficznych i biochemicznych (lokalizacja i wizualizacja receptora) opisano obecność receptorów melatoniny w neuronach SCN. Fakt ten może świadczyć o istnieniu wzajemnego sprzężenia zwrotnego między SCN (czyli generatorem rytmu okołodobowego, także syntezy i wydzielania melatoniny) a szyszynką. Stwarza to teoretyczne uzasadnienie klinicznego stosowania melatoniny egzogennej w celu przyśpieszenia resynchronizacji rytmów okołodowych po nagłej zmianie strefy czasu, w profilaktyce stanów desynchronizacji. Melatonina, poza opisanym wpływem na układ dokrewny, ma wpływać na przebieg snu, proces starzenia organizmu, procesy odpornościowe.

ZEGAR BIOLOGICZNY KOMÓRKI – DZIEDZICZENIE RYTMÓW OKOŁODOBOWYCH

Najbardziej spektekularnym przykładem zdolności pojedynczej komórki wielokomórkowego organizmu do odliczania czasu jest utrzymywanie się wielu przejawów rytmiki okołodobowej w izolowanych komórkach *in vitro*. Do klasycznych przejawów rytmiki zalicza się rytm mitotyczny komórek, występujący w warunkach *in vivo*, a utrzymujący się nadal w warunkach *in vitro*.

Wyjaśnienie mechanizmów kontroli genetycznej rytmów okołodobowych pojedynczej komórki proponowała teoria Ehreta i Trucco [6]. Autorzy ci wprowadzili termin chronon przez analogię do uniwersalnej teorii Jacoba i Honoda [14] dotyczącej kontroli genetycznej metabolizmu komórki, gdzie używany jest termin **operon**. Podobnie jak w budowie operonu, chronon miał składać się z zespołu genów strukturalnych i genu operatora. Zależnie od przebiegu transkrypcji w kolejnych genach strukturalnych, m-RNA

wędrował do cytoplazmy, gdzie zachodziła translacja i pojawiały się odpowiednio zaprogramowane białka. Ten właśnie produkt — białko pojawiające się okresowo w życiu komórki — miał regulować czynnością komórki zależnie od pory doby.

Rozwinięciem rozważań o kontroli mechanizmów genetycznych rytmiki okołodobowej była teoria **cytochronu** zaproponowana przez Edmundsa [5]. Teoria cytochronu tłumaczy zaskakującą obserwację, że mimo braku czasu trwania cyklu generacyjnego komórki jako wielokrotności 24 godzin, dość często akrofazy mitoz przypadają o względnie stałych porach doby.Wprowadzono do znanych już faz cyklu generacyjnego G_1-S-G_2-M i cytokinezy pojęcie punktów kontrolnych (CP = control points). Cykl generacyjny może być skracany lub wydłużany zależnie od czasu, w jakim komórka przygotowująca się do podziału osiągnie punkt kontrolny.

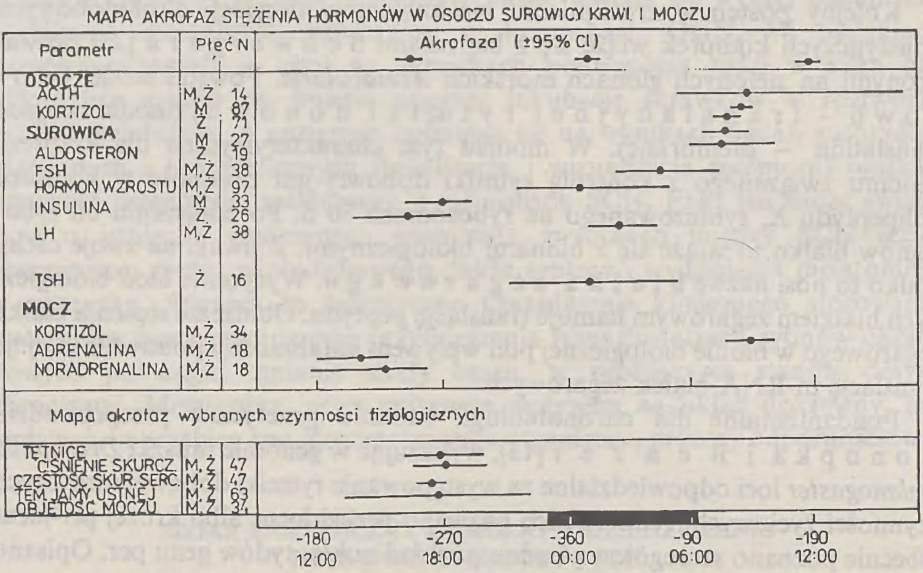
Kolejny postęp w zrozumieniu mechanizmów oscylacji okołodobowych pojedynczych komórek wiąże się z badaniami Schweigera [23] prowadzonymi na zielonych glonach morskich *Acetabularia*. Powstał model błonowo-translacyjnej rytmiki dobowej (model coupled translation — membrane). W modelu tym charakterystyczna dla ekspresji genomu związanego z kontrolą rytmiki dobowej jest obecność w komórce polipeptydu X, syntezowanego na rybosomach 80 S. Po odłączeniu od rybosomów białko to wiąże się z błonami biologicznymi. Z uwagi na swoje cechy białko to nosi nazwę **białka zegarowego**. Wysycenie błon biologicznych białkiem zegarowym hamuje translację peptydu. Obniżenie stężenia białka zegarowego w błonie biologicznej pod wpływem katabolizmu ponownie inicjuje translację m-RNA białek zegarowych.

Fundamentalne dla chronobiologii badania genetyczne przeprowadzili Konopka i Benzer [13], wykazując w genomie muszki *Drosophila melanogaster* loci odpowiedzialne za występowanie rytmiki dobowej niektórych czynności życiowych. Jedno z nich nazwano **period locus** albo krócej **per-locus** Obecnie poznano szczegółową budowę i skład nukleotydów genu per. Opisano również skutki mutacji poszczególnych alleli.

W roku 1988 Ralph i Menaker [19] publikują wyniki badań genetycznych z zakresu chronobiologii ssaków. U chomika syryjskiego wykazali oni mutację w aparacie genetycznym, która polegała na skrócniu okresu (*tau* — litera grecka zwyczajowo przyjęta dla określania okresu) rytmu okołodobowego. Autorzy opisują własności **genu tau** (nazwanego analogicznie z genem *per* u owadów), zasady jego dziedziczenia u potomstwa samic z nie zmienionym genem *tau*, a krzyżowanych z samcem o wykazanej mutacji genu *tau*. Należy w najbliższej przyszłości oczekiwać wyizolowania genu *tau*, ustalenia jego produktów zarówno transkrypcji, jak i translacji.

PRZYKŁADY RYTMÓW OKOŁODOBOWYCH CZŁOWIEKA

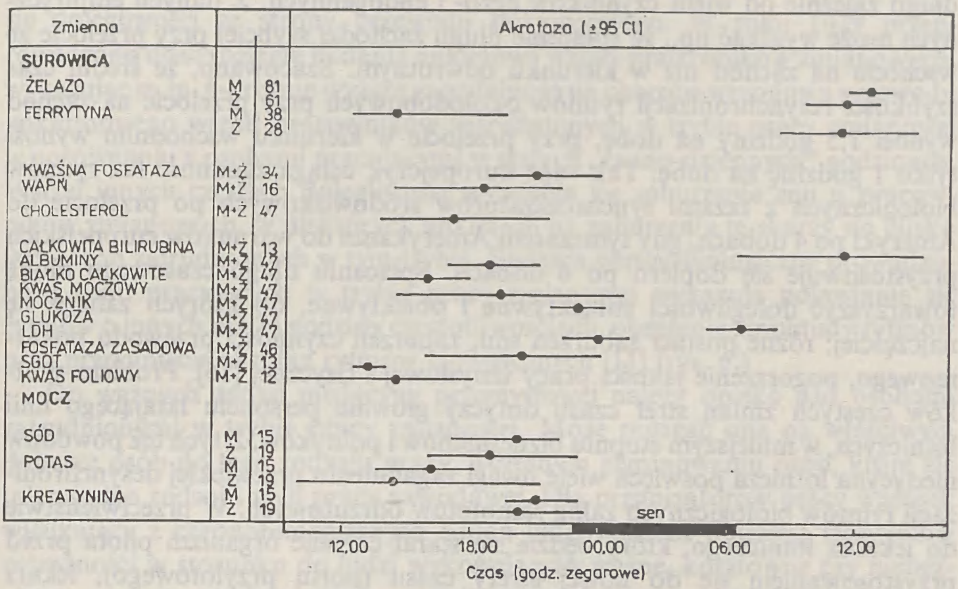
Większość czynności życiowych organizmu człowieka charakteryzuje się występowaniem rytmów okołodobowych. Rytmy te w ustalonych warunkach życia, tzn. przy pobycie w stałej strefie geograficznej (klimatycznej) i czasowej, przy prowadzeniu względnie uregulowanego trybu życie, a szczególnie przestrzeganiu stałych pór snu, pracy, odżywiania się, mogą być dość precyzyjnie opisywane statystycznie. Statystyczna charakterystyka rytmu okołodobowego zwykle składa się z podania wartości mezora, akrofazy i amplitudy (oraz odpowiednio SD, przedziałów ufności dla akrofazy i amplitudy). Na rysunkach 3, 4 i 5 zestawiono przykłady ilustrujące dobową zmienność natężenia niektórych procesów fizjologicznych organizmu człowieka.



Rys. 3. Przykłady map akrofaz stężenia hormonów w surowicy krwi i moczu, akrofaza i przedział ufności

Rys. 4. Przykłady map akrofaz wybranych czynności fizjologicznych u człowieka

Należy w tym miejscu dobitnie podkreślić fakt, że charakterystyka konkrentego rytmu okołodobowego, jak i jego powiązania z innymi rytmami, jest przypisana ustalonej sytuacji z punktu widzenia chronobiologii, a przede wszystkim synchronizacji do L/D. Charakterystyka ta może i będzie się zmieniać wraz ze zmianą sezonu, zmianą miejsca pobytu przy zmianie stref czasu w nowym miejscu zamieszkania.



Rys. 5. Dalsze przykłady map akrofaz składników chemicznych w surowicy i moczu u człowieka

ZABURZENIA OKOŁODOBOWYCH RYTMÓW BIOLOGICZNYCH U CZŁOWIEKA W STANACH PRAWIDŁOWYCH

Charakterystyka okołodobowych rytmów biologicznych u człowieka ulega wyraźnym (zwykle przejściowym) zaburzeniom jako następstwo:

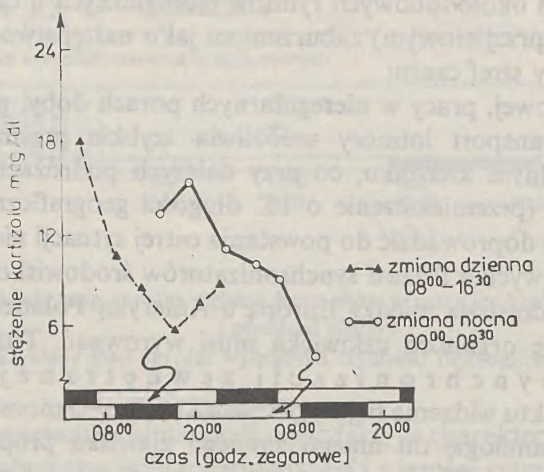
– nagłej zmiany stref czasu;

– pracy zmianowej, pracy w nieregularnych porach doby, pracy nocnej.

Współczesny transport lotniczy umożliwia szybkie przemieszczanie się człowieka w dowolnym kierunku, co przy dalszych podróżach wiąże się ze zmianą stref czasu (przemieszczenie o 15° długości geograficznej – rożnica 1 godziny). Musi to doprowadzić do powstania ostrej sytuacji niezgodności faz rytmów okołodobowych z fazami synchronizatorów środowiskowych, zwłaszcza L/D. Różnica czasowa między Europą a Ameryką Północną wynosi 6-7 godzin, i różnicę tę organizm człowieka musi wyrównać. Tuż po przelocie powstaje stan d e s y n c h r o n i z a c j i z e w n ę t r z n e j rytmów okołodobowych. Z punktu widzenia fizjologii człowieka, w tym momencie powstaje stan, który przez analogię do innego znanego zjawiska proponuję nazwać **stanem długu czasowego**. Dług czasowy – tak rozumiany – oznacza potrzebę jego „spłacenia", tak by wskazania zegarów biologicznych organizmu człowieka były zgodne ze wskazaniami zegara astronomicznego danej strefy geograficznej. Dług czasowy ma liczne synonimy w piśmiennictwie anglosaskim – jet-lag, jet pilot syndrome, desynchronsis. Okres spłacania długu czasowego jest okresem r e s y n c h r o n i z a c j i rytmów okołodobowych, trwa różnie

długo zależnie od wielu czynników egzo- i endogennych. Z danych empirycznych może wynikać np., że spłacenie długu zachodzi szybciej przy przelocie ze wschodu na zachód niż w kierunku odwrotnym. Szacowano, że średni czas szybkości resynchronizacji rytmów okołodobowych przy przelocie na zachód wynosi 1,5 godziny na dobę, przy przelocie w kierunku wschodnim wynosi tylko 1 godzinę na dobę. Tak więc Europejczyk osiąga zgodność faz rytmów biologicznych z fazami synchronizatorów środowiskowych po przelocie do Ameryki po 4 dobach, gdy tymczasem Amerykanin do warunków europejskich przystosowuje się dopiero po 6 dobach. Spłacaniu długu czasowego mogą towarzyszyć dolegliwości subiektywne i obiektywne, do których zalicza się najczęściej: różne postaci zaburzeń snu, zaburzeń czynności przewodu pokarmowego, pogorszenie jakości pracy umysłowej i fizycznej [16]. Problem skutków częstych zmian stref czasu dotyczy głównie personelu latającego linii lotniczych, w mniejszym stopniu biznesmenów i polityków. Z tych też powodów medycyna lotnicza poświęca wiele uwagi zagadnieniu przewlekłej desynchronizacji rytmów biologicznych załóg samolotów odrzutowych. W przeciwieństwie do lekarza lotniczego, który będzie się starał chronić organizm pilota przed przystosowaniem się do nowej strefy czasu (portu przylotowego), lekarz sportowy będzie poszukiwał skutecznych metod przyśpieszających zgodność fazy rytmów biologicznych zawodnika z fazami synchronizatorów środowiskowych miejsca przylotu, gdzie będą się odbywać zawody sportowe [16].

Potrzebę utrzymywania pracy zmianowej, także pracy nocnej, uzasadnia się względami technologicznymi, ekonomicznymi i socjalnymi. Praca zmianowa (a



Rys. 6. Różnice w stężeniach kortizolu w surowicy zależne od pory doby i czasu trwania pracy (wg [11])

zwłaszcza praca nocna) pociąga za sobą trojakiego rodzaju skutki, są to skutki biologiczne, zdrowotne i socjologiczne. Podobnie do objawów towarzyszących stanowi długu czasowego, u pracowników zmianowych dość często rejestruje

się dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego. W roku 1929 przeprowadzono dość rozległe badania ankietowe wśród pracowników zmianowych, wykazując m.in. 8-krotnie wyższą zapadalność na chorobę wrzodową przewodu pokarmowego wśród pracowników zatrudnionych w trybie pracy zmianowej w porównaniu z osobami pracującymi w stałych „ranno-dziennych" godzinach. Wśród innych częstych dolegliwości wymienia się zaburzenia snu u pracowników zmianowych, w niektórych ankietach na zaburzenia te skarży się blisko 90% osób zatrudnionych w tym trybie. Badania chronobiologiczne prowadzone u osób pracujących w trybie pracy zmianowej wykazują pojawianie się rytmów o innych niż 24 godziny częstotliwościach, obniżenie amplitudy rytmów oraz przesunięcie akrofaz rytmów biologicznych [11] (rys. 6.)

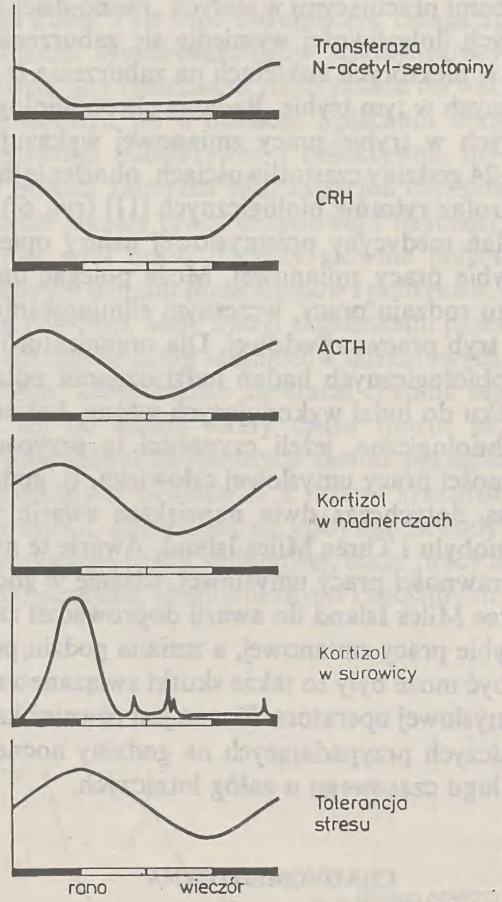
Do ważnych zadań medycyny przemysłowej należy opieka nad osobami zatrudnionymi w trybie pracy zmianowej. Może polegać ona na właściwym doborze osób do tego rodzaju pracy, wczesnym eliminowaniu osób, które źle tolerują ten rodzaj i tryb pracy zawodowej. Dla organizatorów pracy wniosek wynikający z chronobiologicznych badań ludzi oznacza potrzebę szczególnej ostrożności w stosunku do ludzi wykonujących ważne, kosztowne czy niebezpieczne procesy technologiczne, jeżeli czynności te przypadają na godziny krytyczne dla sprawności pracy umysłowej człowieka, tj. godziny 02.00-04.00. Ilustracją tej tezy są dotychczas dwie największe awarie w elektrowniach atomowych, w Czarnobylu i Three Miles Island. Awarie te nastąpiły w godzinach pogorszenia sprawności pracy umysłowej, właśnie w godzinach nocnych. W katastrofie w Three Miles Island do awarii doprowadził zapewne operator, który pracował w trybie pracy zmianowej, a zmiana godzin pracy nastąpiła na 2 dni przed awarią, być może były to także skutki związane z desynchronizacją rytmu sprawności umysłowej operatora. Znana jest również kazuistyka wypadków i katastrof lotniczych przypadających na godziny nocne lub związanych ze skutkami stanu długu czasowego u załóg lotniczych.

CHRONOMEDYCYNA

Wiedzę wynikającą z postępów chronobiologii z coraz większym powodzeniem stosuje się bądź można stosować na poszczególnych etapach postępowania lekarskiego. Wiedza ta okazuje się także przydatna do zrozumienia stanów fizjologicznych, wdrażania postępowania profilaktycznego. Wiemy już, że rytmika zjawisk biologicznych organizmu człowieka jest determinowana programem genetycznym, jest endogenna, choć ostateczna charakterystyka rytmiki dobowej modyfikowana jest synchronizatorami środowiskowymi, głównie L/D. W ocenie reakcji organizmu na bodźce środowiska zewnętrznego zwykle oczekuje się charakterystycznej odpowiedzi organizmu człowieka, zaskoczeniem może się wydawać zróżnicowanie odpowiedzi na bodziec zależnie od fazy rytmu okołodobowego. Reakcja ta podyktowana jest m.in. stanem czynnościo-

wym układu dokrewnego — może być także odczytywana jako reakcja antypacyjna na bodziec (rys. 7).

Postępowanie chronobiologiczne znajduje już zastosowanie zarówno w diagnostyce, rokowaniu, wdrożeniu postępowania profilaktycznego i terapeutycznego, jak



Rys. 7. Aktywność wydzielnicza układu dokrewnego człowieka w ciągu doby; zaznaczono krzywą tolerancji stresu zależną od stanu czynnościowego osi podwzgórze—przysadka—kora nadneryczy (wg [15])

i szacowaniu zagrożeń i wczesnej prewencji zagrożeń. W tabeli 1 przedstawiono przykłady dyscyplin medycznych, stanów chorobowych, w których okazuje się lub może okazać się przydatne zastosowanie technik chronobiologicznych.

Zakres niniejszego opracowania ogranicza szersze przedstawianie szczegółowych przykładów zastosowania postępowania chronobiologicznego w medycynie, podamy więc tylko kilka.

Rytmikę dobową wykazują schorzenia układu krążenia, najczęściej objawy bólowe towarzyszące zawałowi mięśnia sercowego rejestruje się około

Tabela 1

Przykłady zastosowań technik chronobiologicznych w różnych dyscyplinach medycznych (modyfikacja własna wg [10])

Specjalność medyczna	Stosowane techniki chronobiologiczne
Alergologia Dermatologia	okołodobowy rytm wrażliwości na alergeny, także stosowane w testach skórnych; rytmika dobowa objawów towarzyszących dychawicy (astmie) oskrzelowej
Okulistyka	okołodobowy rytm ciśnienia wewnątrzgałkowego (ważne w diagnostyce jaskry); okołodobowy rytm indeksu mitotycznego nabłonka przedniego rogówki
Onkologia	wybór pory podawania leków cytostatycznych i radioterapii; rytm okołodobowy temperatury skóry w diagnostyce raka sutka
Kardiologia	prognozowanie nagłej śmierci z przyczyn kardiologicznych, analiza spektralna EKG
Neurologia Psychiatria	neuroendokrynalne podstawy osobowości, choroby depresyjne (zwłaszcza sezonowe), terapia monitorowana
Endokrynologia	kortykoterapia, insulinoterapia
Położnictwo Ginekologia	ocena ryzyka rzucawki porodowej, stan układu dokrewnego u ciężarnych
Urologia	ocena ryzyka w raku gruczołu krokowego, rytm okołodobowy wrażliwości na cytostatyki w raku nerek
Chirurgia	monitorowanie ambulatoryjne (domowe) po zabiegach operacyjnych – profilaktyka zakażeń, wybór terapii antybiotykami

godz. 10^{00}. Ostatnio wiele uwagi poświęca się właściwej diagnostyce i terapii coraz częstszego schorzenia cywilizacyjnego n a d c i ś n i e n i a t ę t n i c z e g o. 24-godzinne monitorowanie ciśnienia tętniczego krwi pozwoliło na wyłonienie stanów związanych ze zwyżką ciśnienia tętniczego w czasie godzin pracy (postać "white-coat" hypertension) lub podwyższeniem wartości mezora (mesor hypertension). W latach 80. przeprowadzono intensywne badania epidemiologiczne zagrożenia w przyszłości nadciśnieniem tętniczym noworodków urodzonych w rodzinach wysokiego ryzyka z uwagi na pozytywny w tym zakresie wywiad rodzinny, jak i u noworodków z ujemnym wywiadem rodzinnym w zakresie nadciśnienia tętniczego. U noworodków obu grup była prowadzona 48-godzinna, automatyczna (co 30 minut) rejestracja ciśnienia tętniczego krwi, co pozwoliło na dokonanie charakterystyk rytmów okołodobowych ciśnienia skurczowego krwi u obu badanych grup. Zmiany charakterystyki indywidualnego rytmu okołodobowego w noworodka z rodziny wysokiego

ryzyka winna skłaniać lekarza do wdrożenia odpowiedniego postępowania profilaktycznego przed mogącym się w przyszłości rozwinąć nadciśnieniem tętniczym [3].

Podawanie sterydów nadnerczowych w obecnej chwili podlega ściśle schematowi dawkowania „chronobiologicznego". Nie jest to równomierne rozłożenie dobowej dawki leku na 3 porcje, jak się stosuje dla większości leków, ale podanie praktycznie całej dobowej porcji w godzinach rannych. Jest to imitowanie naturalnego rytmu wydzielania glukokortykoidów. Zapobiega się w ten sposób zaburzeniu wydzielania innych hormonów, przede wszystkim ACTH.

Pewne nadzieje w skracaniu stanu długu czasowego występującego po przelotach ze zmianą stref czasu wiąże się ze stosowaniem fototerapii [4, 21] lub podawaniem preparatów farmakologicznych zawierających malatoninę [1].

Metody chronoterapii mogą się okazać przydatne w korygowaniu przebiegu schorzeń mających typowe cechy zaburzenia rytmu okołodobowego. Może to być dozowanie leku lub hormonu (np. insuliny) w ciągu doby zgodnie z naturalnym rytmem dobowym jego metabolizowania lub wydzielania.

W diagnostyce medycznej widoczny jest rozwój metod i aparatury do nieinwazyjnego rejestrowania parametrów fizjologicznych, metabolicznych i biochemicznych. Jak się wydaje, rzecz nie sprowadza się jedynie do udowodnienia rytmiczności kolejnych procesów życiowych. Oczekuje się, że na ich podstawie lub na podstawie ich zaburzeń możliwe będzie precyzyjne ustalenie objawów charakterystycznych dla poszczególnych jednostek chorobowych. Znajomość takich rytmów — o charakterze markerowym — może być pomocna również w wyborze i ocenie skuteczności zastosowanej terapii [9, 10].

LITERATURA

1. Arendt J., Brodway J., English J.E., Kemp M., Poulton A.L., Symons A.M. (1988) *Pineal and photoperiodicity: Practical aspects.* [W] *Trends in chronobiology.* W. Th. J. M. Hekkens, G. A. Kerkhof, W. J. Rietveld (red.), Pergamon Press, Oxford, N. Z., 137-148.
2. Aschoff J. (1981) *Circadian system propetrties.* [W] *Environmental physiology,* F. Obal, G. Benedek (red.), Pergamon Press Akadémiai Kiadó, Budapest, 1-17.
3. Cornélissen G., Scarpelli P. T., Halberg F., Halberg J., Halberg Francine, Halberg E. (1988) *Cardiovascular rhythms; Their implications and applicat'ons and medical research and practice* [W] *Trends in chronobiology,* W. Th. J. M. Hekkens, G. A. Kerkhof, W. J. Rietveld (red.) Pergamon, Press, Oxford, N. Y. 335-355.
4. Czeisler Ch. A., Kronauer R. E., Allan J. S., Duffy J. F., Jewett M. E, Brown E. N., Ronda J. M. (1988) *Bright light induced of strong (type 0)resetting of the human circadian pacemaker,* Science 244, 1328-1333.
5. Edmunds Jr. L. N., Adams K. J. (1981) *Clocked cell cycle clocks.* Science 211, 1002-1013.
6. Ehert C. ., Trucco T. (1967) *Molecular models for the circadian clock. I. The chronon concept.* J. Theoret. Biol. 15, 240-262.
7. Englund C. E., Naitoh P. (1980)*An attempeted validation study of the birthdate-based biorhytm (BBB) hypothesis.* Aviat. Space Environ. Med. 51, 583-590.

8. Halberg F., Ahlgren A. (1980)*Chronobiology — a review.* [W] *Documenta Geigy — Biological rhytms.* CIBA-Geigy Ltd., Basle, 1-3
9. Halberg F.,Cornéllisen G., Tarquini B. (1989)*Chronobiology and chronopathology 1990: state of art, parallaxes and perspectives.* Reference values and chronobiology. A session of XV World Congress of Anatomic and Clinical Pathology, 1989, M. Fanfani, B. Targuini (red.), Firenze, 5-19.
10. Halberg F., Cornéllisen G., Bakken E. (1990) *Caregiving merged with chronobiologic outcome assesment, research, and education in health maintenance organizations.* [W] *Chronobiology: Its role in clinical medicine, general biology, and agriculture.* Part B, Wiley-Liss, Inc. 1990, 491-549.
11. Hildebrand G. (1980) *Survey of current concepts relative to rhytms and shift work.* [W] *Chronobiology: Principles and applications to shifts in schedules.* L. E. Schering, F. Halberg (red.), Sijthoff and Noordhoff, The Netherlands, 261-292.
12. Hollwich F. (1979) *The influence of ocular light perception on metabolism in man and in animal,* Springer-Verlag, N. Y., Heidelberg, Berlin.
13. Konopka R. J., Benzer S. (1971) *Clock mutants of Drosophila melanogaster.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2112-2116.
14. Kwarecki K. (1982) *Mechanizmy regulacyjne metabolizmu komórki.* [W] *Cytofizjologia* K. Ostrowski, J. Kawiak (red.). PZWL, Warszawa, wyd. IV, 233-267.
15. Kwarecki K. (1988) *Gruczoły wydzielania dokrewnego.* [W] *Histologia,* K. Ostrowski (red.), PZWL, Warszawa, 378-421.
16. Kwarecki K. (1988) *Skutki fizjologiczne nagłej zmiany strefy czasu — przelotu wzdłuż-równoleżnikowego.* [W] *Wpływ zmiennych warunków chronobiologicznych i klimatycznych w Seulu na organizm zawodnika.* I. Wojcieszak (red.) Instytut Sportu, Warszawa, 61-93.
17. Moore-Ede M. C., Sulzman F. M., Fuller Ch. A. (1982) *The clocks that time us.* Harvard University Press, Cambridge.
18. Pittendrigh C. S., Daan S. (1976) *A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: Pacemaker as clock.* J. Comp. Physiol. 106, 291-331.
19. Ralph M. R., Menaker M. (1988) *A mutation of the circadian system in golden hamster.* Science 1225-1227.
20. Reiter R. J. (1988) *Comparative aspects of pineal melatonin rhythms in mammals.* ISI Atlas of Sci. Animal and Plant vol. 1, 111-116.
21. Rusak B., Robertson H. A., Wisden W., Hunt S. P. (1990) *Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus.* Science 248, 1237-1240.
22. Retveld W. J. (1988) *Ośrodkowa regulacja rytmów okołodobowych: mechanizm zegara biologicznego.* Medycyna Lotnicza 4 (101), 7-12.
23. Schweiger H. G. (1987) *Cellular and molecular aspects of circadian rhythms: a review.* [W] *Chronobiology and chronomedicine,* G. Hildebrant, R. Moog, F. Raschke (red.), Verlang Peter Lang, Frankfurt am Main, Bern,N. Y., Paris, 15-25.
24. Takahashi J. S., Murakami N., Nikaido S. S., Pratt B. L., Robertson L. M. (1989) *The avian pineal, a vertebrate model system of the circadian oscillator: Cellular regulation of circadian rhythms by light, second macromolecular synthesis.* Recent Progress in Hormone Research 279-352.
25. Wever R. A. (1979) *The circadian system of man. Results of of experiments under temporal isolation.* Springer Verlag, N. Y., Heidelberg, Berlin, 1-276.
26. Wolcott J. H., McMeekin R. P., Burgin R. E., Yanowitch R. E.(1977) *Correlation of occurrence of aircraft accidents with biorhythmic criticality and cycle phase in U.S. Air Force, U.S. Army and civil aviation pilots.* Aviat. Space Environ. Med. 48: 976-983.

KOSMOS 1991, 40 (1): 53-62

W. J. RIETVELD, J. RUIS
J. MEIJER, J. P. BUYS
Zakład Fizjologii
Uniwersytet w Lejdzie
Holandia

NERWOWA REGULACJA RYTMÓW OKOŁODOBOWYCH U KRĘGOWCÓW

Wiele procesów fizjologicznych, biochemicznych i behawioralnych wykazuje rytmikę okołodobową o znaczeniu funkcjonalnym. Eksperymenty przeprowadzone głównie na szczurach i chomikach wykazały, że jądra nadskrzyżowaniowe podwzgórza (SCN) są regulatorem rytmiki okołodobowej [16].

Punktem wyjścia do dalszych badań może być prześledzenie drogi, na której zachodzi przesuwanie fazy rytmu wywołane czynnikami zewnętrznymi, bowiem hierarchiczny, wielooscylatorowy model zegara biologicznego zakłada współdziałanie regulatora rytmiki i mechanizmu przesuwania fazy rytmu. Skoro zaś u ssaków cykl światło—ciemność jest głównym czynnikiem synchronizacji rytmów, to prawdopodobnie zewnętrzny „dawca czasu" (Zeitgeber) może wymuszać na organizmie zmiany rytmów okołodobowych za pośrednictwem siatkówki. Możliwość, że u dorosłych ssaków w procesie przesuwania fazy rytmu grają rolę pozasiatkówkowe drogi recepcji, jest — jak na razie — mało prawdopodobna.

W drugiej połowie lat 60. odkryto, że u niższych kręgowców istnieje nerwowe połączenie pomiędzy siatkówką i podwzgórzem. Stosując metody autoradiograficzne, M o r e [6] wykazał, że u szczura występuje bezpośrednie połączenie pomiędzy siatkówką a SCN. Nazwano je szlakiem siatkówkowo-podwzgórzowym (retino-hypothalamic projection — RHP).

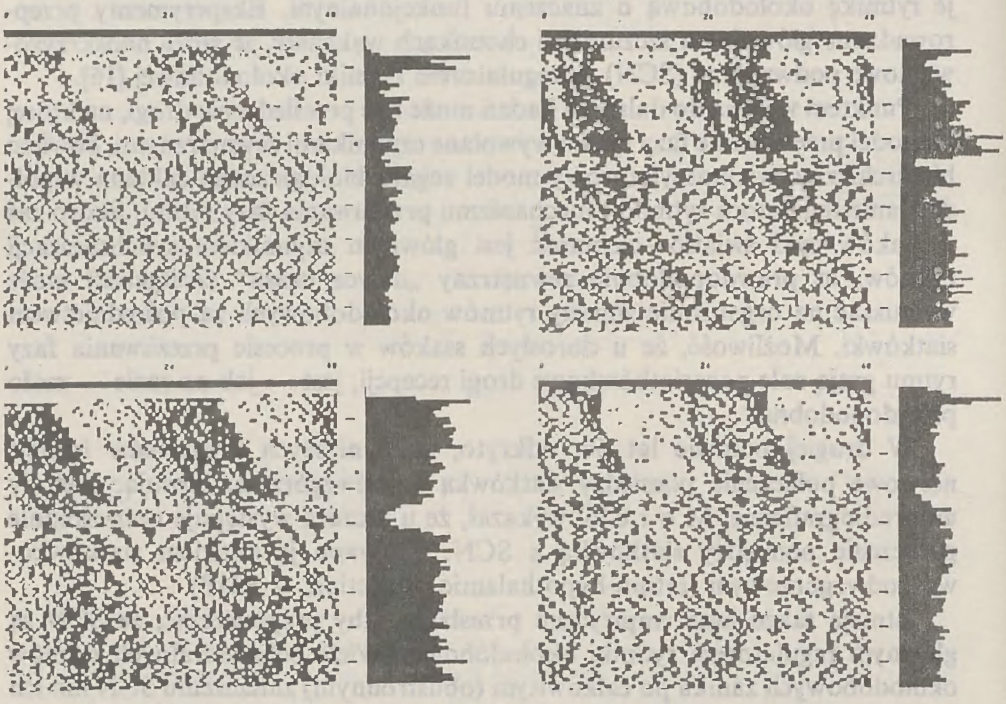
Istnieją także inne empiryczne przesłanki, aby przypuszczać, że SCN są głównym regulatorem rytmiki okołodobowej. Wiele behawioralnych rytmów okołodobowych zanika po całkowitym (obustronnym) zniszczeniu SCN lub ich chirurgicznej izolacji [16]. Stymulacja elektryczna SCN zmienia fazę rytmów okołodobowych aktywności lokomotorycznej gryzoni [15]. Stosując metodę 2-DG [17] wykazano istnienie okołodobowej rytmiki aktywności metabolicznej SCN; metabolizm glukozy był wyższy w ciągu fazy jasnej fotoperiodu. Żaden inny obszar mózgu nie wykazuje podobnej rytmiki.

W zgodzie z tymi danymi są wyniki badań elektrofizjologicznych [2], wykazujące, że zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*, wieloraka aktywność bioelektryczna w obrębie SCN jest wyższa w jasnej, a niższa w ciemnej fazie fotoperiodu.

Z anatomicznego punktu widzenia, SCN to dwa niewielkie jądra leżące bezpośrednio nad skrzyżowaniem nerwów wzrokowych. Każde jądro zawiera około dziesięciu tysięcy neuronów. Ostatnie dane wskazują, że SCN szczura zawiera co najmniej trzy regiony.

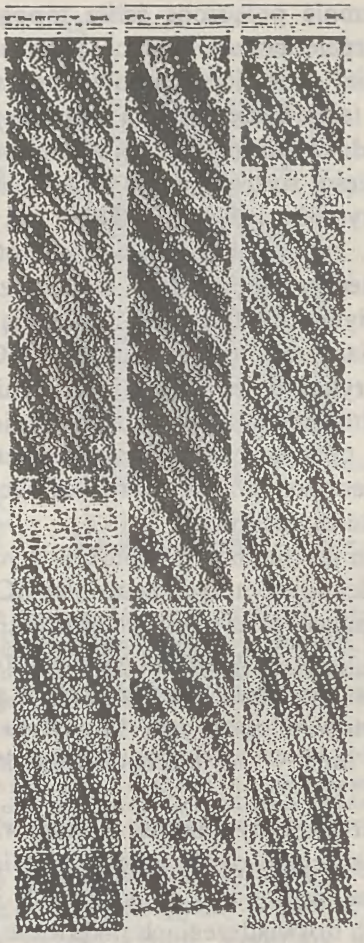
Część rostralna, około jednej czwartej całości, zawiera niewielkie neurony, z małą ilością cytoplazmy i stosunkowo nielicznymi organellami. Te nieliczne dendryty są niezbyt rozgałęzione. Partia grzbietowo-środkowa części kaudalnej nie różni się od części rostralnej. Natomiast neurony części brzuszno-tylnej są większe, bardziej rozgałęzione i z większą ilością cytoplazmy. Ten ostatni region charakteryzuje się obecnością zakończeń RHP.

W każdym z jąder SCN znajdują się trzy grupy komórek zawierających neuropeptydy. Neurony zawierające wazopresynę lokalizują się wyłącznie w części rostralnej i grzbietowo-środkowej. Wazoaktywny peptyd jelitowy jest obecny w neuronach części brzuszno-tylnej, podczas gdy komórki nerwowe



Rys. 1. Wpływ zniszczenia SCN na okołodobowy rytm pobierania pokarmu czterech różnych szczurów

Rozdzielczość aktogramu wynosi 30 minut. Zgodnie z powszechną konwencją aktogram jest powtórzony w każdej linii. Z prawej strony każdego aktogramu pokazano całkowitą aktywność zwierzęcia w ciągu doby w postaci poziomych słupków. Kreski pomiędzy aktogramem i słupkami oznaczają dekady doświadczenia. Po 30 dniach utrzymywania rytmiki spontanicznej (szczury były uprzednio oślepione) zwierzęta poddano obustronnej lezji SCN. Bezpośrednio po zabiegu zapis aktywności stał się nieregularny, wykazując niekiedy komponenty ultradialne. W dwóch przypadkach (oba dolne aktogramy) rytm powrócił po niespełna miesiącu, ale miał wtedy krótszą fazę niż przed lezją. U szczura, którego aktogram jest w lewym górnym rogu, lezji dokonano w części kaudalnej SCN, u pozostałych — w rostralnej. We wszystkich przypadkach lezja obejmowała około 60% komórek SCN



Rys. 2. Długotrwały zapis rytmu pobierania pokarmu u trzech różnych szczurów dokonany w ciągu 700 kolejnych dni. Widoczne jest skracanie się fazy rytmu, zwłaszcza u zwierząt, których aktogramy są po lewej i prawej stronie rysunku

zawierające kwas *gamma*-aminomasłowy (GABA), somatostatynę, substancję P oraz ptasi polipeptyd trzustkowy obecne są na terenie całego SNC. W zakończeniach nerwowych znaleziono także kilka innych peptydów. Serotonina i peptyd pobudzający serce mięczaków (moluscan cardioexcitatory peptide – MCP) występują w brzusznej części SCN, natomiast leu-ekefaliny i cholecystokininy znaleziono na obrzeżach SCN.

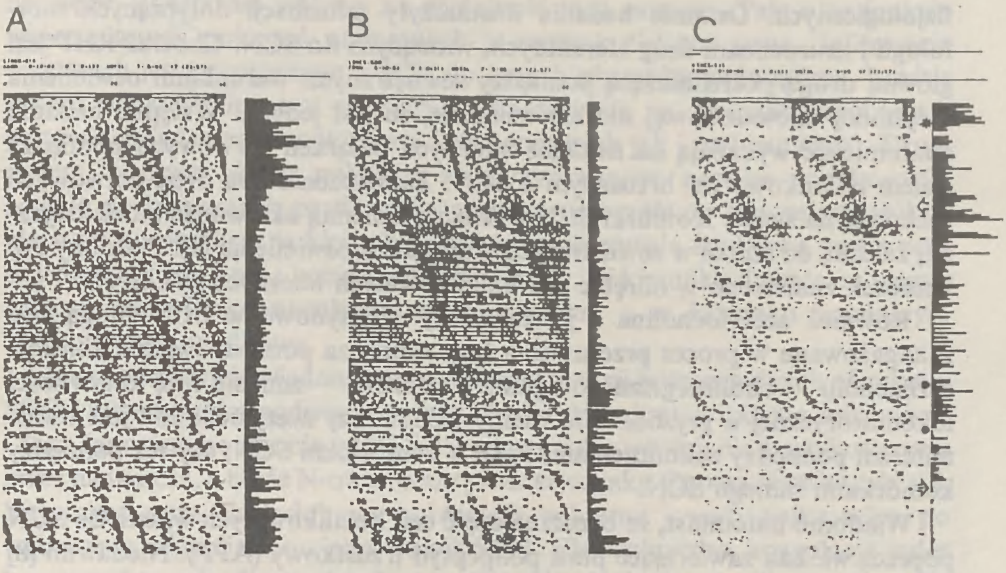
Istotnym pytaniem jest jak SCN może generować sygnał w okresie około 24 godzin. Przyjmuje się [7], że neutrony SCN tworzą początkowo zespół zdeterminowanych genetycznie niezależnych oscylatorów, zaś w trakcie rozwoju osobniczego zaczynają łączyć się i współdziałać ze sobą, tak że funkcjonowanie indywidualnych neuronów ustępuje funkcjonowaniu sieci komórek.

Oba jądra SCN są wzajemnie połączone ściśle topograficznie określonym systemem włókien. W obrębie poszczególnych jąder neurony jednocześnie różnicują się na co najmniej dwie sieci nerwowe: brzuszno-tylną i grzbietowo-środkową, zawierającą także część odcinka rostralnego.

Zgadza się to dobrze z doświadczeniami opisanymi ostatnio przez R i e t - v e l d a [12]. Usunięcie części rostralnej obu SCN u oślepionych szczurów zmienia ich spontaniczną rytmikę behawioru. Jeżeli zaś taką operację przeprowadzi się jednostronnie, rytmy aktywności lokomotorycznej, pobierania wody i pożywienia, zmian temperatury ciała, a także poziomu kortykosteronu w moczu powracają po upływie 30-40 dni, ale wykazują okres rytmu krótszy niż przed operacją. Natomiast całkowite zniszczenie SNC lub usunięcie części kaudalnej zupełnie znosi rytmikę, co sugeruje istnienie systemu o dwóch oscylatorach (rys. 1). Podobny efekt, jak drugi z wymienionych zabiegów — tj. skrócenie okresu rytmu — obserwujemy podczas starzenia się szczurów. Jak dotąd nie wiadomo czy jest to spowodowane redukcją liczby aktywnych neuronów w SCN, czy może czymś innym.

Więcej na temat samych mechanizmów komórkowych można powiedzieć po zanalizowaniu właściwości pojedynczych neuronów SCN. Za pomocą jednej ze specjalnych technik pomiaru przewodności bioelektrycznej (patch clamp measurement) wykazano [13], że w hodowanych komórkach SCN występuje aktywność kanałów, która może odgrywać dużą rolę w procesie generowania sygnału „rozrusznika" rytmów bilogicznych. Chodzi tu o kanały potasowe, zależne od wapnia oraz o inne — od biernych (non inactivating) kanałów sodowych.

Nie wiadomo, czy neuropeptydy obecne w komórkach SCN są zaangażowane w funkcjonowanie zegara okołodobowego. Nieliczne eksperymenty neuropsychofarmakologiczne wykonano na szczurach i chomikach; środki farmakologiczne były w tych doświadczeniach podawane w wodzie pitnej albo poprzez implantację specjalnych sączków (osmotic minipumps) pod skórę zwierzęcia. Substancje te aplikowano również bezpośrednio do SCN; drogą jontoforezy albo przez implatowane kaniule. Rezultaty tych doświadczeń są niekiedy sprzeczne, a ich interpretacja — niełatwa. Wydaje sią, że ani acetylocholina, ani wazopresyna nie grają żadnej roli w mechanizmie generowania rytmu. Lokalna iniekcja *alfa*-bungarotoksyny (nieodwracalnego antagonisty cholinergicznego) do SCN nie ma wpływu na rytm aktywności szyszynki. Szczury Brattieboro (które nie posiadają wazopresyny w SCN) nie wykazują zakłóceń rytmiki okołodobowej, a iniekcja wazopresyny do szczurzego SCN nie zmienia okresu rytmów spontanicznych. Serotonina (5-HT) w SCN lokalizuje się w zakończeniach nerwów, których perikaria znajdują się w śródmózgowych jądrach szwu. 5-HT może działać jako transmiter pomiędzy tymi jądrami a SCN. Badania elektrofizjologiczne wykazują, że neurony SCN odpowiadają na jontoforetyczną aplikację serotoniny i clorgyliny (inhibitora MAD). Pomimo to, nie obserwuje się, aby lokalna aplikacja 5-HT do SCN



Rys. 3. Rytmy pobierania pokarmu (A), wody pitnej (B) i aktywności lokomotorycznej (C) szczura oślepionego w celu wywołania rytmiki spontanicznej. Gwiazdka wskazuje moment oślepienia, strzałka skierowana w lewo — początek podawania metamfetaminy, strzałka w prawo — zaprzestanie jej podawania. Dwie czarne kropki oznaczają aplikację dekanianu haldolowego (haldol decanoate — 4 (4-para-chlorfenylo)-4-hydroksypiperydyno)-4-fluorobutyrofenon — produkowany przez firmę Janssen pod nazwą haloperidol)

Można zauważyć przesunięcie fazy rytmu w środkowej części periodogramu. Występuje ono we wszystkich trzech przypadkach i ma podobny charakter. Podanie dekanianu haldolowego natychmiast znosi ten efekt wskazując, że zaangażowana jest tu dopamina

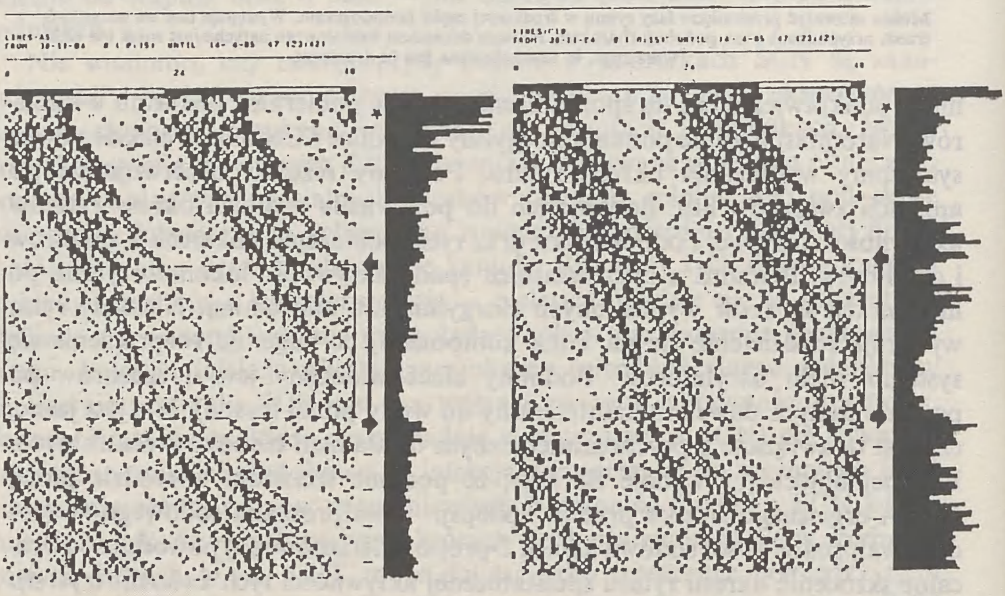
miała jakikolwiek efekt na spontaniczną rytmikę pobierania pokarmu u szczurów. Natomiast lokalne podanie clorgyliny w okolice SCN daje w efekcie pewne symptomy wydłużania okresu rytmu. Podobny rezultat obserwuje się po aplikacji związków litu: dodanie ich do pożywienia wydłuża okresy rytmów aktywności ruchowej i odpoczynku oraz rytm pobierania pokarmu u szczurów i chomików. Ponadto u tych ostatnich spada aktywność lokomotoryczna po implantacji sączków wypełnionych clorgyliną lub impraminą. Niekiedy rytm wykazuje rozdzielenie się na kilka komponent, co sugeruje rozprzężenie się systemu wielu oscylatorów. Podobny efekt widoczny jest u szczurów po podaniu dużych dawek metamfetaminy do wody pitnej (rys. 3). Nie jest jasne, czy jest to związane z psychomimetycznym działaniem ośrodków centralnych. Bardziej obiecujący wydaje się fakt, że podanie szczurom w wodzie pitnej GABA-ergicznego środka przeciw epilepsji — walpronianu sodowego — (sodium valproate — sól sodowa kwasu 2-propowalerianowego) powoduje odwracalne skrócenie okresu rytmu spontanicznej aktywności tych zwierząt (rys. 4).

Mało jest wiadomo na temat mechanizmów, które pośredniczą w przesuwaniu fazy rytmów nauronów SCN zgodnie z warunkami światło—ciemność, czy też przekazują informację o rytmach okołodobowych do innych układów

fizjologicznych. Ostatnie badania dostarczyły informacji dotyczących morfologii i neurochemii dróg aferentnych, wiodących do SCN. Chociaż RHP jest główną drogą pośredniczącą pomiędzy zewnętrznymi warunkami oświetlenia a rytmiką okołodobową, nic nie wskazuje, że jest jedyną. Wstępne badania anatomiczne wykazują na istnienie wtórnych połączeń nerwowych pomiędzy ciałem kolankowatym brzusznym a SCN. Zakończenia obu dróg nerwowych zachodzą na siebie. Komórki SCN wykazują zmienną aktywność bioelektryczną, zależną od zmian w zewnętrznych warunkach oświetlenia [1]. Podobny typ komórek znaleziono w obrębie ciał kolankowatych bocznych (VLGN).

Również acetylocholina i jej receptory nikotynowe w SCN mogą być zaangażowane w proces przesuwania fazy rytmu za pomocą światła. Iniekcja carbacholu — cholinergicznego agonisty do SCN — zmienia fazę aktywności lokomotorycznej u gryzoni. Nie wiemy jednak, czy acetylocholina jest transmiterem pomiędzy zakończeniami RHP a komórkami SCN, czy też pomiędzy komórkami samego SCN.

Wiadomo natomiast, że brzuszna część ciał kolankowatych wrasta do SCN poprzez włókna zawierające ptasi polipeptyd trzustkowy (APP). Niedawno [8] stwierdzono, że jest to liczący 36 aminokwasów peptyd, zawierający 20 aminokwasów homologicznych z APP i nazwano go neuropeptydem Y. Mikroiniekcje APP do SCN przesuwają fazę rytmu okołodobowego aktywności chomików podobnie jak pulsy ciemności podczas hodowli w ciągłym świetle. Przesuniętą fazę rytmu można przywrócić (reentrainment). Jednak wcześniejsze



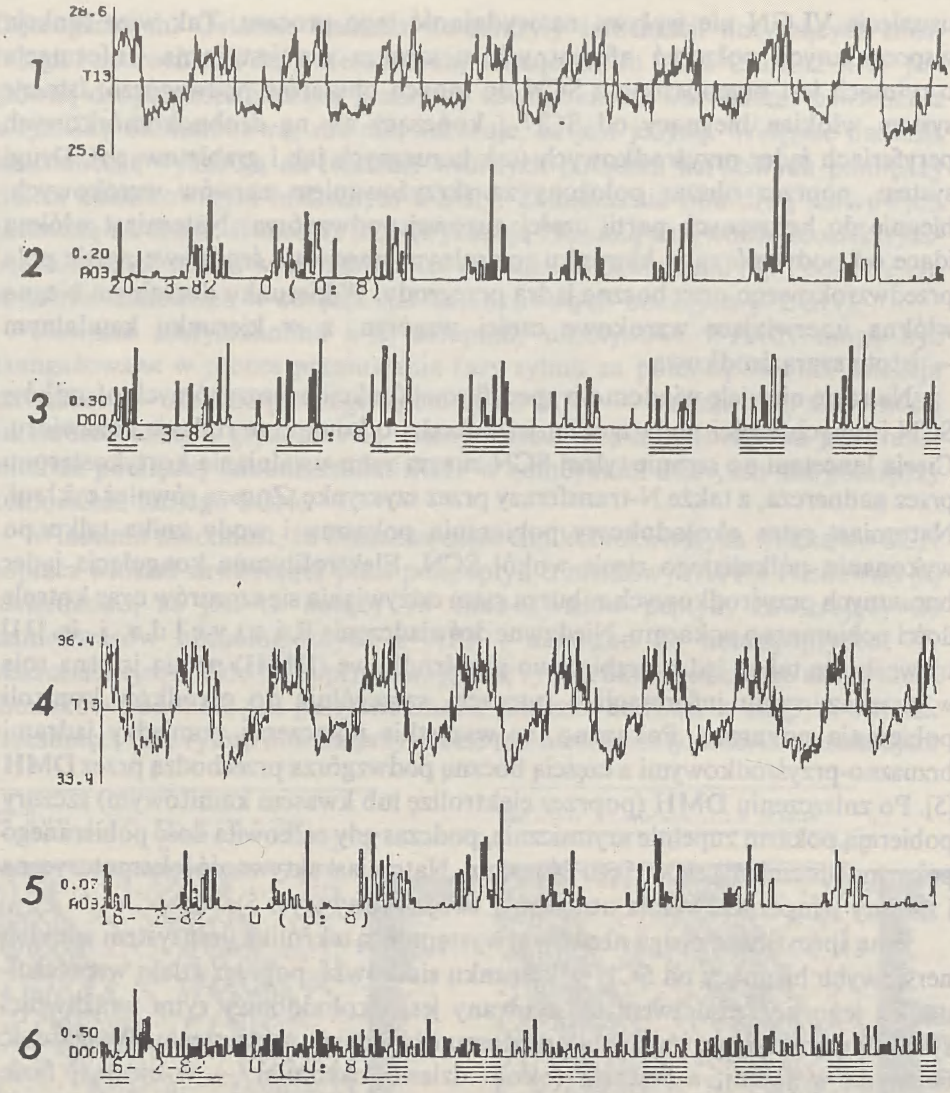
Rys. 4. Efekt podania walpronianu sodu w wodzie pitnej. Początkowo podawano 50 mg na kg na dzień, zwiększając dawkę do 1000 mg na kg na dzień. Dni podawania oznaczane są strzałkami i pionowa kreską. Nastąpiło skrócenie okresu rytmu. Oznaczenia jak w rys. 1.

usunięcie VLGN nie wpływa na wydajność tego procesu. Tak więc funkcja wspomnianych połączeń aferentnych u szczura nie jest jasna. Informacja o rytmach jest przenoszona z SCN do innych obszarów podwzgórza. Istnieje system włókien biegnący od SCN i kończący się na drobnokomórkowych peryferiach jąder przyśrodkowych (tak brzusznych jak i grzbietowych). Drugi system, poprzez obszar położony za skrzyżowaniem nerwów wzrokowych, biegnie do brzusznych partii części guzowej podwzgórza. Natomiast włókna idące od podwzgórza w kierunku rostralnym unerwiają środkowe partie pola przedwzrokowego oraz boczne jądra przegrody. W kierunku dorsalnym biegną włókna unerwiające wzrokowe części wzgórza, a w kierunku kaudalnym — istotę szarą środkową.

Na razie niewiele wiadomo o specyficznej funkcji poszczególnych ośrodków SCN i innych części podwzgórza, jeśli chodzi o konkretne rodzaje behawioru. Cięcia lancetem po stronie tylnej SCN znaszą rytm uwalniania kortykosteronu przez nadnercza, a także N-transferazy przez szyszynkę. Znoszą również cykl rui. Natomiast rytm okołodobowy pobierania pokarmu i wody znika tylko po wykonaniu półkolistego cięcia wokół SCN. Elektrolityczna koagulacja jąder brzusznych przyśrodkowych zaburza rytm odżywiania się szczurów oraz kotrolę ilości pobieranego pokarmu. Niedawne doświadczenia R i e t v e l d a i in. [11] ujawniły, że także jądra grzbietowo-przyśrodkowe (DMH) pełnią istotną rolę w przekazywaniu informacji o rytmach, szczególnie do ośrodków kontroli pobierania pokarmu. Pokazano, że wszystkie połączenia pomiędzy jądrami brzuszno-przyśrodkowymi a częścią boczną podwzgórza przechodzą przez DMH [5]. Po zniszczeniu DMH (poprzez elektrolizę lub kwasem kainitowym) szczury pobierają pokarm zupełnie arytmicznie, podczas gdy całkowita ilość pobieranego pokarmu nie zmienia się w ciągu 24 godzin. Natomiast aktywność lokomotoryczna i zmiany temperatury ciała utrzymują swoje rytmy (rys. 5).

Inną specyficzną drogą nerwową, występującą u królika, jest system włokien nerwowych biegnący od SCN w kierunku siatkówki, poprzez szlaki współczulne. Za jego pośrednictwem indukowany jest okołodobowy rytm wrażliwości systemu wzrokowego na zmiany poziomu oświetlenia w otoczeniu. Wrażliwość ta spada w jasnej, a wzrasta (około dziesięciokrotnie) — w ciemnej fazie fotoperiodu. Wspomniany rytm (mierzony jako elektroretinogram) utrzymuje się po przecięciu nerwów wzrokowych i staje się typowym rytmem spontanicznym. To sprzężenie siatkówka — podwzgórze — siatkówka prawdopodobnie gra dużą rolę w stabilizowaniu sygnału powodującego przesunięcie fazy rytmu, przy zmianie warunków światło — ciemność [10].

Co wiemy o strukturach zegara biologicznego, w obecności zegarów podrzędnych? Jeżeli bodźce uważane za drugorzędne (inne niż zmiana światło — ciemność) są zdolne indukować rytmy, które nie są znoszone zniszczeniem SCN i jeżeli te bodźce przesuwaja fazę rytmu, to może to świadczyć o tym, że są endogenne oscylatory drugiego rzędu leżące w innych partiach mózgu. Nieliczne dane na ten temat były opublikowane przez P o w e l l a i in. [9]



Rys. 5. Aktogramy temperatury ciała (wykres pierwszy i czwarty od góry), aktywności lokomotorycznej (drugi i piąty) oraz pobierania pożywienia (trzeci i szósty). Wykresy 1, 2, 3 dotyczą szczura przed lezją DMH, 4, 5, 6 — po dokonanej lezji. Widać zachowaną rytmikę zmian temperatury ciała oraz aktywności lokomotorycznej przy zaburzeniu rytmu pobierania pokarmu

i dotyczyły szczurów z usuniętym SCN. Utrzymywały one rytm okołodobowy zmian temperatury ciała, choć faza rytmu była zmieniona. Niefortunnie eksperyment ten był przeprowadzony w warunkach LD (światło—ciemność),

a nie na przykład w stałej ciemności. U szczurów oślepionych, z nie naruszonymi SCN, można uzyskać synchronizację spontanicznych rytmów (takich jak: wydzielanie kortykosteronu przez nadnercza, monoamin mózgowych, czy rytmu zmian temperatury ciała) poprzez regularne podawanie pokarmu w odpowiednich porach doby. We wszystkich tych eksperymentach bardziej prawdopodobne jest jednak występowanie efektu maskowania niż rzeczywiste przesuwanie fazy rytmu, zwłaszcza że po zaprzestaniu regularnego karmienia zwierzęta wykazują rytmikę spontaniczną wyżej wymienionych procesów, a przywrócony rytm jest kontynuacją rytmu obserwowanego przed rozpoczęciem regularnego podawania pokarmu.

Z drugiej strony z doświadczeń wynika, że u szczurów z obustronnie usuniętymi SCN regularne karmienie powoduje rytmiczne zmiany aktywności związane z „przewidywaniem" czasu podawania pokarmu, bowiem gdy po pewnym czasie powróci się do karmienia ich *ad libitum*, to mimo to przez pewnien czas utrzymują one rytm aktywności charakterystyczny dla początkowego okresu eksperymentu. Resekcja jąder brzuszno-przyśrodkowych podwzgórza znosi ten rytm, co wskazuje na to, że mogą one pełnić rolę jakiegoś słabego oscylatora [3, 4]. Niedawne doświadczenia Ruisa [14] sugerują ważną rolę DMH w powstawaniu zjawiska „przewidywania".

Reasumując można powiedzieć, że jądra nadskrzyżowaniowe podwzgórza są głównym oscylatorem dla wielu rytmów okołodobowych. Pozostało jeszcze wiele kwestii czekających na wyjaśnienie: jakie są mechanizmy generowania rytmów endogennych, jak osiągane jest przesunięcie fazy rytmu, czy na pewno istnieją i gdzie są zlokalizowane oscylatory podrzędne.

Trzeba więcej badań, nie tylko na poziomie komórki czy też dotyczących nielicznych gatunków, szczura albo chomika, ale także porównujących właściwości rytmiki okołodobowej u różnych gatunków [18, 19].

LITERATURA

1. Cross C., Hendriks J. (1989) *Regularly firing neurones in the rat suprachiasmatic nucleus*. Experientia 35: 1597-1598.
2. Inouye S. I., Kawamura H. (1979) *Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5962-5966.
3. Inouye S. I. (1982) *Ventromedial hypothalamic lesions eliminate anticipatory activities of restriced feeding schedules in the rat*. Brain Res. 250: 183-187.
4. Krieger D. T. (1980) *Ventromedial hypothalamic nucleus fusions abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity*. Endocrinology 106: 649-654.
5. Luiten P. C., Room P. (1980) *Interrelations between lateral, dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei*. Brain Res. 190: 3210332.
6. Moore R. Y. *Retino-hypothalamic projection in mammals. A comparative study*. Brain Res. 49: 403-409.

7. M o o r e R. Y. (1982) *The suprachiasmatic nucleus and teh organization of a circadian system.* Trends in Neurosciences 5: 404-407.
8. M o o r e R. Y., G u s t a f s o n E. L., C a r d J. P. (1984) *Identical immunoreactivity of afferents to the rat suprachiasmatic nucleus with antisera against avian polypetide, moluscan cardioexcitatory peptide and neuropeptide Y.* Cell Tissue Res. 236: 41-46.
9. P o w e l l E. W., P a s l e y J. N., B r o c k w a y B., S c h e v i n g L., L u b a n o - v i c W., H a l b e r g F. (1977) *Suprachiasmatic dinuclear lesions alter temperature rhythm's amplitude and timing in light dark synchornized rats.* Chronobiologia 4 (suppl. 1): 146-147.
10. R i e t v e l d W. J. (1981) *The functional significance of a retino-hypothalamo-retinal loop.* Behavioural Brain Research 2: 274-275.
11. R i e t v e l d W. J., K o o i j M., A a r d o o m O. R., B o o n M. E. (1983) *The role of the dorsomedial hypothalamic nucleus in circadian control of food intake in rats.* Neuroscience Lett. suppl. 14: 310-311.
12. R i e t v e l d W. J. (1984) *The effect of partial lesions of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus on the circadian control of behaviour.* In Annual review of chronopharmacology. (red. A. R e i n b e r g, M. S m o l e n s k y, G. L a b r e q u e). Pergamon Press, Oxford.
13. R i e t v e l d W. J., C o r i n o M., v.d. B e r g R. J., M a r a n i E. (1985) *Ionic conductances in cultured suprachiasmatic neurones.* J. Interdiscipl. Cycle Res. 16: 312-313.
14. R u i s J. (1985) *Feeding schedules and effects on body temperature and other physiological parameters in intact and SCN-lesioned rats.* J. Interdiscipl. Cycle Res. 16: 321-322.
15. R u s a k B., G r o o s G. A. (1982) *Suprachiasmatic stimulation phase shifts rodent circadian rhythms.* Science 215: 1407-1409.
16. R u s a k B., Z u c k e r I. (1979) *Neural regulation of circadian rhythms.* Physiol. Rev. 59: 449-526.
17. S c h w a r t z W. J., D a v i d s e n L. C., S m i t h C. B. (1980) *In vivo metabolic activity of a putative circadian oscillator, the rat suprachiasmatic nucleus.* J. Comp. Neurol. 189: 157-167.
18. S i e g m u n d R., S i g m u n d L. (1983) *Circadian oscillations of locomotor activity in Crocidura suaveolens.* Z. f. Säugetierkunde 48: 185-187.
19. S i e g m u n d R., K a p i s c h e H. -J. (1983) *Investigations of the motor and locomotor activity of the common screw (Sorex araneus L.) by different recording procedures.* Zool. Anz. Jena 210: 282-288.

Tłum. Maciej A. Pszczółkowski

KOSMOS 1991, 40 (1): 63-72

GRAŻYNA BARBACKA-SUROWIAK
JÓZEF SUROWIAK
Zakład Fizjologii Zwierząt
Uniwersytet Jagielloński
Kraków

MOŻLIWOŚCI ODDZIAŁYWANIA NA RYTMY BIOLOGICZNE

Chronobiologia jest nauką stosunkowo młodą, ale pierwsze obserwacje obecności rytmów biologicznych pochodzą już z czwartego wieku przed Chrystusem. Androstenes, prawdopodobnie lekarz towarzyszący w wyprawach Aleksandrowi Wielkiemu, opisał ruchy płatków kwiatowych tamaryszka (*Tamarindus indicus*) w zależności od pory doby. Roślina ta zwijała swoje płatki w porze nocnej, a rozwijała w dzień [18]. Wiele lat upłynęło do prawdziwego rozwoju tej nauki, ale na przestrzeni wieków sporadycznie pojawiały się nowe doniesienia o rytmicznych ruchach liści i łodyg u roślin oraz o rytmicznym zachowaniu się zwierząt. W roku 1751 Linneusz wykonał zegar kwiatowy, z którego mógł dokładnie odczytać czas między godziną 6.00 a 18.00. Dobrał on tak rośliny, że od godziny 6.00 do 12,00 co godzinę inne otwierały swoje kwiaty, a od 12.00 do 18.00 kolejno zamykały.

W końcu XIX wieku i na początkach XX toczyła się naukowa dyskusja, czy organizmy roślinne i zwierzęce mają zdolność **zapamiętywania** czasu, czy zdolność **mierzenia** czasu i czy jest ona natury egzogennej czy endogennej. Ten pierwszy pogląd wyraził w roku 1910 F o r e l na podstawie obserwacji pszczół, które codziennie przylatywały do marmolady spożywanej przez niego i jego rodzinę na śniadanie, na tarasie ich domu w Szwajcarii. Pszczoły te przylatywały jeszcze przez wiele dni na to samo miejsce, gdzie stał stół śniadaniowy, mimo że ze względu na ich dokuczliwość, śniadania przeniesiono do jadalni [18].

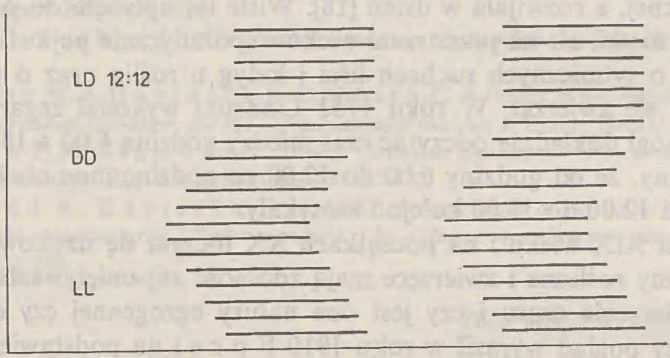
Pogląd, że zwierzęta mają zdolność zapamiętywania czasu (Zeitgedächtnis) przewijał się we wnioskach badaczy praktycznie do roku 1955. W tym roku Renner wykonał doświadczenie, które niezbicie udowodniło, że organizmy zwierzęce posiadają endogenny mechanizm mierzący czas. W swoim laboratorium we Francji wyuczył on pszczoły przylatywać do wody z cukrem między godziną 20.15 a 22.15. Następnie w ciągu jednej nocy przetransportował je do Nowego Jorku i umieścił w identycznie urządzonym laboratorium. Pszczoły przyleciały do pokarmu w tymże laboratorium, dokładnie między godziną 20.15 a 22.15 czasu francuskiego. Doświadczenie to niewątpliwie wykazało, że na zachowanie się tych pszczół nie wpłynęły żadne nie kontrolowane czynniki

zewnętrzne o znaczeniu wskaźnika czasu, ale że te zwierzęta mają zdolność mierzenia czasu za pośrednictwem ich własnego endogennego mechanizmu.

Co zdecydowało, że w ostatnich dziesiątkach lat chronobiologia stała się nauką interdyscyplinarną i zainteresowała badaczy z bardzo różnych dyscyplin naukowych: biologów, lekarzy, rolników, farmakologów? By wytłumaczyć ten fakt, należy przypomnieć kilka fundamentalnych odkryć w ostatnich 30 latach.

Ustalono, że organizmy roślinne i zwierzęce, w tym i człowiek, żyjące w normalnych warunkach środowiska, swój endogenny „zegar biologiczny" synchronizują ze środowiskowym „dawcą czasu" (Zeitgeber, [1, 2], którym jest na przykład kolejna zmiana dnia i nocy w okresie 24 godzin (LD).

Wykazano również, że jeżeli organizm znajdzie się w stałych warunkach środowiska – w stałym świetle lub w stałej ciemności – wykazuje wówczas tzw. rytm swobodnie biegnący (free-running rhythm) swojego behawioru, sterowany przez jego własny, endogenny układ mierzący czas. Okres tego rytmu będzie jednak zawsze albo dłuższy, lub krótszy od 24 godzin. Taki rytm nazwał H a l b e r g w roku 1959 [12] rytmem okołodobowym (Circadian rhythm) (rys. 1).



Rys. 1. Trzy typy rytmu: rytm synchronizowany przez dawcę czasu LD 12:12 i dwa swobodnie biegnące okołodobowe rytmy w stałej ciemności DD i w stałym świetle LL. Te dwa rytmy wykazują tzw. dryf w prawo lub w lewo, ponieważ ich okres jest albo dłuższy od 24 godzin (w LL), lub krótszy (w DD)

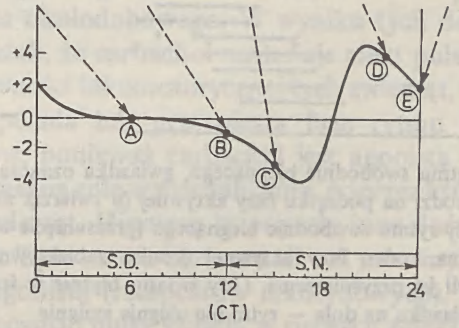
W roku 1960 A s c h o f f zaproponował trzy reguły dotyczące wpływu intensywnego światła na rytmy swobodnie biegnące u zwierząt, zwane następnie regułami Aschoffa.

Pierwsza reguła stwierdza, że intensywne światło skraca okres rytmu swobodnie biegnącego u organizmów aktywnych w dzień, ale wydłuża ten okres u organizmów nocnych.

Według drugiej reguły A s c h o f f a, intensywne światło wydłuża czas aktywności zwierząt w stosunku do ich nieaktywnego czasu u zwierząt dziennych, ale skraca ten czas aktywności u zwierząt nocnych.

Trzecia reguła A s c h o f f a, od początku bardzo kontrowersyjna, do

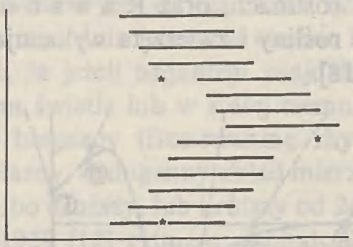
której i sam autor miał pewne wątpliwości, stwiedza, że okres rytmu swobodnie biegnącego w warunkach stałej ciemności jest dłuższy od 24 godzin u gatunków aktywnych w dzień, a krótszy od 24 godzin u gatunków nocnych. W 20 lat później A s c h o f f zrewidował swoje reguły na podstawie bardzo licznego gatunkowo materiału zwierzęcego. Doszedł do wniosku, że większość ssaków aktywnych nocą podlega jego regułom. Następnym ważnym wydarzeniem w chronobiologii było poznanie mechanizmu synchronizacji (entrainment) rytmów okołodobowych. Wyjściem do tego były obserwacje K l e i n h o - o n t e, przeprowadzone na roślinach, oraz R a w s o n a — na zwierzętach. Obaj badacze stwierdzili, że rośliny i zwierzęta wykazują zmienną wrażliwość na światło w okresie doby [18].



Rys. 2. Krzywa odpowiedzi fazowej (PRC). A, B, C, D i E — punkty czasu okołodobowego, w którym nastąpiły pulsy światła. Na osi *Y* cyfry dodatnie oznaczają przyśpieszenie fazy rytmu swobodnie biegnącego, a cyfry ujemne jej opóźnienie. S.D. — subiektywny dzień, S.N. — subiektywna noc. Liczby od 0 do 24 na osi *X* oznaczają godziny circadialnego czasu (CT)

Zagadnienie to dokładnie opracowali i zilustrowali graficznie w postaci tzw. krzywej odpowiedzi fazowej (phase-response curve — PRC) D e C u o u r - s e y [7] i P i t t e n d r i g h [22]. Ustalono, że krzywa odpowiedzi fazowej na błyski światła (light pulses) rytmu swobodnie biegnącego w stałej ciemności jest wynikiem okołodobowej zmiany wrażliwości organizmów roślinnych i zwierzęcych, zarówno aktywnych nocą, jak i dniem (rys. 2). Zjawisko to polega na tym, że w rytmie swobodnie biegnącym w warunkach DD błyski światła (nawet 10-minutowe i krótsze) powodują największe opóźnienie fazy rytmu w okresie początkowym subiektywnej nocy, gdy zwierzęta dzienne właśnie poszły spać, a nocne — właśnie zaczęły czuwać, największe zaś przyspieszenie fazy tego rytmu pod wpływem pulsu światła występuje w późnym okresie subiektywnej nocy. Natomiast w okresie subiektywnego dnia układ okołodobowy jest względnie nieaktywny na błyski światła [18] (rys. 3). To odkrycie dało możliwości zrozumienia synchornizującej roli dawcy czasu, jakim jest światło i inne czynniki cyklicznie powtarzające się. M o o r e - E d e i wsp. [18] tłumaczą to w następujący sposób: jeżeli na początku subiektywnej nocy światło powoduje opóźnienie fazy rytmu np. o 1 godzinę, a w końcu subiektywnej nocy powoduje

ono przyspieszenie fazy rytmu np. o 2 godziny, to różnica wynosi 1 godzinę. Czyli, jeżeli okres rytmu swobodnie biegnącego wynosi 25 godzin, a okres dawcy czasu 24 godziny, to przy synchronizacji tego rytmu do rytmu dawcy czasu, endogenny okołodobowy zegar organizmu zostanie skorygowany do 24 godzin. Dawca czasu bez przerwy koryguje wewnętrzny zegar biologiczny organizmu właśnie w ten sposób. Z tego wynika, że w warunkach LD najważniejsze są momenty przejścia fazy jasnej w ciemną i ciemnej w jasną, bo wtedy jest korygowany zegar biologiczny.



Rys. 3. Odpowiedź fazowa rytmu swobodnie biegnącego, gwiazdka oznacza puls światła (10-20 min.). Gdy błysk światła zachodzi na początku fazy aktywnej (u zwierząt nocnych subiektywna noc), następuje opóźnienie fazy rytmu swobodnie biegnącego (przesunięcie w prawo). Natomiast gdy puls światła występuje na końcu fazy aktywnej (koniec subiektywnej nocy), następuje przesunięcie fazy w lewo, czyli jej przyśpieszenie. Gdy światło błyśnie w środku fazy aktywnej — gwiazdka na dole — rytm nie ulegnie zmianie

Te ważne odkrycia pozwoliły na dokładne określenie mechanizmów regulujących rytmy biologiczne, na poznanie reguł tych rytmów, ale brakowało dalej najważniejszego ogniwa. Brakowało znajomości lokalizacji samego „zegara biologicznego" (master clock, pacemaker).

Wreszcie dwie niezależnie pracujące grupy badaczy: Moore i Eichler oraz Stephan i Zucker zlokalizowały u szczura w przedniej części podwzgórza, nad skrzyżowaniem wzrokowym, jądra tzw. nadskrzyżowaniowe — *nuclei suprachiasmatici*, po których zniszczeniu zanikał rytm kortykosteronu [17] oraz rytm behawioru picia i aktywności lokomotorycznej u tych zwierząt [27].

Wiele następnych badań wykazało, że uszkodzenie lub usunięcie tych jąder znosi lub zaburza liczne rytmy u zwierząt (ale nie wszystkie). W roku 1980 Lydic i wsp. opisali podobne struktury w podwzgórzu człowieka, jako homologiczne struktury do jąder nadskrzyżowaniowych u naczelnych. Jądra te uznano powszechnie za „master clock" lub „circadian pacemaker" czyli „zegar biologiczny" ssaków i człowieka.

Te właśnie odkrycia stały się punktem wyjściowym i zachętą do badań zwiazanych z interweniowaniem w mechanizmy sterujące rytmami biologicznymi w celach poznawczych, medycznych, farmakologicznych lub gospodarczych. Ze względu na dużą różnorodność tych badań ograniczono się do wymienienia tylko paru przykładów.

W lecznictwie stosuje się wiele leków o właściwościach neuroleptycznych, neuromimetycznych, psychotropowych itp. Leki te działają na układ nerwowy, zwłaszcza na ośrodkowy układ nerwowy. Mogą więc pośrednio lub bezpośrednio ingerować w jądra nadskrzyżowaniowe (SCN). Jeżeli tak, to mogą one zmieniać przebieg niektórych rytmów biologicznych (ich fazę, okres, amplitudę), a zwłaszcza rytmu snu i czuwania oraz aktywności lokomotorycznej.

W roku 1985 Earnest i Turek zainteresowali się, jaka rolę odgrywa acetylocholina (ACh) w świetlnej kontroli rytmów okołodobowych aktywności lokomotorycznej i reprodukcyjnych cykli sezonowych u chomika złocistego, *Mesocricetus auratus*. Do badań użyli carbachol, agonistę ACh. Po ustaleniu rytmu swobodnie biegnącego w warunkach DD autorzy podawali carbachol do prawej komory mózgowia w dawce 0,01 M w 2 μl, w różnych punktach czasowych rytmu okołodobowego. W wyniku tych doświadczeń Earnest i Turek wykazali, że carbachol naśladuje efekt pulsów światła na okołodobowy rytm aktywności lokomotorycznej tych zwierząt, tj. w zależności od czasu jego podanie opóźnia lub przyspiesza fazę rytmu swobodnie biegnącego. Zdaniem autorów, ponieważ carbachol jest agnoistą ACh, to acetylocholina może odgrywać ważną rolę w mechanizmie, poprzez który światło reguluje rytm okołodobowy zwierząt. Hipotezę tę poparły inne doświadczenia tego zespołu badawczego [14]. Tym razem zastosowali oni mecamylaminę, która jest cholinergicznym antagonistą (receptorów nikotynowych). Podając mecamylaminę i równocześnie stosując pulsy światła w różnych punktach czasowych swobodnie biegnącego rytmu aktywności lokomotorycznej chomików, stwierdzili zablokowanie przez mecamylaminę przesunięć fazowych tego rytmu, które powinny wystąpić pod wpływem pulsów światła. Oba te doświadczenia dobitnie wykazały pośrednictwo ACh w efektach przesunięć fazowych okołodobowego zegara ssaków, wywoływanych błyskami światła.

Inny przykład: 5 do 20% dorosłych ludzi krajów zachodnich cierpi na bezsenność lub ma kłopoty ze snem, co często wiąże się bezpośrednio z pewnymi psychicznymi zaburzeniami lub z typem aktywności zawodowej: praca wielozmianowa, szybkie przeloty z jednej do innych stref czasu (jet-lag). Benzodiazepina (Triazolam) jest lekiem stosowanym w leczeniu stanów niepokoju wywoływanych stresem, jak również stanów bezsenności. Wpływa ona poprzez wzmocnienie działania przenośnika nerwowego GABA (kwas γ-aminomasłowy), który jest niemal wszechobecny w ośrodkowym układzie nerwowym. Układ okołodobowy odgrywa kluczową rolę w regulacji rytmu snu i czuwania, a insomnia i różne depresje mogą być wynikiem zaburzenia rytmu okołodobowego snu i czuwania lub normalnego rytmu aktywności i spoczynku organizmu. Centralny rozrusznik (pacemaker) generujący rytmy okołodobowe, łącznie z rytmami snu i czuwania oraz aktywności i spoczynku, u ssaków jest zlokalizowany w jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza. Wiele natomiast ostatnich badań wykazało, że zarówno neurony, jak i aksony GABA–ergiczne, są obecne w tych jądrach. Te właśnie fakty skłoniły Turka

i Losee-Olson [29] do wniosku, że benzodiazepina podawana przy bezsenności lub zaburzeniach psychicznych może działać właśnie poprzez układ regulujący rytmikę procesów. Badania na chomikach potwierdziły to przypuszczenie. Stosowanie Triazolamu powodowało przesunięcia fazowe rytmu aktywności lokomotorycznej tych zwierząt. Dalsze badania tych autorów (1987) z zastosowaniem Triazolamu wykazały, że krótkotrwałe dawki tego leku mogą zmieniać proces synchronizacji rytmu okołodobowej aktywności zwierząt do 24-godzinnego cylku LD. Lek ten podawany w odpowiednim czasie może przyśpieszyć lub opóźnić fazę synchronizacji rytmu. Badacze ci wyrazili pogląd, że lek ten może być używany do <„manipulowania" zegarem biologicznym ssaków znajdujących się w różnych stanach eksperymentalnych>. Podsumowaniem wyników tych badań i wniosków z nich wypływających jest artykuł Turka (1988) pt. *Farmakologiczne manipulacje zegarem biologicznym ssaków: implikacje dla kontroli sezonowych cykli reprodukcyjnych.* Autor wskazuje na przydatność używania pewnych leków, jak carbachol i Trazolam, w regulacji sezonowych cylki reprodukcyjnych u zwierząt, których rozród uwarunkowany jest fotoperiodem.

Te możliwości manipulowania rozrodem wykorzystała w Polsce grupa badaczy pracujących pod kierunkiem Prof. K. Bieniarza z Katedry Ichtiologii i Rybactwa Akademii Rolniczej w Krakowie. W ramach programu resortowego Ministerstwa Edukacji Narodowej (RP.II.12) dr W. Popek prowadził przez szereg lat badania na temat roli szyszynki w rozwoju i dojrzewaniu gonad karpia, w celu jej wykorzystania do sterowania rozrodem tych ryb. Jego bardzo ładnie i nowocześnie pod względem metodycznym wykonane badania wykazały, że szyszynka u karpia stanowi aktywne ogniwo łączące środowisko z ośrodkowym układem nerwowym. Produkowana przez nią melatonina w okresie długiego dnia (roku), który zbiega się u karpia z sezonem tarłowym, stymuluje ostatni etap dojrzewania, synchronizując pełną dojrzałość oocytów z optymalną porą tarła oraz stymulując proces witellogenezy w okresie potarłowym. Metlatonina nie oddziałuje bezpośrednio na gonady, lecz na podwzgórzowy układ aminergiczny, hamując metabolizm dopaminy pełniącej rolę czynnika hamującego uwalnianie gonadotropiny (Popek, praca habilitacyjna w druku). Wniosek jest z tego prosty: znając fakt, że melatonina działa najskuteczniej w okresie długiego dnia roku i że w tym czasie stymuluje ostatni etap dojrzewania, można w odpowiedni sposób manipulować rozrodem tych ryb.

Na zakończenie warto przytoczyć jeszcze jedną z prób interwencji w mechanizm sterujący rytmami biologicznymi. O tym, że biologicznymi rytmami steruje więcej niż jeden oscylator, w literaturze naukowej jest dużo doniesień: [4, 18, 22, 23, 32]. W związku z tym zaproponowano wiele modeli tzw. sprzężonych oscylatorów regulujących rytmikę: [9, 20 i in.]. Aschoff [4] stwierdził, że jeżeli człowiek przebywa dłuższy czas w stałych warunkach oświetlenia, to rytmy swobodnie biegnące: temperatury ciała, aktywności i spoczynku, objętości moczu, zawartości w moczu potasu i wapnia po pewnym

czasie będą miały różne okresy, krótsze lub dłuższe od 24 godzin. Gdy ponownie przeniesie się człowieka do warunków LD, wszystkie rytmy synchronizują ponownie do okresu 24 godzin. Zjawisko to nazwano desynchronizacją wewnętrzną rytmów swobodnie biegnących. Potwierdziły to badania Wevera [33] wykonane również na ludziach, którzy najpierw byli synchronizowani do warunków LD w okresie 30-godzinnym, a po piętnastu dniach przeniesieni do stałych warunków DD. Desynchronizacja wewnętrzna zaczęła się już w warunkach LD i powiększała się w DD. Spostrzeżenia te były jednym z kontrargumentów na istnienie u ludzi tylko jednego, głównego oscylatora rytmów. Wysunięto postulat, że u człowieka obok głównego rozrusznika rytmów, jakimi są jądra nadskrzyżowaniowe, istnieje jeszcze inny, umiejscowiony poza nimi rozrusznik (lub rozruszniki). Fuller i wsp. wykazali, że u małpek — *Saimiri sciureus* — dwustronne lezje SCN, które spowodowały arytmiczność rytmu aktywności i spoczynku, nie eliminowały rytmu temperatury ciała. U gryzoni natomist rytm pobierania pokarmu również nie ulagał zaburzeniom po usunięciu tych jąder [6, 16, 21, 28].

Tego rodzaju doniesienia zaczęły się mnożyć. Przypuszczano, że ten drugi oscylator (rozrusznik) w normalnych warunkach środkowiska jest sprzężony z SCN i że to sprzężenie ulega rozluźnieniu w stałych warunkach oświetlenia (LL lub DD). Po usunięciu SCN ten drugi oscylator przejmuje sterowanie pewnymi rytmami. Są przypuszczenia, oparte na lezjach różnych okolic podwzgórza [25] oraz na udowodnionych lokalizacjach dróg nerwowych między SCN a podwzgórzem, że właśnie te inne oscylatory (rozruszniki) są zlokalizowane w jądrach brzuszno-przyśrodkowych podwzgórza (VMH) [18]. Poparciem tej hipotezy jest doniesienie Kriegera [15], że uszkodzenie brzuszno-przyśrodkowych jąder podwzgórza powoduje zanik rytmów okołodobowych, których nie znosi usunięcie SCN. Na ten temat dyskusja jeszcze nie jest zamknięta!

Moore-Ede i wsp. [18] zaproponowali, by rozrusznik, który steruje rytmami snu REM, głębokiej temperatury ciała, kortyzolu i wydalania potasu z moczem, określić jako rozrusznik lub oscylator X. Natomiast rozrusznik sterujący rytmami: snu wolnofalowego, temperatury skóry, hormonu wzrostu i wydalania wapnia z moczem oznaczyć jako rozrusznik Y. Oba te rozruszniki są silnie wzajemnie z sobą sprzężone i wzajemnie na siebie oddziałują w stosunku 4:1. Oznacza to, że siła sprzężenia oscylatora X z oscylatorem Y jest czterokrotnie większa od siły sprzężenia oscylatora Y z X. W normalnych warunkach środowiska (w LD) każdy układ fizjologiczny otrzymuje informacje z obu rozruszników; np. układ termoregulacji jest pod kontrolą przede wszystkim rozrusznika X, który determinuje rytm głębokiej temperatury ciała, ale dostaje on też informacje z rozrusznika Y, który zawiaduje rytmiką temperatury powierzchni ciała.

Podobnie sen i ośrodki wzbudzenia (arousal) otrzymują informacje sterujące od rozrusznika Y, który determinuje synchronizację snu wolnofalowego,

ale równocześnie sen REM jest synchronizowany przez rozrusznik X. W ten sposób sen jest zsynchronizowany z rytmem głębokiej temperatury ciała.

W okresie pierwszych tygodni rytmu swobodnie biegnącego wszystkie rytmy są jeszcze z sobą zsynchronizowane i wykazują ten sam okres. Po dłuższym upływie czasu następuje jednak wewnętrzna desynchronizacja tych dwóch grup rytmów w wyniku osłabienia wzajemnego sprzężenia między rozrusznikami X i Y [18]. Wiele danych wskazuje na to, że rozrusznik Y to jądra nadskrzyżowaniowe, gdzie natomiast znajduje się rozrusznik X — dotychczas nie wiadomo. Są jednak pewne wskazania, że rozrusznik X jest zlokalizowany w jądrach brzuszno-przyśrodkowych podwzgórza [19 i in.].

Opierając się na powyższych informacjach postanowiliśmy sprawdzić, czy rytm aktywności lokomotorycznej myszy w warunkach LD 12:12 (dwanaście godzin światła i 12 godzin ciemności) w LL i DD jest sterowany wyłącznie przez SCN. Zastosowano na razie trzy leki: L-adrenalinę, która jest sympatykomimetykiem α- i β-receptorów, Droperidol (dehydrobenzperidol) będący neuroleptykiem, blokerem α-receptorów, oraz Nivalin (galantamina), o działaniu parasympatykomimetycznym, inhibitor cholinesterazy na synapsach nerwowych, głównie nerwowo-mięśniowych. Leki te podawano co cztery godziny przez dwie lub trzy kolejne doby. Okazało się, że w warunkach LD 12:12 faza rytmu aktywności lokomotorycznej myszy nie ulegała zmianom, natomiast w warunkach stałego oświetlenia lub stałej ciemności leki te powodowały, w zależności od punktu czasowego rytmu, w którym były stosowane, opóźnienie lub przyśpieszenie fazy rytmu swobodnie biegnącego aktywności lokomotorycznej zwierząt albo faza tego rytmu nie ulegała zmianie.

Czy wobec tego leki te naśladują pulsy światła poprzez bezpośrednie oddziaływanie na neurony i synapsy cholinergiczne i adrenergiczne SCN? Groos i wsp. [11] podają, że acetylocholina jest jednym z transmiterów SCN i odgrywa doniosłą rolę w miechanizmie generacji rytmów. Potwierdziły to również badania Keefe i wsp. [14] oraz Turek [31]. Można więc przyjąć, że Nivalin, podawany podskórnie, przechodzi z krwią i przez barierę krew/mózg dociera do neuronów i aksonów SCN, wzmacniając działanie acetylocholiny. W ten sposób naśladuje pulsy światła lub ciemności w warunkach LL i DD, powodując w odpowiednim momencie przesunięcie fazy rytmu swobodnie biegnącego aktywności lokomotorycznej myszy. Natomiast, jak również donosi Groos i wsp. [11], zakończenia nerwowe z aminami katecholowymi były wykrywane tylko w neuropilu otaczającym jądra nadskrzyżowaniowe, a więc na ich granicznych obrzeżach. Wirz-Justice [34] uważa, że α- i β-aderenergiczne receptory pośredniczą w behawiorze eksploracyjnym zwierząt. Rietveld i Wirz-Justice [26], stosując methamphetaminę u szczurów ze zniszczonymi SCN, uzyskiwali efekty trwałej komponenty okołodobowego rytmu, jak u zwierząt z nie uszkodzonymi SCN, z przesunięciem aktywności w kierunku subiektywnej nocy. Także Honma i wsp. [13] podają, że szczury, które wykazywały aperiodyczność aktywności

lokomotorycznej po lezjach SCN, po podaniu methamphetaminy zaczęły wykazywać wyraźną rytmikę tej aktywności. Rytm ten był zupełnie podobny do rytmu regulowanego przez SCN. Po przerwaniu podawania tego leku, rytm zanikał. Na podstawie tych wyników autorzy wnioskują, że methamphetamina aktywuje endogenny mechanizm (oscylator) znajdujący się poza jądrami nadskrzyżowaniowymi. Uzyskane przez nich dane popierają w pełni model wieloosczylatorowy, dotyczący organizacji rytmu aktywności lokomotorycznej.

Zatem słuszny byłby nasz pogląd, że adrenalina, Droperidol, a być może i Nivalin w warunkach LL i DD, w których rytm swobodnie biegnący zwierząt i ludzi może ulec wewnętrznej desynchronizacji w wyniku osłabienia wzajemnego sprzężenia oscylatorów sterujących tym rytmem, wpływają na jakiś oscylator X, znajdujący się poza SCN, być może w ośrodkach motorycznych kory, i powodują przesunięcia fazy swobodnie biegnącego rytmu aktywności lokomotorycznej myszy. Natomiast w warunkach LD 12:12, w których naprzemienne zmiany światła i ciemności są bardzo silnym dawcą czasu, oscylatory X i Y są silnie ze sobą sprzężone i stosowane leki nie są w stanie przesunąć fazy rytmu [5]. Czy ta hipoteza jest słuszna, rozwiążą to być może elektrofizjologiczne badania *in vitro* i *in vivo* prowadzone obecnie w naszej Pracowni Chronobiologii.

LITERATURA

1. Aschoff J. (1951) *Die 24-stunden Periodik der Maus unter konstanten Umgebungsbedingungen.* Naturwissenschaften 38: 506-507.
2. Aschoff J. (1954) *Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik.* Naturwissenschaften 41: 49-56.
3. Aschoff J. (1960) *Exogenous and endogenous components in ciracadian rhythms.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25: 11-26.
4. Aschoff J. (1965) *Circadian rhythms in man.* Science 148: 1427-1432.
5. Barbacka-Surowiak G., Surowiak J. (1991) *The influence of the Galanthaminum hydrobromicum (Nivalin) on the locomotor activity circadian rhythm in mice.* [W] J. Surowiak i M. H. Lewandowski *Chronobiology and Chronomediciene.* Peter Lang, Frankfurt am Main, 51-59.
6. Boulos Z., Rosenwasser A. M., Terman M. (1980) *Feeding schedules and the circadian organization of behaviour in the rat.* Behav. Brain Res. 1: 39-65.
7. DeCoursey P. J., (1960) *Daily light sensitivity rhythm in a rodent.* Science, 131: 33-35.
8. Earnest D. J., Turek F. W. (1985) *Neurochemical basis for the photic control of cicadian rhythms and seasonal reproductive cycles: Role for acetylocholine.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4277-4281.
9. Enright J. T. (1980) *The timing of sleep and wakefulness.* Springer-Verlag, s. 253.
10. Forel A. H. (1910) *Das Sinnensleben der Insekten.* Ernst Reinhard Verl, Mûnchen.
11. Groos G., Mason R., Meijer J. (1983) *Electrical and pharmacological properties of the suprachiasmatic nuclei.* Fed. Proc. 42: 2790-2795.
12. Halberg F. (1959) *Physiologic 24-hour periodicity in human beings and mice, the lighting regimen and daily routnine.* [W] Withrow R. B.: *Photoperiodism and related phenomena in plants and animals,* Washington: American Association for the Advancement of Science 803-878.

13. Honma K-I., Honma S., Hiroshige T. (1987) *Activity rhythms in the circadian domain appear in suprachismatic nuclei lesioned rats given methamphetamine.* Physiol. Behav. 40: 767-774.
14. Keefe D. L., Earnest D. J., Nelson D., Takahashi J. S., Turek F. W. (1987) *A cholinergic antagonist, macamylamine, blocks the phase-shifting effect of light on the circadian rhythm of locomotor activity in the golden hamster.* Brain Res. 403: 308-312.
15. Krieger D. T. (1980) *Ventromedial hypothalamus lesions abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity.* Endocrinol. 106: 649-654.
16. Krieger D. T., Hauser H., Krey L. C. (1977) *Suprachiasmatic nuclear lesions do not abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity.* Science 197: 398-399.
17. Moore R. Y., Eichler V. B. (1972) *Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat.* Brain Res. 42:201-206.
18. Moore-Ede M. C., Sulzman F. M., Fuller C. A. (1982) *The clock that time* us Harward University Press.
19. Oomura Y., Ono T., Kita H., Shimizu N., Ishizuka S., Sasaki K. (1979) *Hypothalamic control of feeding behaviour: modulation by the suprachiasmatic nucleus.* [W] Suda M., Hayaishi O.,, Nagakawa H., *Biological rhythms and their central mechanism.* Elsevier, North-Holland, 295-308.
20. Pavlidis T. (1973) *Biological oscilators: their mathematical analysis.* Academic Press, New York.
21. Phillips J. L. M., Mikulka P. J. (1979) *The effect of restriced food access upon locomotor activity in rats with suprachiasmatic nucleus lesions.* Physiol. Behav. 23: 257-262.
22. Pittendrigh C. S. (1960) *Circidian rhythms and circadian organization of living systems.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25: 159-182.
23. Pittendrigh C. S. (1974) *Circadian oscillations in cells and the circadian organization of multicellular systems.* [W] Schmitt F. O., Worden F. G.: *The Neurosciences Third Study Program.* Cambridge, Mass. MIT Press, 437-458.
24. Renner M. (1955) *Ein Transozeanversuch zum Zeitsinn der Honigbiene.* Naturwissenschaften 42: 540-541.
25. Richter C. P. (1965) *Biological clocks in medicine and psychiatry.* Springfiels, Illinois: C. C. Thomas.
26. Rietveld W. J., Wirtz-Juitice A. (1987) *The effect of chronic application of methamphetamine in suprachiasmatic nucleus lesioned rats.* [W] Hildebrand G., R., F. Raschke, *Chronobiology and Chronomedicine,* Peter Lang, Frankfurt am Main. 252-256.
27. Stephan F. K., Zucker I, (1972) *Circadian rhythm in drinking behaviour and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1583-1586.
28. Stephan F. K., Swann J. M., Sisk C. L. (1979) *Anticipation of 24-hour feeding schedules in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus.* Behav. Neural Biol. 25: 346-363.
29. Turek F. W., Losee-Olson S. (1986) *A benzodiazepine used in the treatment of insomnia phase-shifts the mammalian circadian clock.* Nature 321: 167-168.
30. Turek F. W. Losee-Olson S. (1987) *Entrainment of the circadian activity rhythm to the light-dark cycle can be altered by a short-acting Benzodiazepine, Triazolam.* J. Biol. Rhythms 2: 249-260.
31. Turek F. W. (1988) *Pharmacological manipulation of the mammalian circadian clock: implications for the control of seasonal reproductive cycles.* Reprod. Nutr. Develop. 28: 499-513.
32. Wever R. A. (1975) *The circadian multi-oscillator system in man.* Int. J. Chronobiol. 3: 19-55.
33. Wever R. A. (1979) *The circadian system in man.* Results of experiments undertemporal isolation, Springer Verlag, s. 276.
34. Wirz-Justice A. (1987) *Circadian rhythm in mammalian neurotransmitter receptors.* Progr. Neurobiol. 29: 219-252.

KOSMOS 1991, 40 (1): 73-92

D. S. SAUNDERS
Wydział Zoologii
Uniwersytet w Edynburgu
Szkocja

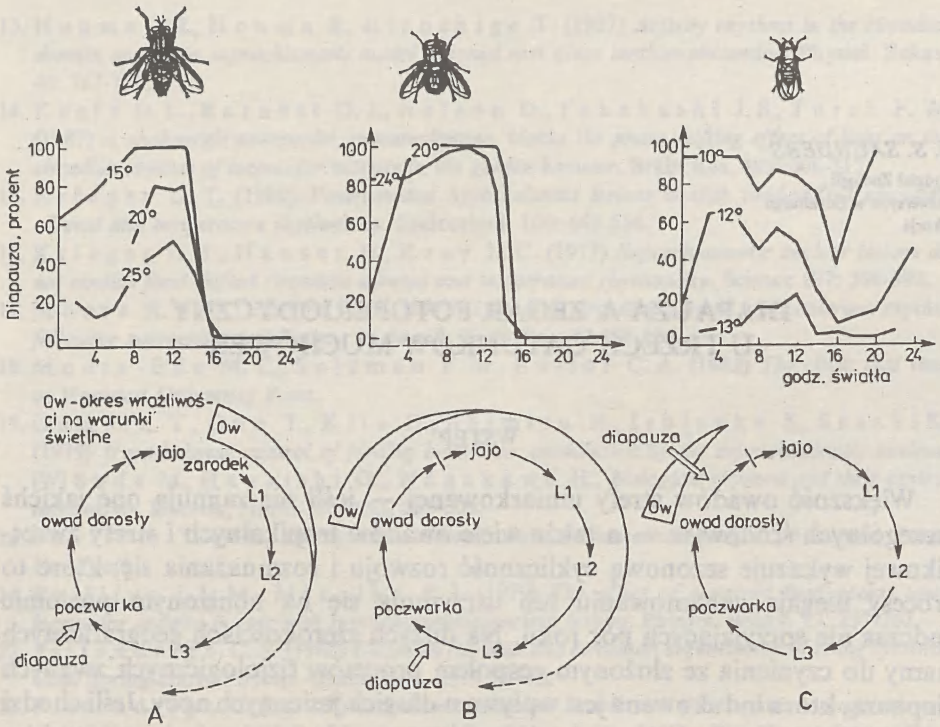
DIAPAUZA A ZEGAR FOTOPERIODYCZNY U TRZECH GATUNKÓW MUCHÓWEK

WSTĘP

Większość owadów strefy umiarkowanej — jeśli nie zajmują one jakichś szczególnych środowisk — a także wiele owadów tropikalnych i strefy zwrotnikowej wykazuje sezonową cykliczność rozwoju i rozmnażania się, które to procesy ulegają zahamowaniu lub utrzymują się na obniżonym poziomie podczas nie sprzyjających pór roku. Na dużych szerokościach geograficznych mamy do czynienia ze złożonym zespołem procesów fizjologicznych zwanych diapauzą, która indukowana jest wpływem długich jesiennych nocy. Jeśli chodzi o adaptacyjne aspekty diapauzy zimowej, to zwykle uważa się ją za zjawisko synchronizujące aktywną fazę rozwoju z najbardziej odpowiednią porą roku [28]. W kilku przypadkach stwierdzono jednak, że fotoperiod reguluje także procesy osiągania przez organizm odporności na zimno [11].

Niniejsza praca opisuje badania prowadzone w ciągu ostatnich dwudziestu lat w mojej pracowni nad fotoperiodyczną regulacją diapauzy u trzech gatunków muchówek. Owe trzy gatunki charakteryzują się interesującymi różnicami: u każdego z nich różne są stadia wrażliwe na określony fotoperiod i zapadające w diapauzę, różna jest intensywność odpowiedzi na warunki otoczenia, wreszcie różne są procesy zaangażowania w zjawisko diapauzy. Niemniej gatunki te wykazują zasadnicze podobieństwa, szczególnie jeśli chodzi o te własności swych zegarów biologicznych, które wykorzystywane bywają przy mierzeniu stopnia sezonowych zmian zachodzących pod wpływem określonego fotoperiodu.

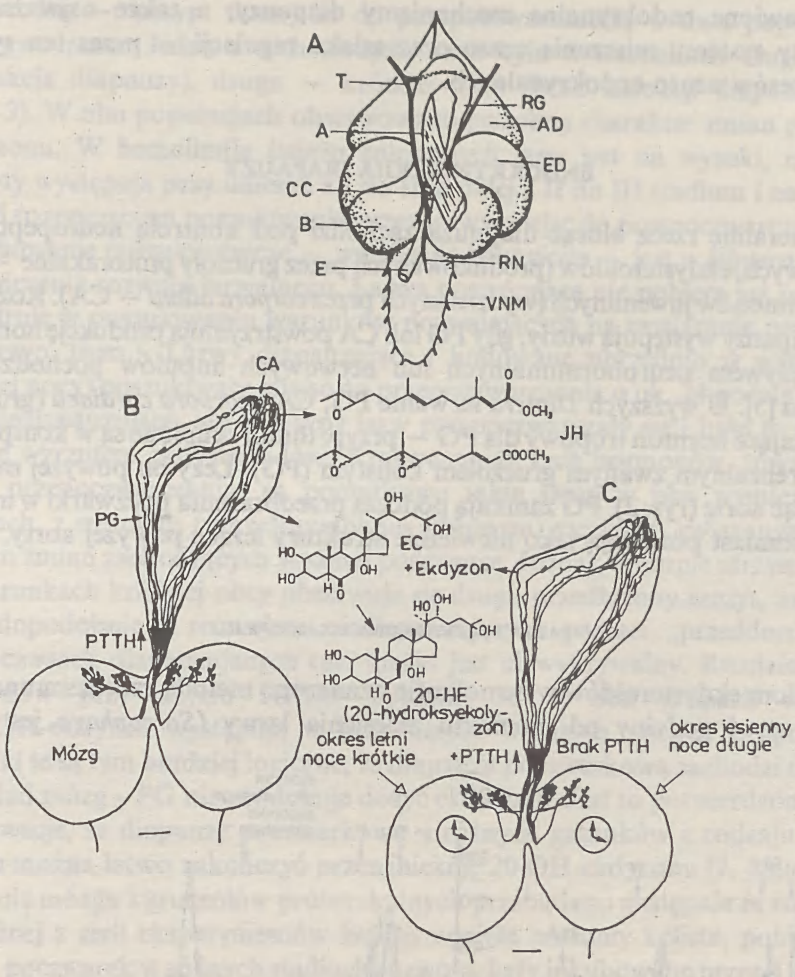
U *Sarcophaga argyrostoma* (mucha z rodziny ścierwic — przyp. tłum.) na diapauzę wywołaną długą „jesienną" nocą najbardziej podatne są wewnątrzmaciczne zarodki. Podatność ta rozciąga się na żerujące larwy, występuje także u poczwarek, krótko po wynicowaniu się głowy [4, 6, 26]. Diapauza ta występuje w temperaturze do 28°C [29]. Mucha plujka (*Caliphora vicina*) wykazuje natomiast niezbyt głęboką diapauzę u larw, które zaprzestały już żerowania (i przygotowują się do przepoczwarczenia — przyp. tłum.). Diapauza ta jest kontrolowana przez organizm matczyny [30, 41]. Dorosłe samice,



Rys. 1. Reakcje fotoperiodyczne i okresy wrażliwości u trzech gatunków muchówek: A — *Sarcophaga argyrostoma*, B — *Calliphora vicina*, C — *Drosophila melanogaster*

U *S. argyrostoma* okres fotoperiodycznej wrażliwości rozpoczyna się jeszcze w stadium zarodka w ciele samicy i ciągnie się poprzez cały rozwój larwalny, umożliwiając regulację diapauzy poczwarkalnej, występującej w dużym natężeniu. U *C. vicina* dorosłe osobniki matczyne odznaczają się maksymalną wrażliwością, choć rozciąga się ona także na jaja i larwy; u w pełni odżywionej larwy dochodzi więc do względnie płytkiej diapauzy. U *D. melanogaster* świeżo wyliniała dorosła muszka jest wrażliwa na fotoperiod i w tym samym stadium dochodzi do płytkiej diapauzy owarialnej

eksponowane na długie noce, składają jaja, z których wykluwają się larwy wykazujące później diapauzę, pod warunkiem, że podczas poszukiwania przez nie miejsc potencjalnego przepoczwarczania temperatura środowiska (tj. padliny) spadnie poniżej 15°C [39]. Jeżeli organizm matczyny wystawimy na działanie krótkich nocy, albo larwom zapewnimy rozwój w temperaturze wyższej niż 15°C, to diapauza nie zajdzie, przepoczwarczanie odbędzie się niezwłocznie i szybko rozwiną się dorosłe owady. U *C. vicina* wrażliwość fotoperiodyczna występuje także u jaj i larw, a diapauzę można łatwo zakończyć zmianami temperatury [35]. Trzeci gatunek badany w moim laboratorium to muszka owocowa, *Drosophila melanogaster*, gatunek o pochodzeniu tropikalnym, długo uważany za niediapauzujący. A jednak, ekspozycja świeżo wyklutych dorosłych owadów na „jesienne" długie noce i zastosowanie odpowiedniej temperatury (12°C) prowadzi do specyficznej odmiany diapauzy, wyrażającej się zahamowaniem pobierania przez owariole białek żółtka z hemolimfy do oocytów [32,32]. Ten rodzaj łagodnej diapauzy nie może być wywołany



Rys. 2A. Kompleks mózgu z gruczołem kolistym (ring gland) (Br-RG) larw i poczwarek wyższych muchówek. A – aorta, AD – imaginalny dysk czułkowy, B – mózg, CC – *corpus cardicaum*, E – przełyk, ED – imaginalny dysk wzrokowy, RG – gruczoł kolisty, RN – nerw powrotny, T – tchawka, VNM – brzuszne zwoje nerwowe. (Według Denlingera)

Rys. 2B, C. Synteza i uwalnianie hormonów z kompleksu Br-RG i sezonowa regulacja tych procesów. PTTH – hormon protorakotropowy, EC – ekdyzon, JH – hormon juwenilny, PG – gruczoł protorakalny, CA – *corpus allatum*

w temperaturze powyżej 14°C i łatwo go przerwać podwyższeniem temperatury lub wydłużeniem dnia. Krzywą odpowiedzi fotoperiodycznej (PRC) i stadia zapadające w diapauzie u trzech wymienionych gatunków przedstawia rys. 1.

Ujmując zjawisko diapauzy kompleksowo, należy zauważyć, że wymaga ono co najmniej czterech współdziałających ze sobą elementów: fotoreceptora, „licznika" mierzącego długość nocy, systemu zbierania i składania takiej informacji oraz odpowiednich efektorów endokrynalnych, regulujących procesy włączenia, podtrzymywania i zakończenia diapauzy. W pracy tej zostaną

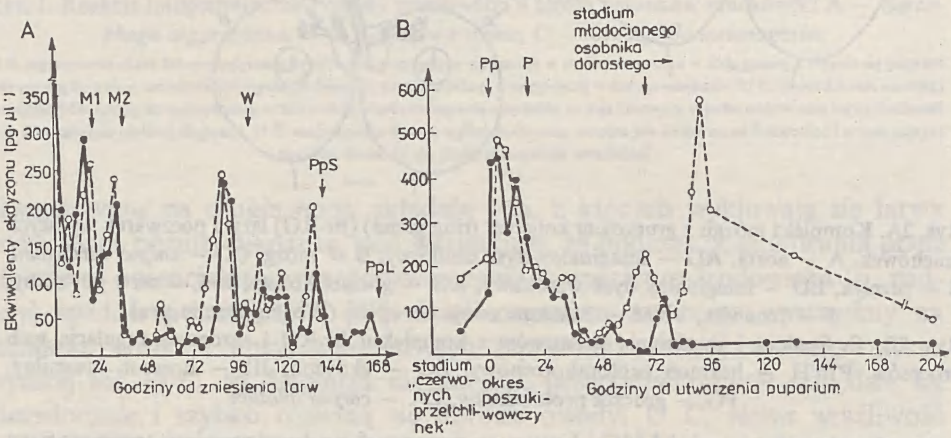
przedstawione endokrynalne mechanizmy diapauzy, a także najważniejsze elementy systemu mierzenia czasu oraz szlaku regulacji — przez ten system — procesów neuro-endokrynalnych.

ENDOKRYNOLOGIA DIAPAUZY

Generalnie rzecz biorąc diapauza zachodzi pod kontrolą neuropeptydów mózgowych, ekdysteroidów (produkowanych przez gruczoły protorakalne — PG) oraz hormonów juwenilnych (wydzielanych przez *corpora allata* — CA). Rozmaite typy diapauzy występują wtedy, gdy PG lub CA powstrzymują produkcję hormonu pod wpływem neurohormonalnych lub nerwowych impulów pochodzących z mózgu [5]. U wyższych *Diptera* larwalne PG, CA i *corpora cardiaca* (gruczoły wydzielające hormon tropowy dla PG — przyp. tłum.) skupione są w kompleksie retrocerebralnym zwanym gruczołem kolistym (PG). Leży on powyżej mózgu, otaczając aortę (rys. 2). PG zanikają podczas przeobrażenia poczwarki w imago, CA natomiast pózostają jako niewielkie struktury leżące powyżej aorty.

DIAPAUZA POCZWARKOWA U *SARCOPHAGA*

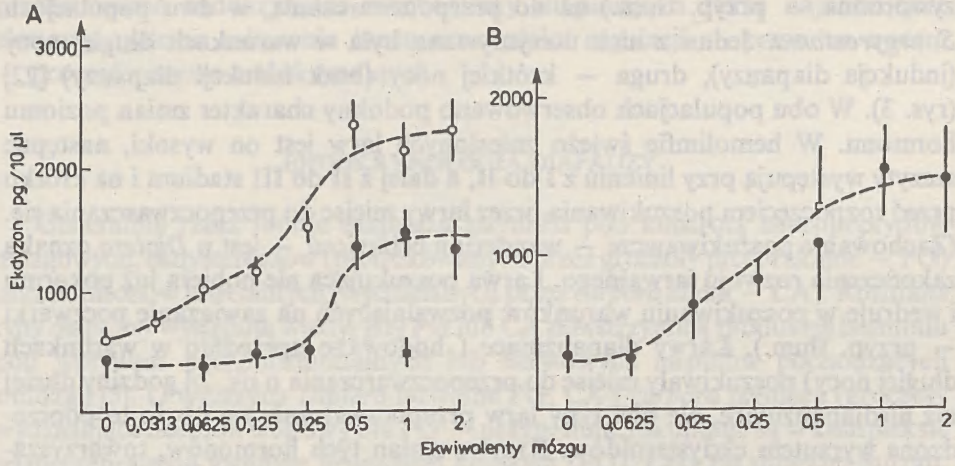
Poziom ekdysteroidów w hemolimfie oznaczono metodą radioimmunotestu (RIA), co 4 godziny od momentu zniesienia larwy (*Sarcophaga* jest jajo-



Rys. 3. *S. argyrostoma*. Poziom ekdysteriodów w hemolimfie larw (A) i poczwarek (B) w grupie ukierunkowanej (linia ciągła, pełne kółka; LD = 12:12) i nieukierunkowanej (linia przerywana, kółka puste; LD = 12:6) na diapauzę, w temperaturze 25°C. M1 i M2 — pierwsze i drugie linienie larwalne, W — początek zachowania poszukiwawczego u larw, PpS — tworzenie puparium u larw „krótkiej nocy" (nie ukierunkowanych na diapauzę), PpL — tworzenie puparium u larw „długiej nocy" (ukierunkowanych na diapauzę), Pp — tworzenie puparium, P — przepoczwarczanie, Pa — rozwój młodocianych imagines (tylko osobniki „krótkiej nocy".
(Dane wg R i c h a r d a i wsp. [22])

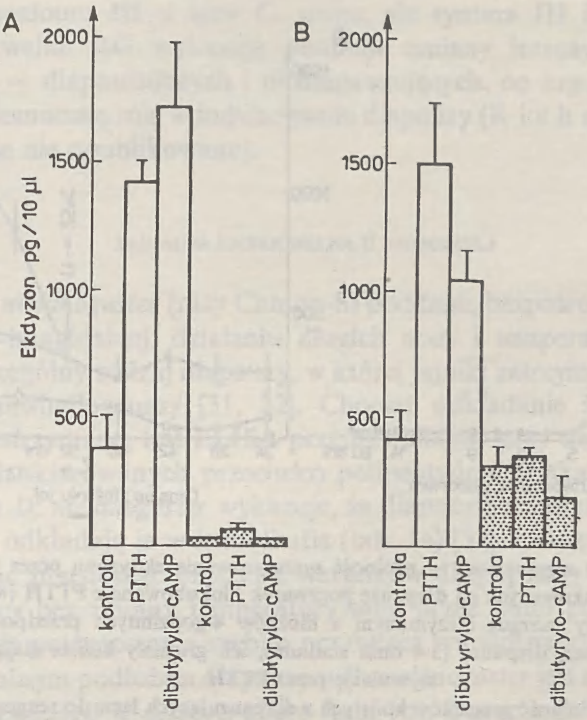
żyworodna – przyp. tłum.) aż do przepoczwarczania, w dwu populacjach *S. argyrostoma*. Jedna z nich utrzymywana była w warunkach długiej nocy (indukcja diapauzy), druga – krótkiej nocy (brak indukcji diapauzy) [22] (rys. 3). W obu populacjach obserwowano podobny charakter zmian poziomu hormonu. W hemolimfie świeżo zniesionych larw jest on wysoki, następne szczyty występują przy linieniu z I do II, a dalej z II do III stadium i na krótko przed rozpoczęciem poszukiwania przez larwy miejsc do przepoczwarczania się. (Zachowanie poszukiwawcze – wandering behaviour – jest u *Diptera* oznaką zakończenia rozwoju larwalnego. Larwa poszukująca nie pobiera już pokarmu i wędruje w poszukiwaniu warunków pozwalających na zawiązanie poczwarki – przyp. tłum.). Larwy diapauzujące (hodowane uprzednio w warunkach długiej nocy) poszukiwały miejsc do przepoczwarczania o ok. 24 godziny dłużej niż niediapauzujące, ale oba typy larw przepoczwarczały się i było to poprzedzone wyrzutem ekdysteroidów. Krzywe zmian tych hormonów, towarzyszących przepoczwarczaniu, są początkowo takie same w obu wymienionych grupach, z szerokim (prawdopodobnie złożonym) szczytem, zwiazanym z szeregiem zmian zachodzących w samej poczwarce. Jednak w grupie utrzymywanej w warunkach krótkiej nocy obserwuje się drugi, przedłużony szczyt, związany prawdopodobnie z rozwojem niediapauzujących postaci „przeddorosłych". U poczwarek diapauzujacych taki szczyt jest niewykrywalny. Rozdział ekdysteriodów przy użyciu HPLC wykazał, że w obu grupach ekdyzon i 20-OH-ekdyzon występują w przybliżeniu w takich samych proporcjach. Wyniki te są tym bardziej logiczne, że diapauza poczwarkowa zachodzi dlatego, że układ mózg–PG nie produkuje dosyć ekdyzonu. Jest to potwierdzone przez obserwacje, że diapauzę poczwarkową u różnych gatunków z rodzaju *Sarcophaga* można łatwo zakończyć przez iniekcję 20-OH-ekdyzonu [7, 43].

Rolę mózgu i gruczołów protorakalnych przebadano następnie *in vitro* [21]. W jednej z serii eksperymentów świeżo wycięte gruczoły koliste, pobrane od larw i poczwarek w różnych stadiach rozwoju, były inkubowane przez 4 godziny w 25°C, w wiszącej kropli medium zawierającego różne stężenia ekstraktów sporządzonych z mózgów przedpoczwarek pobranych w 4 godziny po rozpoczęciu tego stadium. Ekstrakty takie nazwano „standardowymi" i uznano, że zawierają one PTTH – hormon protorakotropowy, mózgowy neuropeptyd (w stałych, niezmiennych ilościach – chodziło o stworzenie dogodnych, standaryzowanych warunków kontroli doświadczenia – przyp. tłum.). W innej serii „standardowe" gruczoły koliste (pobrane od larw poszukujących) były inkubowane w mediach zawierających ekstrakty mózgowe pochodzące z larw i poczwarek będących w różnych stanach fizjologicznych. Pobudzenie gruczołów protorakalnych przez PTTH było oznaczone metodą radioimmunotestu (RIA) poprzez pomiar stężenia ekdysteroidów w medium inkubacyjnym. Rysunek 4a pokazuje krzywą odpowiedzi fizjologicznej gruczołu kolistego pobranego od nie żerującej już larwy i od larwy bezpośrednio przed utworzeniem puparium (stadium „czerwonych przedchlinek") (ang.: red-spiracled



Rys. 4. *S. argyrostoma.* Krzywa odpowiedzi fizjologicznej dla procesu aktywacji *in vitro* gruczołów kolistych (RG) mózgowymi ekstraktami PTTH. A — ekstrakty PTTH z 4-godzinnych przedpoczwarek, gruczoły koliste z larw po zakończeniu okresu żerowania (kółka pełne) lub larw w stadium „czerwonych przedchlinek" (kółka puste). Jako kontrola służyły ekstarakty brzusznych zwojów nerwowych (czarne kwadraty). B — ekstrakty PTTH z mózgów poczwarek w 35 dniu diapauzy, gruczoły koliste z larw po zakończeniu okresu żerowania (kółka pełne). Pusty kwadrat ukazuje wpływ dawki PTTH będącej ekwiwalentem połowy mózgu, otrzymanej z mózgu poczwarki (ukierunkowanej na diapauzę) w 96 godzinie po wytworzeniu puparium. n = 5-10 wyników wyrażonych jako ekwiwalent ekdyzonu. (Dane wg Richarda i Saundersa [21]

larveae — przyp. tłum.), pobudzonego *in vitro* „standardowym" ekstraktem mózgowym. W obu grupach maksymalne pobudzenie było osiągane przy użyciu połowy ekwiwalentu mózgowego PTTH, z tym że RG pobrane z larw będących tuż przed wytworzeniem puparium produkowały więcej ekdyzonu, prawdopodobnie wykazując zwiększoną wrażliwość na PTTH (co jest zrozumiałe ze względu na stan fizjologiczny). Podobną odpowiedź fizjologiczną osiągnięto dla „standardowych" gruczołów kolistych inkubowanych w ekstraktach z mózgów diapauzujących (35 dni po utworzeniu puparium) (rys. 4b). Wykazuje to jasno, że diapauzujący mózg jest tak samo aktywny, jak mózg 4-godzinnej przedpoczwarki z linii niediapauzującej i sugeruje, że podczas diapauzy mózg nie uwalnia PTTH. Gruczoły koliste z larw, które zaprzestały żerowania i z poczwarek diapauzujących (28 dzień), były także inkubowane w medium zawierającym „standardowy" ekstrakt mózgowy lub rozmaite nukleotydy cykliczne. Rysunek 5a ukazuje, że PTTH (pół ekwiwalentu mózgowego) lub dibutyryl CAMP (10mM) — analog cAMP, łatwo wnikający do komórek — pobudza gruczoły koliste z larw poszukujących, ale nie z diapauzujących poczwarek. Późniejsze badania wykazały, że wrażliwość RG na PTTH zmienia się gwałtownie, jeśli poczwarka zapadnie w diapauzę, tak więc w 4 dni po utworzeniu puparium RG z diapauzującej poczwarki staje się niewrażliwe



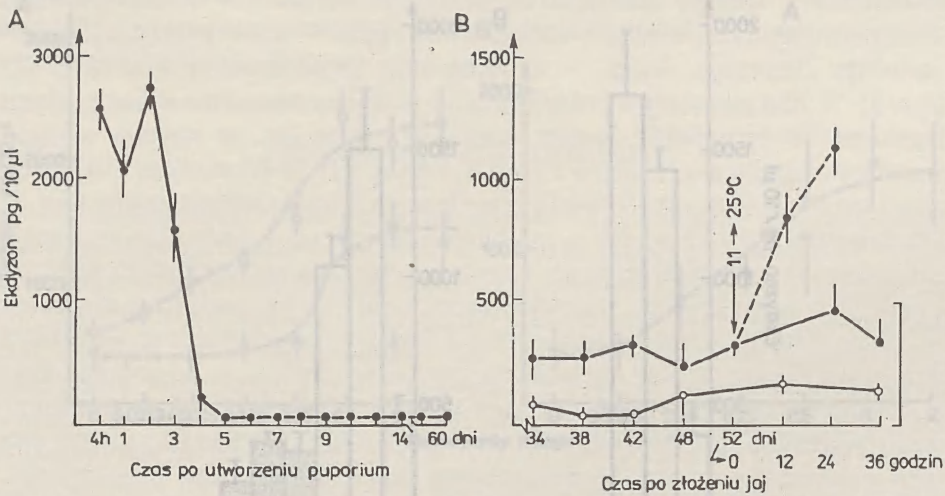
Rys. 5A. Aktywacja *in vitro* gruczołów kolistych *S. argyrostoma* przez PTTH (w dawce będącej ekwiwalentem połowy mózgu) oraz przez analog cAMP (dibutyrylo-cAMP). Słupki puste — gruczoły koliste z larw nie ukierunkowanych na diapauzę, słupki zaokrąglone — gruczoły koliste z diapauzujacych poczwarek (28 dni po utworzeniu puparium)

Rys. 5B. To samo dla *C. vicina*. Słupki puste — gruczoły koliste larw niediapauzujących, słupki zaokrąglone — gruczoły koliste larw diapauzujących (32 dni po złożeniu jaj). n = 5-10; wyniki wyrażone w ekwiwalentach ekdyzonu. (Dane wg Richarda i Saundersa [21])

na PTTH (rys. 6a). Gruczoły te utrzymują swą niewrażliwość aż do momentu podjęcia na nowo rozwoju przez poczwarkę, w następstwie jej okresowego ogrzania. Dane te sugerują, że mózg diapauzującej poczwarki, chociaż zawiera PTTH, nie uwalnia go. Co więcej — PG diapauzującej poczwarki są niewrażliwe na stymulujący efekt PTTH, toteż wydaje się, że mechanizm regulacji diapauzy poczwarkowej u *Sarcophaga* ma dwoistą naturę, tak jak u niektórych innych owadów [1].

DIAPAUZA LARWALNA U *CALIPHORA*

Chociaż poziom ekdysteroidów w hemolimfie larw *C. vicina*, zarówno u much hodowanych w warunkach krótkiej, jak i długiej nocy, nie został szczegółowo zbadany, to bezpośrednią przyczyną diapauzy wydaje się niedostatek tych hormonów, ponieważ pomiary wskazują zawsze na niski poziom



Rys. 6A. *Sarcophaga argyrostoma* — zdolność syntetyzowania ekdyzonu przez gruczoły koliste pochodzące z ukierunkowanych na diapauzę poczwarek i inkubowane z PTTH (w dawce będącej ekwiwalentem połowy mózgu) otrzymanym z mózgów 4-godzinnych przedpoczwarek. Kiedy poczwarki rozpoczynają diapauzę (3-4 dnia stadium), ich gruczoły koliste stają się oporne na stymulację przez PTTH

Rys. 6B. *C. vicina*. Zdolność gruczołów kolistych z diapauzujących larw do reagowania na PTTH (ekwiwalent połowy mózgu) pochodzący z: larw trzymanych w 11°C (kółka pełne, linia ciągła); po przeniesieniu larw do 25°C (kółka pełne, linia przerywana); kółka puste — poziom ekdysteroidów krążących w hemolimfie larw diapauzujących w 11°C. n = 5-7. Wyniki wyrażone w ekwiwalentach ekdyzonu. (Dane wg Richarda i Saundersa [21]

ekdysteroidów u diapauzujących larw [21] (rys. 6b). Badania *in vitro* wykazały także zdolność gruczołu kolistego do syntezy ekdyzonu w odpowiedzi na PTTH (pochodzące z *Sarcophaga*), w ilości 0,5 ekwiwalentu mózgowego. Zdolność ta spada u diapauzujących larw, choć nigdy do tak wyjątkowo niskich wartości, jakie obserwowane są u diapauzujących poczwarek *Sarcophaga* (rys. 5a). Różnice w intensywności diapauzy u obu tych gatunków modą być odzwierciedleniem tego stanu rzeczy. Diapauzujące larwy *C. vicina* szybko odpowiadają na wzrost temperatury: zdolność PG do pobudzania przez PTTH powraca pomiędzy 12 a 24 godz. [21]. (rys. 6b), w następstwie tego dochodzi do wytworzenia puparium [35]. Interesujące, że izolowany kompleks mózg—RG ogrzewany *in vitro* nigdy nie osiąga takiej zdolności. Ponowne pobudzenie wymaga ogrzania całego organizmu. Możliwe, że jakiś czynnik w hemolimfie, pochodzący z innych tkanek, takich jak ciało tłuszczowe, jest niezbędny do przywrócenia aktywności kompleksu mózg—RG.

U niektórych gatunków motyli w diapauzę larwalną wydaje się zaangażowany również hormon juwenilny (JH). Podwyższony poziom JH pod koniec rozwoju larwalnego nie pozwala na dalszą metamorfozę, możliwe że poprzez uniemożliwienie wyrzutu PTTH do hemolimfy [15]. Nic nie wiemy

o zmianach poziomu JH u larw *C. vicina*, ale synteza JH *in vitro* poprzez izolowane larwalne RG wykazuje podobne zmiany intensywności w obu grupach larw — diapauzujących i niediapauzujących, co sugeruje, że JH gra co najwyżej nieznaczną rolę w indukowaniu diapauzy (R i c h a r d i S a u n d e r s — dane nie opublikowane).

DIAPAUZA EMBRIONALNA U *DROSOPHILA*

Samice *D. melanogaster* (rasy Canton-S) poddane, bezpośrednio po wylince poczwarkowo-imaginalnej, działaniu długich nocy i temperatury 12°C rozpoczynają szczególny rodzaj diapauzy, w której jajniki zatrzymują swój rozwój w stadium prewitellogenezy [31, 32]. Chociaż odkładanie żółtka u takich muszek jest wstrzymane, test ELISA przeprowadzony przy użyciu przeciwciał poliklonalnych skierowanych przeciwko polipeptydom żółtka — witellogeninom — (YPs) *D. melanogester* wykazuje, że diapauzujące muszki kontynuują syntezę YPs i odkładają je w hemolimfie (tab. 1a) [32]. Diapauzę taką można łatwo przerwać przenosząc muszki z warunków długiej nocy do fotoperiodu o krótkiej nocy bez zmiany temperatury albo przez samo podniesienie temperatury. Takie postępowanie szybko przywraca witellogenezę.

Endokrynalnym podłożem diapauzy u *D. melanogaster* jest redukcja syntezy hormonu juwenilnego w *corpora allata* (tab. 1b). Oznaczenia syntezy JH (JH III i JHB_3) przez pojedyncze Ca wykazały, że gruczoły te, pobrane z muszek niediapauzujących lub z takich, które przerwały diapauzę, syntetyzowały około 4 razy więcej JH niż CA z muszek diapauzujących. Gruczoły pochodzące z osobników *D. melanogaster*, tuż po ich wyjściu z poczwarki, wykazały podobną syntezę JH jak CA u muszek diapauzujących. Niemniej zewnętrzna aplikacja JH III lub JHB_3 (w stężeniu około 0,5 μg na owada) prowadzi do zakończenia diapauzy i szybkiego podjęcia witellogenezy [36].

Dane powyższe sugerują, że diapauza embrionalna u *D. melanogaster* wywołana jest przez zablokowanie pobierania białek żółtka z hemolimfy, które w normalnych warunkach stymulowane jest przez JH. Spowodowane jest to zmniejszeniem syntezy JH przez *corpora allata*, a ostatecznie rzecz ujmując — przez zmiany w regulacji czynności CA przez zegar fotoperiodyczny zlokalizowany w mózgu.

GŁÓWNE PROBLEMY FOTOPERIODYCZNEJ INDUKCJI DIAPAUZY

Chociaż zaczynamy już rozumieć procesy endokrynalne, które leżą bezpośrednio u podstaw zapadania w diapauzę, jej utrzymywania i zakończenia (u much i innych owadów), to nasza wiedza o procesach związanych z fotoperiodycznym mierzeniem czasu, zachodzącym w mózgu, jest w najlepszym wypadku elementarna. Najważniejsze pytania w tej dziedzinie to: 1) gdzie

(anatomicznie) znajdują się ważne komponenty takie jak fotoreceptor czy zegar, 2) jak mierzony jest czas fotoperiodyczny i jak gromadzona jest informacja o nim, 3) w jaki sposób owa gromadzona informacja (tzw. program fotoperiodyczny) reguluje procesy neuroendokrynalne.

Złożoność tego systemu jest dobrze ilustrowana przypadkiem diapauzy u trzech wymienionych gatunków muchówek, u których informacja, kumulowana w okresie wrażliwości, może powodować zauważalne zmiany w endokrynologii owada po upływie pewnego czasu. U *Sarcophaga* dzieje się tak po przejściu kilku stadiów rozwojowych, u *Calliphora* — z jednej generacji do następnej.

LOKALIZACJA FOTORECEPTORÓW I MECHANIZMU ZEGARA-LICZNIKA

Mamy mało konkretnych danych na temat fotoreceptorów zaangażowanych w indukcję diapauzy u wyższych muchówek, chociaż bezpiecznie jest przyjąć, że drogi recepcji mają naturę pozaoptyczną, skoro oczy złożone i przyoczka nie występują u wielu wrażliwych stadiów. Jeśli chodzi o jakość światła skutecznego do indukowania diapauzy, wstępne dane uzyskane dla *S. argyrostoma* (Saunders — dane nie opublikowane) sugerują, że owad ten jest maksymalnie wrażliwy na światło o długości fali 570 nm. Owady tego gatunku nie potrafią rozróżnić cykli zawierajacych krótki lub długi okres czerwonego światła. Eksperymentując na larwach *S. argyrostoma* będących w stadium poszukiwawczym, Giebułtowicz i Saunders [9] wykazali, że implantacja kompleksów mózg—RG pochodzących od dawców hodowanych w warunkach krótkiej nocy (takie owady nie diapauzują) do biorców wystawionych na działanie długiej nocy (poczwarki z takich larw będą diapauzować) prowadzi do rozwoju dającego w efekcie poczwarkę niediapauzującą. Pokazuje to, że rezultat wcześniejszej ekspozycji larwy na krótką noc (tj. przechowywany program fotoperiodyczny) jest przenoszony przez kompleks mózg—RG.

Przeprowadzony jednocześnie doskonały eksperyment z *S. crassipalpis* [8], w którym transplantowano kompleksy mózg—RG do larw pozbawionych swych gruczołów kolistych, wykazywał, że zarówno program rozwojowy (diapauza lub jej brak), jak i związany z tym okres zachowania poszukiwawczego larw (patrz rys. 3), są „zawarte" w kompleksie mózg—RG pod koniec rozwoju larwalnego.

Powyższe obserwacje mocno przemawiają za tym, że cały ów mechanizm (obejmujacy fotoreceptor, licznik-zegar i przechowujący informację program) zawarty jest w centralnym systemie nerwowym i retrocerebralnych gruczołach larwy, a możliwe że i embriona, jeśli te struktury są już wtedy zróżnicowane.

U *C. vicina* natura matczynej regulacji diapauzy larwalnej jest nieznana, ale interesujące jest to, że intensywność (lub długotrwałość) diapauzy larwalnej jest dodatkowo skorelowana z zakresem diapauzy występującej wśród potomstwa

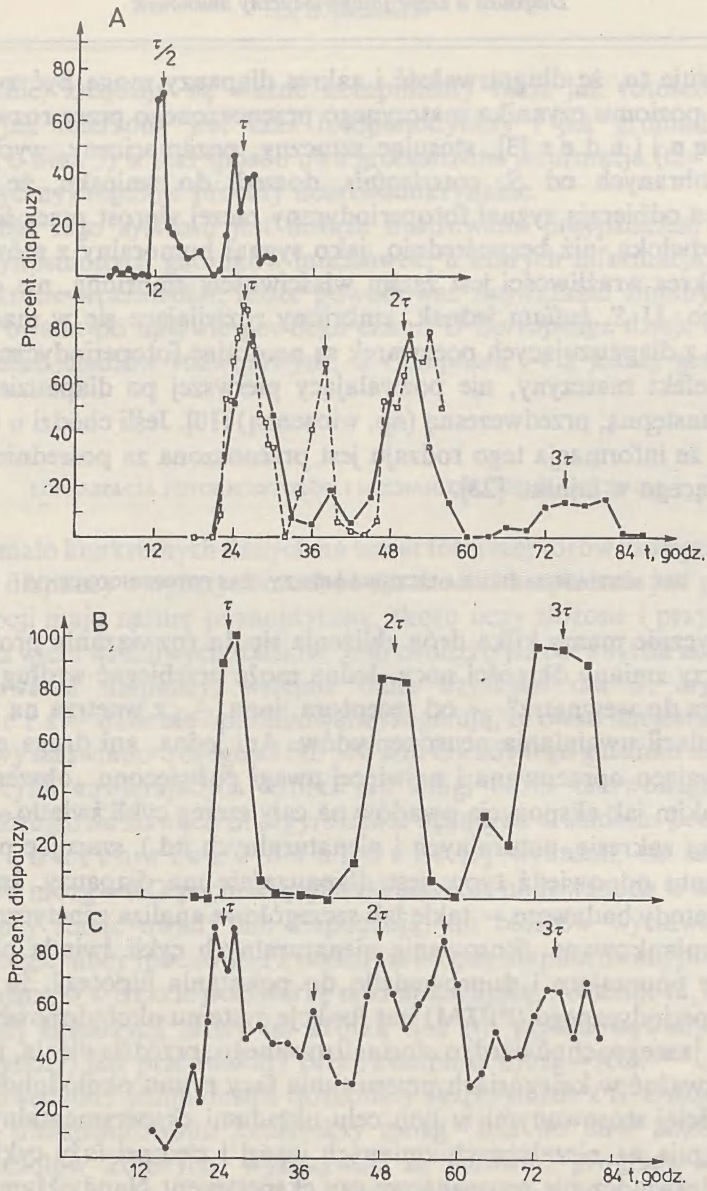
[30]. Sugeruje to, że długotrwałość i zakres diapauzy mogą być związane ze zmianami poziomu czynnika matczynego przenoszonego przez rozwijający się jajnik. Denlinder [3], stosując sztuczny, pozamaciczny, wychów embrionów pobranych od *S. crassipalpis*, doszedł do wniosku, że embriony *Sarcophaga* odbierają sygnał fotoperiodyczny raczej wprost przez ścianę matczynego odwłoka, niż bezpośrednio, jako sygnał humoralny z mózgu matki. Główny okres wrażliwości jest zatem właściwością embriona, nie organizmu matczynego. U *S. bullata* jednak, embriony rozwijające się w macicy much wyklutych z diapauzujących poczwarek są neutralne fotoperiodycznie, tzn., że jest jakiś efekt matczyny, nie pozwalający pierwszej po diapauzie generacji zapaść w następną, przedwczesną (np. wiosenną) [10]. Jeśli chodzi o *Calliphora* wiadomo, że informacja tego rodzaju jest przenoszona za pośrednictwem jaja przebywającego w jajniku [23].

JAK MECHANIZM ZEGARA-LICZNIKA MIERZY CZAS FOTOPERIODYCZNY?

Teoretycznie mamy kilka dróg zbliżenia się do rozwiązania problemu jak zegar mierzy zmiany długości nocy. Jedna może przebiegać według schematu „z zewnątrz do wewnątrz" — od receptora, inna — „z wnętrza na zewnątrz" — od regulacji uwalniania neuropeptydów. Ani jedna, ani druga nie została przekonywająco opracowana i najwięcej uwagi poświęcono „obszernym" badaniom, takim jak ekspozycja owadów na cały szereg cykli światło—ciemność (w szerokim zakresie, naturalnych i nienaturalnych itd.), szacując pod koniec eksperymentu odpowiedź typu: jest diapauza/nie ma diapauzy. Inne, nieinwazyjne metody badawcze — takie jak szczegółowa analiza genetyczna — będą jeszcze wzmiankowane. Stosowanie nienaturalnych cykli światła okazało się szczególnie pouczające i doprowadziło do powstania hipotezy, że mierzenie czasu fotoperiodycznego (PPTM) jest funkcją systemu okołodobowego [2, 17], a także do jasnego, choć bardzo sformalizowanego, przedstawienia, jak PTTM można rozważać w kategoriach przesuwania fazy rytmu okołodobowego.

Najczęściej stosowanymi w tym celu układami eksperymentalnymi są te, które polegają na niezależnych zmianach jasnej i ciemnej fazy cyklu (jak na przykład doświadczenie rezonansowe czy eksperyment Nandy-Hamnera), lub też takie, w których występuje fotoperiod „szkieletowy" (jak na przykład zakłócenie nocy czy doświadczenie „podwójnej stabilności" [28]). Rozważamy w tym miejscu wyniki eksperymentów Nandy-Hamnera i „podwójnej stabilności" w odniesieniu do wyższych muchówek.

Doświadczenie Nandy-Hamnera polega na poddaniu grup osobników badanego gatunku działaniu szeregu cykli świetlnych, z których każdy składa się ze stałej fotofazy (fazy jasnej) (L) i systematycznie zmieniającej się fazy ciemnej (D), tak że okres (T) cyklu światła—ciemności waha się w szerokim zakresie kilku wielokrotności okresu endogennej okołodobowej oscylacji (t).



Rys. 7. Wyniki doświadczeń Nandy-Hamnera

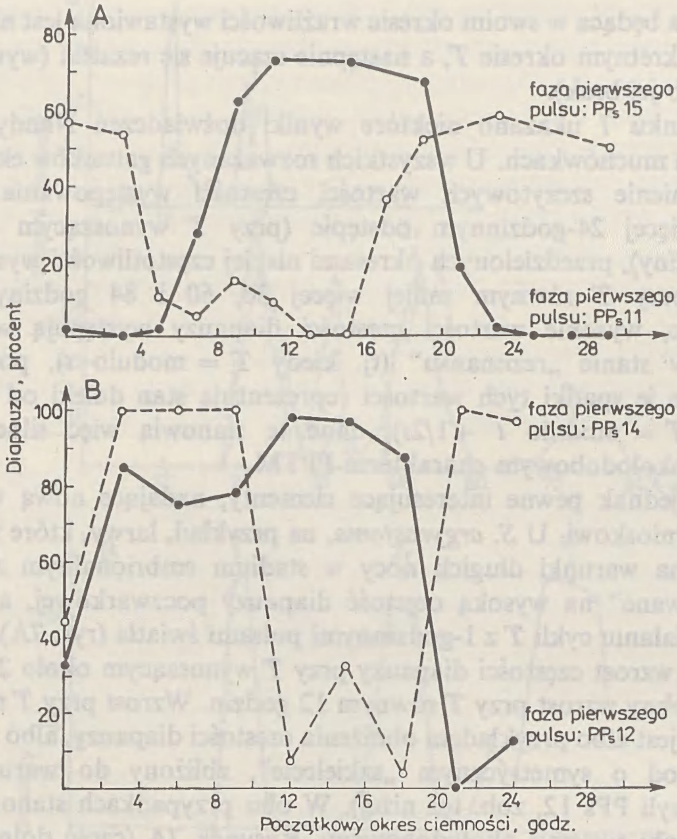
A — *S. argyrostoma*. U góry: stosowanie 1-godzinnych pulsów światła, dających wzrost częstotliwości diapauzy przy *T* bliskim 12 (LD = 1:11) i 25 godzin (LD = 1:24). U dołu: stosowanie pulsów światła 3-godzinnych (puste kwadraty) i 12-godzinnych (kwadraty pełne), dających wzrost częstości diapauzy przy *T* bliskim 25, 50 i 75 godzin. Dodatkowy szczyt częstości diapauzy (mała strzałka) występuje szczególnie przy pulsach 3-godzinnych przy *T* wynoszących około 36 godzin, między pierwszym a drugim zakresem dostosowania fazy rytmu (por. tekst). B — *C. vicina*. Stosowanie 13-godzinnych pulsów światła, co daje wzrost częstości diapauzy przy *T* bliskim 24, 48 i 72 godz. C — *C. melanogaster*. Stosowanie 10-godzinnych pulsów światła, dających wzrost częstości diapauzy przy *T* bliskim 24, 48 i 72 godziny, a nawet dodatkowe szczyty częstości pomiędzy zakresami dostosowania fazy cyklu. *T* = czas trwania cyklu światła i ciemności (L+D) (Dane wg S a u n d e r s a [29 i nie opublikowane]).

Każda grupa będąca w swoim okresie wrażliwości wystawiona jest na działanie cyklu o konkretnym okresie *T*, a następnie szacuje się rezultat (występowanie diapauzy lub jej brak).

Na rysunku 7 ukazano niektóre wyniki doświadczeń Nandy-Hamnera na wyższych muchówkach. U wszystkich rozważanych gatunków eksperyment ujawnił istnienie szczytowych wartości częstości występowania diapauzy w mniej więcej 24-godzinnym odstępie (przy *T* wynoszącym około 24, 48 i 72 godziny), przedzielonych okresami niskiej częstotliwości występowania diapauzy, przy *T* równym mniej więcej 36, 60 i 84 godziny. Ogólnie rzecz biorąc, wysokie wartości częstości diapauzy występują wtedy, gdy *T* i *t* są w stanie „rezonansu" (tj. kiedy T = modulo t), podczas gdy rozdzielające je spadki tych wartości reprezentują stan daleki od rezonansu (tj. kiedy T = modulo $t + 1/2t$); dane te stanowią więc silne poparcie hipotezy o okołodobowym charakterze PPTM.

Istnieją jednak pewne interesujące elementy, nadające nową wagę temu ogólnemu wnioskowi. U *S. argyrostoma*, na przykład, larwy, które za pomocą ekspozycji na warunki długich nocy w stadium embrionalnym zostały już „ukierunkowane" na wysoką częstość diapauzy poczwarkowej, a następnie poddane działaniu cykli *T* z 1-godzinnymi pulsami światła (rys. 7A), wykazują oczekiwany wzrost częstości diapauzy przy *T* wynoszącym około 24 godziny, jak też podobny wzrost przy *T* równym 12 godzin. Wzrost przy *T* równym 12 godzin ($t/2$) jest albo przykładem obniżenia częstości diapauzy, albo też reakcją na fotoperiod o symetrycznym „szkielecie", zbliżony do warunków LD 1:10:1:12 (czyli PPs 12, zob. też niżej). W obu przypadkach stanowi to silny dowód udziału systemu okołodobowego. Rysunek 7A (część dolna) ukazuje reakcje *S. argyrostoma* na cykle *T* zawierające 12- lub 3-godzinne pulsy światła. W pierwszym przypadku (L = 12 godzin) słaby wzrost częstości diapauzy zachodzi przy *T* wynoszącym około 36-38 godzin: w sformalizowanym modelu zegara okołodobowego [13, 34] przypadkowo przewidziano jego obecność w cyklach *T* wykraczających poza zakres dostosowania się oscylatora okołodobowego. W drugim przypadku obserwuje się w obrębie cyklu światła rytmikę spontaniczną, co daje w efekcie częstość diapauzy zbliżoną do występującej w warunkach stałej ciemności (DD). W eksperymencie z zastosowaniem 3-godzinnych pulsów światła (rys. 7A), larwom doświadczalnym „zaprogramowano" diapauzę poprzez ekspozycję w stadium embrionalnym na warunki długiej nocy: miały one wyższy zakres dostosowania się do pulsów krótszych; stąd wzrost częstości diapauzy przy T = 36 godzin był wyraźniej zaznaczony. Podobne wzrosty częstości obserwowano u *C. vicina* (dane nie przedstawione) oraz u *D. melanogaster* (rys. 7C).

Doświadczenia Nandy-Hamnera wykazały u wszystkich trzech gatunków, że długość nocy stanowiła „centralny punkt" zjawisk fotoperiodycznych oraz że długość ta „mierzona" była przy pomocy któregoś z elementów procesu dostosowania fazy rytmu w obrębie systemu okołodobowego.



Rys. 8. Wyniki eksperymentów „podwójnej stabilności" przy zastosowaniu fotoperiodów o symetrycznym szkielecie (PPs) utworzonych przez zastosowanie dwóch 1-godzinnych pulsów światła na cykl. A — *S. argyrostoma*. Kółka pełne, linia ciągła: PPs11 (LD = 1:9:1:13) z pierwszym pulsem zaczynającym się w różnym czasie po przeniesieniu owadów z LL do DD; kółka puste, linia przerywana: obraz lustrzany, PPs15 (= LD 1:13:1:9), reszta jak wyżej. B — *C. vicina*. Kółka pełne, linia ciągła: PPs12 LD = 1:10:1:12); kółka puste, linia przerywana: PPs14 LD =1:12:1:10). Szczegóły w tekście. (Dane wg Saundersa [24] i Van Nunesa i wsp. [40])

Eksperymenty „podwójnej stabilności" (rys. 8) rozciągają się na kwestie reakcji na fotoperiod o „szkielecie" symetrycznym (PPs), o którym była mowa wyżej (rys. 7A). Pittendrigh [16] wykazał, że rytm wychodzenia z poczwarek u *Drosophila melanogaster* był w stanie dostosować się do krótkich pulsów światła (dwa pulsy na cykl) (PPs) w sposób podobny jak w przypadku fotoperiodu „kompletnego" (PPc). Na przykład, kiedy początkowy odstęp między dwoma pulsami był krótki (tj. LD = 1:6:1:16, czyli PPs8) lub też długi (tj. LD = 1:16:1:6, czyli PPs 18), wówczas okołodobowy dawca rytmu (element systemu okołodobowego organizmu — przyp. tłum.) przyjmował w obu

przypadkach wariant z odstępem krótszym (czyli PPs8), choć w drugim przypadku następowało to dopiero po „przeskoku" fazy i kilku cyklach przejściowych. „Podwójna stabilność" powstaje w obrębie wąskiego zakresu „szkieletów" zbliżonego do *t*/2. W przypadku *D. pseudoobscura* i pulsów 15-minutowych zakres ten wynosi na przykład od PPs 10,3 do PPs 13,7. Wszystkie „szkielety" w tej strefie mają do dyspozycji dwa różne warianty (pierwszy odstęp krótszy lub dłuższy), w zależności od dwóch zmiennych początkowych: fazy oscylacji dawcy rytmu, w której następuje pierwsze oświetlenie, oraz wielkości pierwszego „zaoferowanego" (przez eksperymentatora – przyp. tłum.) odstępu między pierwszym a drugim pulsem [16].

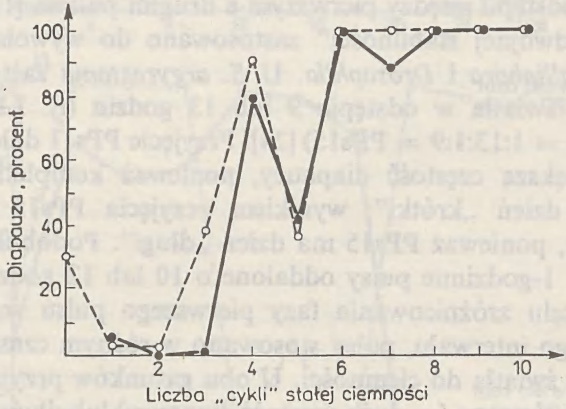
Zjawisko „podwójnej stabilności" zastosowano do wywołania diapauzy u *Sarcophaga*, *Calliphora* i *Drosophila*. U *S. argyrostoma* zastosowano dwa 1-godzinne pulsy światła w odstępie 9 lub 13 godzin (tj. LD = 1:9:1:13 = PPs11, lub LD = 1:13:1:9 = PPs15) [24]. Przyjęcie PPs11 dałoby teoretycznie w efekcie większą częstość diapauzy, ponieważ kompletny fotoperiod 11-godzinny ma dzień „krótki"; wynikiem przyjęcia PPs15 byłaby niska częstość diapauzy, ponieważ PPs15 ma dzień „długi". Podobnie u *C. vicina*: zastosowano dwa 1-godzinne pulsy oddalone o 10 lub 12 godzin (PPs12 lub PPs14) [40]. W celu zróżnicowania fazy pierwszego pulsu w serii, jak też wartości pierwszego interwału, pulsy stosowano w różnym czasie po przeniesieniu owadów ze światła do ciemności. U obu gatunków przyjmowanie jako „dnia" interwału krótszego (= duża częstość diapauzy) lub dłuższego (= niska częstość diapauzy) zgodne było z teoretycznymi założeniami [24, 40]. U *C.vicina*, oprócz początkowych, liczących mniej niż 8 godzin okresów ciemności, reakcje na krótkie lub długie „szkielety" stanowiły swoje „lustrzane odbicia" (rys. 8). Pittendright i Nakamura wykazali u *Drosophila auraria* [19], że PPs14 wywołuje diapauzę embrionalną w mniejszym stopniu niż PPs12. Wyniki te stanowią część najistotniejszych dowodów uczestnictwa systemu okołodobowego w zjawiskach fotoperiodycznych.

MODELE ZEGARA FOTOPERIODYCZNEGO

Pomimo że udział oscylacji okołodobowych w mechanizmie zegara jest obecnie dobrze udowodniony, dostępne dane w niewielkim stopniu pozwalają na wyróżnienie poszczególnych typów pomiarów czasu. W skrócie, obejmują one: typ „zbieżności zewnętrznej" [2,18,27], w którym faza indukowana światłem objawia się w warunkach krótkiej nocy, lecz zanika w warunkach nocy długiej: typ „zbieżności wewnętrznej" [20], gdzie pomiar długości nocy jest funkcją „wewnętrznych" czy też wzajemnych stosunków w obrębie systemu okołodobowego; modele wskazujące, że długość nocy mierzona jest przy pomocy nie majacej charakteru oscylatora „klepsydry" [14], które wraz z wynikami eksperymentów Nandy-Hamnera (rys. 7) są obrazem współzależności

między procesem bardziej ogólnym (licznikiem?) a cyklem światła [38]. Nie przedstawiamy tu przeglądu różnych proponowanych rozwiązań, wspominając jedynie, że chociaż system okołodobowy owadów ma bez wątpienia naturę multioscylatora, to fakt ten nie wyklucza istnienia pewnego rodzaju „zbieżności zewnętrznej", przynajmniej w ramach poręcznej hipotezy roboczej. Umożliwiło to na przykład wysunięcie doskonałej prognozy dotyczącej reakcji diapauzy (i jej interpretacji) w złożonych warunkach oświetlenia [25, 27].

Nasza wersja modelu „zbieżności zewnętrznej" mówi, że oscylator (oscylatory) składowy może wykazywać różny poziom tłumienia [13, 33, 34].



Rys. 9. *C. vicina*. Częstość diapauzy larwalnej u osobników pochodzących z jaj złożonych w 10 (kółka pełne, linia ciągła) lub 11 (kółka puste, linia przerywana) dniu dorosłego życia w temperaturze 23,5°C przez muchy przeniesione do stałej ciemności po różnym czasie przebywania w stałym świetle. (Dane wg Van N u n e s a i wsp. [40])

Przyjęcie tej reguły tłumaczy cały kształt PRC, łącznie ze spadkiem częstości diapauzy przy bardzo małych długościach dnia (zob. rys. 1), jak również sugeruje, że kontrowersja w kwestii: klepsydra/oscylator okołodobowy [14, 20] może polegać na czymś więcej niż na różnicy we współczynnikach tłumienia. Dowodów na wytłumianie oscylatorów w fotoperiodycznych pomiarach czasu można się doszukać w wielu omawianych tu wynikach, wyraźniej uwidocznione jest to w przedstawionych na rysunku 9 danych dotyczących *Calliphora vicina* [40]. Dorosłe muchy były tu przeniesione z warunków stałego światła (LL) do stałej ciemności (DD) w kolejnych dniach po opuszczeniu poczwarek. Ich jaja zbierano w dniu 10 i 11, pozwolono wykluć się młodym osobnikom, trzymanym następnie w hodowli w stałej ciemności (11°C); po kilku tygodniach określono częstość diapauzy larwalnej. Wyniki wskazują, że częstość występowania diapauzy wzrasta wraz z liczbą dni spędzonych w stałej ciemności przed złożeniem jaj, osiągając po 5-6 dniach wartość 100%. Jest to poparciem tezy, że „cykle" spędzone w stałej ciemności kumulują się za pomocą mechanizmu liczącego, opartego na wytłumieniu oscylatora, który to mechanizm utrzymuje się w stalej ciemności przez okres 5-6 dni.

PERSPEKTYWY

Wyniki doświadczeń opisanych w niniejszym opracowaniu przeglądowym sugerują, że cały system fotoperiodyczny muchówek znajduje się w mózgu i jego strukturach przyległych. Wciąż jednak brakuje nam bardziej szczegółowej wiedzy na temat struktur i procesów występujacych w obrębie tego systemu — wiedzy, którą dysponujemy w odniesieniu na przykład do ssaków (chodzi tu między innymi o siatkówkę, szlak nerwowy do jąder nadskrzyżowaniowych, melatoninę w szyszce). Postęp w naszym poznaniu fotoperiodyzmu owadów musi być obecnie uzależniony od uzyskania równie konkretnych informacji o zaangażowanych weń procesach fizjologicznych.

Tabela 1A

Zawartość witellogeniny (YP — ang. yolk polypeptide) w hemolimfie i jajnikach diapauzujących samic *Drosophila melanogaster*

Grupa	Temperatura i fotoperiod	Wiek	N	Poziom YP (ng/muszkę)		Stadium rozwojowe jajnika
				hemolimfa	jajniki	
Tuż po wyjściu z poczwarki	— —	30 min	6	13,5	—	prewitellogeneza
Diapauzujące	12°C, 10:14	14 dni	9	124,7	32,3	prewitellogeneza
Nie diapauzujące	12°C, 16:8	14 dni	8	154,5	152,9	witellogeneza
Diapauzujące → 25°C, 24 h	— —	14 dni	6	77,2	586,3	witellogeneza

Tabela 1B

Synteza *in vitro* hormonu juwenilnego (JH III i JHB_3) przez izolowane *corpora allata* u *Drosophila melanogaster*

Gupa	Temperatura i fotoperiod	Wiek dni	N	Synteza JH (fmole $CA^{-1}h^{-1}$)
Diapauzujące	12°C, 10:14	14—25	22	3,3
Nie diapauzujące	12°C, 16:8	14—25	28	12,6
Diapauzujące → 25°C, 24 h	— —	14	3	14,2

Dalszy postęp przyniosłoby przeprowadzenie pewnych interesujących, wstępnych obserwacji. Jedną z nich jest określenie różnic w metabolizmie (w aktywności oksydazy cytochromowej) w ośrodkach wzroku motyli *Pieris* (bielinek — przyp. tłum.), wtedy gdy larwy oświetleniowe są pulsem światła w późnej fazie subiektywnej nocy, czyli w okresie istotnym — jak wiadomo — w pomiarach długości nocy (przez owada — przyp. tłum.) [12]. Kolejną korzyść odnieść można z faktu, że melatoninopodobna immunoreaktywność może być wykryta u owadów w tkance nerwowej i strukturach pokrewnych [37, 42]. W końcu, odkrycie u *Drosophila melanogaster* diapauzy fotoperiodycznej

[31] ukazuje wiele możliwości genetycznego przebadania tego zjawiska na wszelkich jego etapach, łącznie ze współzależnościami między pomiarem czasu a oscylacjami okołodobowymi, a także z występującą regulacją wydzielania neurohormonu.

LITERATURA

1. Bowen M. F., Bollenbacher W. E., Gilbert L. I. (1984) *In vitro studies on the brain and prothoracic glands in the pupal diapause of Manduca sexta.* J. Exp. Biol. 108, 9-24.
2. Bünning E. (1936) *Die endogenne Tagesrhythmik als Grundlage der Photoperiodischen Reaktion.* Ber. Dt. Bot. Ges. 54,590-607.
3. Denlinger D. L. (1971) *Embryonic determination of pupal diapause in the flesh fly, Sarcophaga crassipalpis.* J. Insect Physiol. 17, 1815-1822.
4. Denlinger D. L. (1972) *Induction and termination of pupal diapause in Sarcophaga (Diptera: Sarcophagidae).* Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole 142, 11-24.
5. Denlinger D. L. (1985) *Hormonal control of diapause.* [W] *Comprehenesive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology.* Tom 8, R. 11, 353-412, Kerkut G. A., Gilbert L. I. (red.) Pergamon Press, Oxford.
6. Fraenkel G. Hsiao C. (1968) *Manifestations of a pupal diapause in two species of flies, Sarcophaga argyrostoma and S. bullata.* J. Insect Physiol. 14, 689-705.
7. Gibbs D. (1976) *The initiator of adult development in Sarcophaga argyrostoma by α-ecdysone.* J. Insect Physiol. 22, 1195-1200.
8. Giebułowicz J. M., Denlinger D. L. (1986) *Role of the brain and ring gland in regulation of pupal diapause in the flesh fly Sarcophaga crassipalpis.* J. Insect Physiol. 32, 161-166.
9. Giebułowicz J. M., Saunders D. S. (1983) *Evidence for the neurohormonal basis of commitment to pupal diapause in larvae of Sarcophaga argyrostoma.* Experientia 39, 194-196.
10. Henrich V. C., Denlinger D. L. (1982) *A maternal effect that eliminates pupal diapause in the progeny of the flesh fly, Sarcophaga bullata.* J. Insect Physiol. 28, 881-884.
11. Horwath K. L., Duman J. G. (1983) *Photoperiodic and thermal regulation of antifreeze protein levels in the beetle, Dendroides canadensis.* J. Insect Physiol. 29, 907-917.
12. Laviale M., Dumortier B. (1990) *Metabolic correlates in the working of an insect putative photoperiodic clock.* J. Comp. Physiol. (w druku).
13. Lewis R. D., Saunders D. S. (1987) *A damped circadian oscillator model of an insect photoperiodic clock. I. Description of the model based on a feedback control system.* J. Theoret. Bilo. 128, 47-59.
14. Lees A. D. (1973) *Photoperiodic time measurement in the aphid Megoura viciae.* J. Insect Physiol. 19, 2279-2316.
15. Nijhout H. F., Williams C. M. (1974) *Control of moulting and metamorphosis in the tobacco hornworm, Manduca sexta (L.): cessation of juvenile hormone secretion as a trigger for pupation.* J. Exp. Biol. 61, 493-501.
16. Pittendrigh C. S. (1966) *The circadian oscillation in Drosophila pseudoobscura pupae: a model for the photoperiodic clock.* Z. Pflanzenphysiol. 54, 275-307.
17. Pittendrigh C. S. (1981) *Circadian organization and the photoperiodic phenomena.* [W] *Biological Clocks in Seasonal Reproductive Cycles,* 1-35, Follett B. K., Follett D. E. (red.), John Wright & Sons Ltd., Bristol.
18. Pittendrigh C. S., Minis D. H. (1964) *The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks.* Am. Nat. 98, 261-294.

19. Pittendrigh C. S., Takamura T. (1987) *Temperature dependence and evolutionary adjustment of critical night lenght in insect photoperiodism.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7169-7173.
20. Pittendrigh C. S., Elliott J., Takamura T. (1984) *The circadian component in photoperiodic induction.* [W] *Photoperiodic Regulation of Insect and Molluscan Hormones.* Ciba Fundation Symposia 104, 41-47.
21. Rihard D. S., Saunders D. S. (1987) *Protoracic gland function in diapause and non-diapause Sarcophaga argyrostoma and Calliphora vicina.* J. Insect Physiol. 33, 385-392.
22. Rihard D. S., Warren J. T., Saunders D. S., Gilbert L. I. (1987) *Haemolymph ecdysteriod titres in diapause- and non-diapause-destined larvae and pupae of Sarcophaga argyrostoma.* J. Insect Physiol. 33, 115-122.
23. Rockey S. J., Miller B. B., Denlinger D. L. (1989) *A diapause maternal effect in the flesh fly, Sarcophaga bullata: transfer of information from mother to progeny.* J. Insect Physiol. 35, 553-558.
24. Saunders D. S. (1975) *"Skeleton" photoperiods and the control of diapause and development in the flesh fly Sarcophaga argyrostoma.* J. Comp. Physiol. 97, 97-112.
25. Saunders D. S. (1978) *An experimental and theoretical analysis of photoperiodic induction in the flesh fly Sarcophaga argyrostoma.* J. Comp. Physiol. 124, 75-95.
26. Saunders D. S. (1980) *Some effects of constant temperature and photoperiod on the diapause response of the flesh fly Sarcophaga argyrostoma.* Physiol. Ent. 5, 191-198.
27. Saunders D. S. (1981) *Insect Photoperiodism: entrainment within the circadian system as a basis for time measurement* [W] *Biological Clocks in Seasonal Reproductive Cycles.* Follett B. K., Follett D. E.(red.), 67-81. John Wright & Sons Ltd., Bristol.
28. Saunders D. S. (1982a) *Insect Clocks.* Wyd.II, Pergamon Press, Oxford.
29. Saunders D. S. (1982b) *Photoperiodic induction of pupal diapause in Sarcophaga argyrostoma: Temperature effects on circadian resonance.* J. Insect Physiol. 28, 305-310.
30. Saunders D. S. (1987) *Maternal influence on the incidence and duration of larval diapause in Calliphora vicina.* Physiol. Ent. 12, 331-338.
31. Saunders D. S., Henrich V. C., Gilbert L. I. (1989) *Induction of diapause in Drosophila melanogaster: photoperiodic regulation and the impact of arrhythmic clock mutans on time measurement.* Proc. Nalt. Acad. Sci. USA 86, 3748-3752.
32. Saunders D. S., Gilbert L. I. (1990) *Regulation of ovarian diapause in the fruit fly Drosophila melanogaster by photoperiod at moderately low temperature.* J. Insect Physiol. (w druku).
33. Saundesr D. S., Lewis R. D. (1987a) *A damped circadian oscillator model of an insect photoperiodic clock. II. Simulations of the shapes of the photoperiodic response curves.* J. Theoret. Biol. 128, 61-71.
34. Saunders D. S., Lewis R. D. (1987b) *A damped circadian oscillator model of an insect photoperiodic clock. III. Circadian and hourglass responses.* J. Theoret. Biol. 128, 73-85.
35. Saunders D. S., Macpherson J. N., Carincross K. (1986) *Maternal and larval effects of photoperiod on larval diapause in the flies Calliphora vicina and Lucilia sericata.* Exp. Biol. 46, 51-58.
36. Saunders D. S., Richard D. S., Applebaum S. W., Ma M., Gilbert L. I. (1990) *Photoperiodic diapause in Drosophila melanogaster involves a block to the juvenile hormone regulation of ovarian maturation.* Gen. Comp. Endocrin. (w druku).
37. Takeda M., Endo Y., Saito H., Nishimura M., Nishitsutsuji-Uwo J. (1985). *Neuropeptide and monoamine immunoreactivity of the circadian pacemaker in Periplaneta.* Biomedical Res. 395-406.
38. Vaz Nunes M., Veerman A. (1982) *Photoperiodic time measurement in the spider mite Tetranychus urticae: a novel concept.* J. Insect Physiol. 28, 1041-1053.

39. Vaz Nunes M., Saunders D. S. (1989) *The effect of larval temperature and photoperiod on the incidence of larval diapause in the blowfly, Calliphora vicina.* Physiol. Ent. 14, 471-474.
40. Vaz Nunes M., Kenny N. A. P., Saunders D. S. (1990) *The photoperiodic clock in the blowfly, Calliphora vicina.* J. Insect Physiol. (w druku).
41. Vinogradova E. B., Zinovjeva K. B. (1972) *Maternal induction of larval diapause in the blowfly, Calliphora vicina.* J. Insect Physiol. 18, 2401-2409.
42. Vivien-Roels E., Pevet P., Beck O., Fevre-Montagne M. (1984) *Identification of melatonin in the compound eyes of an insect, the locust (Locusta migratoria), by radioimmunoassay and gas chromatography-mass spectrometry.* Neurosci. Lett. 49, 153-157.
43. Zdarek J., Denlinger D. L. (1975) *Action of ecdysoids, juvenoids and non-hormonal agents on termination of pupal diapause in the flesh fly.* J. Insect Physiol. 21, 1193-1202.

Tłum. Piotr Mikołajczyk

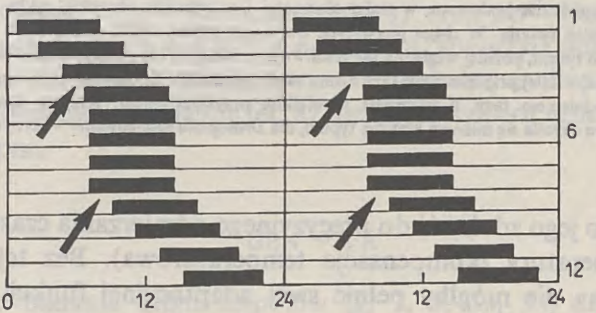
KOSMOS 1991, 40 (1): 93-110

MACIEJ A. PSZCZÓŁKOWSKI
BRONISŁAW CYMBOROWSKI
Zakład Fizjologii Bezkręgowców
Uniwersytet Warszawski

CYTOGENETYCZNE PODŁOŻE ZEGARA BIOLOGICZNEGO

Rytmiczne zmiany obserwowane w zachowaniu się oraz w procesach fizjologicznych wszystkich organizmów są uważane za przejaw funkcjonowania wewnętrznych oscylatorów lub zegarów biologicznych. Oscylatory kontrolujące dobowe, a ściślej okołodobowe (circadialne; circa — około, dies — dzień) rytmy bilogiczne, zostały zlokalizowane w różnych ośrodkach układu nerwowego, takich jak jądro nadskrzyżowanie (*nucleus suprachiasmaticus*) podwzgórza kręgowców, szyszynka ptaków, oko mięczka morskiego *Aplysia*, płaty wzrokowe lub komórki neurosekrecyjne mózgu owadów [13].

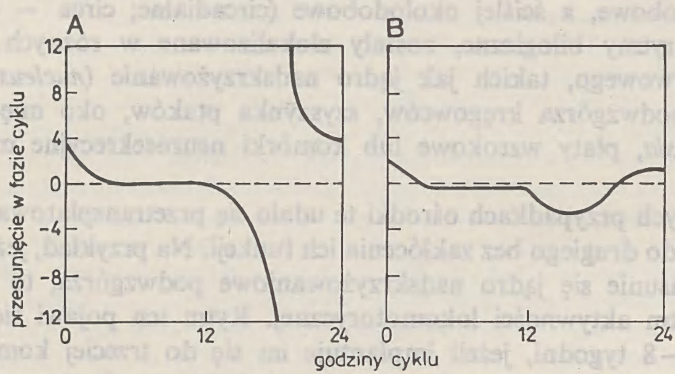
W licznych przypadkach ośrodki te udało się przetransplatować z jednego organizmu do drugiego bez zakłócenia ich funkcji. Na przykład, jeżeli młodym szczurom usunie się jądro nadskrzyżowaniowe podwzgórza, to utracą one dobowy rytm aktywności lokomotorycznej. Rytm ten pojawi się ponownie w ciągu 2—8 tygodni, jeżeli implantuje im się do trzeciej komory mózgu analogiczny ośrodek podwzgórza pobrany od szczurzych noworodków [59]. Transplantację tkanek będących siedliskiem zegara bilogicznego wykonano również u owadów [11, 27].



Rys.1. Hipotetyczny periodogram organizmu posiadającego zdolność synchronizacji do zmiennego fotoperiodu

Zwierzę było trzymane przez trzy pierwsze doby w stałych warunkach świetlnych (np. w stałej ciemności). Czwartego dnia (strzałka) poddano je działaniu fotoperiodu (12 godz. światła i 12 godz. ciemności) i kontynuowano doświadczenie przez następnych 5 dni. Po tym czasie umieszczono z powrotem w ciemności (druga strzałka). Widać rytm spontaniczny — utrzymujący się przez pierwsze trzy doby, następnie wymuszony rytm zgodny z rytmem zmiany oświetlenia oraz powrót do rytmiki spontanicznej po przywróceniu stałych warunków oświetlenia

Bardzo często wystarczy tylko fragment implantowanej tkanki, w której zlokalizowany jest zegar biologiczny, aby w pełni ujawniły się charakterystyczne cechy kontrolowanej przez niego rytmiki. Te cechy to przede wszystkim ujawnianie się rytmiki spontanicznej (free running rhytm) w warunkach środowiska pozbawionego dawcy czasu (Zeitgeber), np. w stałej ciemności lub w stałym świetle. Ujawnienie się rytmu spontanicznego w stałych warunkach środowiska jest jednym z najsilniejszych argumentów przemawiających za prawdziwością twierdzenia, że zegar biologiczny istnieje w organizmie. Stosunkowo łatwo ulega on synchronizacji do rytmicznie zmieniającego się światła i ciemności lub innego, równie silnie działającego, dawcy czasu (rys. 1). Możliwość opóźniania lub przyśpieszenia fazy rytmu biologicznego jest jego bardzo ważną właściwością, umożliwiającą adaptację organizmu do cyklicznie zmieniających się warunków środowiska (rys. 2). Kolejna właściwość zegara



Rys. 2. Dwa przykłady krzywej odpowiedzi fazowej, właściwej dla *Drosophila pseudoobscura* (A) i *Drosophila melanogaster* (B)

Owady były w obu wypadkach hodowane w stałej ciemności i w różnych okresach cyklu poddane działaniu piętnastominutowego pulsu światła. W ciągu pierwszych dwunastu godzin cyklu oba gatunki reagują podobnie; najpierw przyśpieszeniem rytmu, później względną niewrażliwością. Następnie u *Drosophila pseudoobscura* obserwuje się gwałtowne opóźnienie, a dalej przyśpieszenie fazy rytmu okołodobowego. *Drosophila melanogaster* reaguje w tym okresie niewielkim opóźnieniem fazy, a następnie niewielkim przyśpieszeniem. Krzywą charakterystyczną dla *Drosophila pseudoobscura* określa się mianem krzywej typu 0, dla *Drosophila melanogaster* — krzywej typu 1. (wg [50])

biologicznego, to jego zdolność do precyzyjnego odmierzania czasu w szerokim przedziale temperatury (kompensacja temperaturowa). Bez tej właściwości zegar biologiczny nie mógłby pełnić swej adaptacyjnej funkcji (patrz [35]). Stosunkowo mało jeszcze wiemy na temat samego mechanizmu zegara biologicznego. Jednakże badania m.in. w zakresie genetyki i cytologii, szczególnie intensywnie prowadzone w ostatnich latach, dostarczają coraz to nowych, bardzo interesujących danych z tego zakresu. Najistotniejsze z nich omówiono w tym artykule.

POCZĄTKI BADAŃ NAD GENETYKĄ ZEGARA BIOLOGICZNEGO

Historia badań nad genetycznymi uwarunkowaniami zegara biologicznego liczy koło dwudziestu lat. Za jedne z pierwszych prac na ten temat można uznać badania Pittendrigha [48] dotyczące wyizolowania dwóch czystych linii *Drosophila pseudoobscura* różniących się rozmieszczeniem w czasie linień larwalno-poczwarkowych. Niemal jednocześnie [56, 57] zbadano rytm dobowy zużycia tlenu u postaci dorosłych *Drosophila melanogaster*, izolując mutanty tego rytmu i zlokalizowano geny kontrolujące ten proces na chromosomie płci (chromosom X). Wreszcie praca Konopki i Benzera [38] przyniosła kompletny opis ukierunkowanej mutagenezy dotyczący zegara bilogicznego u *Drosophila*.

Autorzy ci, używając matasulfonianu etylu jako mutagenu, otrzymali trzy grupy mutantów różniących się długością okresu rytmu spontanicznej aktywności lokomotorycznej. Do jednej z grup zaliczyli owady o krótszym niż 24 godz. okresie rytmu, do drugiej — o dłuższym. Trzecią grupę stanowiły mutanty arytmiczne (nie mające wyraźnego szczytu aktywności lokomotorycznej). Mutacje te dotyczyły również rytmu linień poczwarkowo-imaginalnych. Wykazali ponadto mendlowski typ dziedziczenia tych cech oraz potwierdzili lokalizację genu odpowiedzialnego za typ rytmiczności na chromosomie X. Co więcej, korzystając z możliwości, jakie daje wybarwianie charakterystycznych prążków chromosomów śliniankowych, zmapowali odpowiedni odcinek chromosomu X, stwierdzając, że gen ów lokuje się między locus *white*, a locus *scute* na tym ramieniu chromosomu X, którego brak u samców. Ponadto podali jego położenie tak dokładnie, jak to było możliwe w owych latach, porównując dużą liczbę chromosomów z deficjencją w obrębie odcinka podejrzanego o kontrolę rytmiczności, a także efekty fenotypowe tych deficencji.

Gen ten nazwano genem *per*, a mutacje w jego obrębie odpowiednio: per^{o} (utrata rytmiczności), per^{S} (skrócenie rytmu) oraz per^{L} (jego wydłużenie). Właśnie ta praca Konopki i Benzera stworzyła podstawy dalszych badań i można uznać ją za przełomową. Na dokładną analizę genu *per* trzeba było jednak poczekać kilkanaście lat, aż metody inżynierii genetycznej stały się ogólnie dostępne.

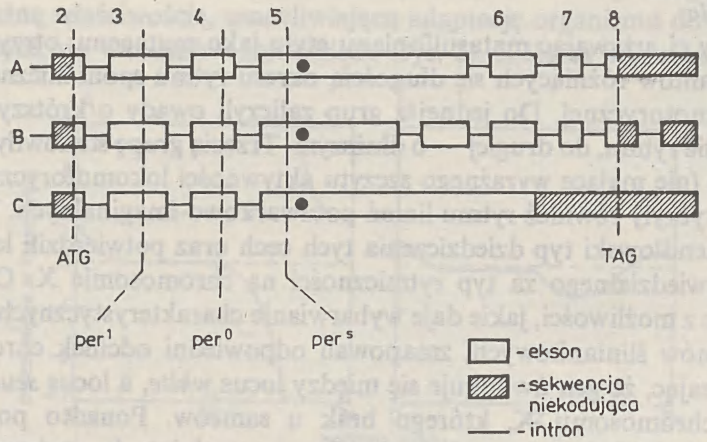
GEN *PER*

Niezależne badania kilku zespołów [2, 3, 9, 33, 53] doprowadziły do dokładnego zaanalizowania genu *per*. (Ze względu na terminologiczną niekonsekwencję autorów wielu publikacji źródłowych, postanowiono użyć terminu „gen *per*" dla określenia odcinka DNA na chromosomie X, którego produkt kontroluje zjawisko o rytmiczności u *Drosophila melanogaster*).

Po pierwsze, odcinek DNA zawierający locus *per* sklonowano, uzyskując wektor zdolny do trnasformacji arytmicznych mutantów *Drosophila* i przy-

wracający im rytm dobowy aktywności lokomotorycznej. Transkrypt tego regionu DNA odpowiada 4.5 kb. Ponadto inne badania [53, 70] wskazują na istnienie jeszcze dwóch transkryptów (3 i 1 kb), które tak jak 4.5 kb nie są znajdowane w materiale pochodzącym od much arytmicznych (per^{O}) oraz z deficjencją genu *per*, natomiast istnieją u muszek owocowych z zachowaną rytmiką.

Po drugie stwierdzono, że transkrypt pierwotny zawiera osiem eksonów i prawdopodobnie podlega on różnej obróbce posttranskrypcynej (splicing) u różnych mutantów [9], choć długość mRNA pochodzącego od różnych mutantów jest podobna.



Rys. 3. Trzy rodzaje cDNA korespondujące z trzema typami mRNA znajdowanymi „w głowach" *Drosophila melanogaster* rasy Canton S

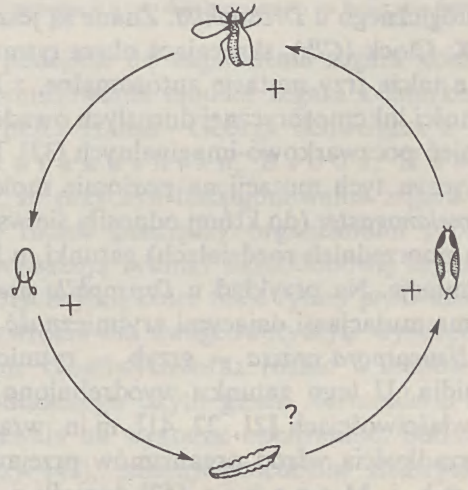
W największej ilości (ok.70%) izolowany jest typ A, dalej B (ok.15%) i C (ok.10%). Muszki arytmiczne — *per*° transformowano za pomocą wektora zawierającego te typy DNA, ale tylko typy A i C przywracały rytmikę mutantom *per*°, przy czym mutanty transformowane typem A wykazywały okres rytmu 24 godz., a typem C — 28,5 godz. *Drosophila melanogaster* o dzikim genotypie zwykle wykazuje okres rytmu 24,5 godz. (wg [9]). Na rysunku zaznaczono lokalizację kodonów inicjującego i terminującego oraz najbardziej popularnych mutacji okresu rytmu. Ciemne kółko zaznacza mniejsze występowanie charakterystycznej powtarzalnej sekwencji kodującej pary aminokwasów tyrozyna—glicyna. Pierszy ekson pominięto

Po trzecie — wszystkie transkrypty odcinka 4.5 kb zawierają charakterystyczną sekwencję kodującą około dwudziestu par aminokwasowych treonina—glicyna w obrębie piątego eksonu, natomiast w ósmym eksonie stwierdzono występowanie kodonu nonsensownego (rys 3). Zanalizowano ponadto przyczyny trzech klasycznych mutacji opisanych przez K o n o p k ę i B e n z e r a [38], tj. mutacji per^{O}, per^{L} oraz per^{S}. Pierwsza powodowana jest mutacją typu *nonsense* w obrębie czwartego eksonu, w drugiej jest to mutacja typu *missense* powodująca kodowanie asparaginy zamiast waliny. W trzecim przypadku kodon seryny zmienia się w kodon asparaginianu. We wszystkich tych przypadkach jest to wynik substytucji jednego tylko nukleotydu (rys. 3).

Ekspresja genu *per*

Analiza regionu DNA zawierającego locus *per* oraz jego sklonowanie i zsekwencjowanie umożliwiły spekulacje na temat charakteru produktu genu *per* [4,33] oraz hybrydyzację metodą N o r t h e r n i hybrydyzację *in situ* [34, 53, 70]. Uważa się, że produkt tego genu to proteoglikan przypominający w wysokim stopniu proteoglikany izolowane z chrząstki szczura [33]. Blisko połowa produktu genowego ma być złożona z treoniny, glicyny, alaniny, proliny i seryny. Spotyka się też sugestie [20], że białko kodowane przez gen *per* zawiera sekwencję, dzięki której może być ono fosforylowane udziałem zależnych od cAMP kinaz białkowych.

Jeśli chodzi o czas i miejsce ekspresji genu *per*, to stwierdzono, [34], że u *Drosophila* gen ten eksprymuje się w tkankach układu nerwowego u embrionów starszych niż 6 godzin, poczwarek i owadów dorosłych, brak jest natomiast ekspresji u larw. U poczwarek i dorosłych postaci *Drosophila* ekspresja zachodzi „na terenie głowy", co pośrednio potwierdza rezultaty wcześniejszych badań [11, 27], w których dokonywano implantacji mózgów pobranych od mutantów per^S do owadów arytmicznych. Te ostatnie uzyskiwały rytm aktywności lokomotorycznej właściwy dawcom mózgów. Natomiast B a r g i e l l o i in. [1] kwestionują hipotezę, według której brak jest ekspresji genu *per* u larw II i III stadium. Dane doświadczalne wskazują, że zachodzi ona, przynajmniej w śliniankach, jednak na wielokrotnie niższym poziomie niż w przypadku poczwarek czy późnych embrionów (rys.4). Brak jest natomiast jekiejkolwiek ekspresji u embrionów wczesnych (0 – 8 godz.).



Rys. 4. Schemat cyklu życiowego *Drosophila melanogaster*
Stadia, w których stwierdzono ekspresję genu *per* oznaczono plusem. Kwestia ekspresji tego genu u larw jest otwarta, co symbolizuje znak zapytania (wg [1, 34])

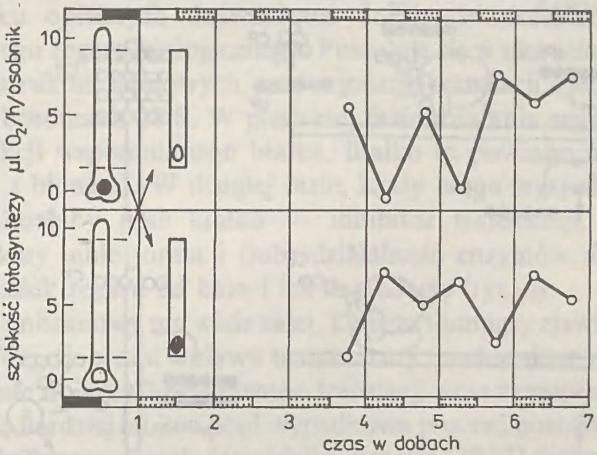
Jest rzeczą godną uwagi, że mutacje w obrębie genu *per* manifestują się nie tylko zmianą rytmu okołodobowego aktywności lokomotorycznej, ale także zmianami rytmu linień poczwarkowo-imaginalnych, a również rytmów ultradialnych (o bardzo krótkich okresach), jak na przykład rytmu pieśni godowej (courtship song) u samców *Drosophila*. Zmiany te mają taki sam charakter we wszystkich tych klasach rytmów, to znaczy mutant per^S ma skrócony nie tylko okres rytmu aktywności lokomotorycznej, ale i rytmu linień larwalno-poczwarkowych oraz rytmu pieśni godowej. Świadczy to o tym, że produkt genu *per* wpływa na podstawowe procesy powstawania i przepływu informacji w organizmie. Interesujące jest również to, że amplifikacja genu *per* [66, 67] może powodować odwrotnie proporcjonalną zmianę długości okresu rytmu (im więcej kopii „dzikiego" genu per^+, tym krótszy okres rytmu). Również Baylies i in. [3] uważają, że poziom mRNA odpowiadającego genowi *per* w tkanakach *Drosophila* jest odwrotnie proporcjonalny do okresu rytmu, w stosunku logarytmicznym. Być może tłumaczy to często obserwowane różnice w charakterze i okresie rytmów okołodobowych pomiędzy samcami i samicami tego samego gatunku — gen *per* znajduje się na nieobecnym u samców ramieniu chromosomu X. Wobec tego diploidalne samce *Drosophila* mogą mieć dwukrotnie mniej DNA kodującego białko zegara niż samice.

INNE MUTACJE ZABURZAJĄCE CZYNNOŚĆ ZEGARA BIOLOGICZNEGO

Mutacje w obrębie genu *per* nie są jedynymi mutacjami mającymi wpływ na działanie zegara bilogicznego u *Drosophila*. Znane są jeszcze dwie, lokujące się na chromosomie X; Clock (*Clk*), skracająca okres rytmu i Andante (*And*) — wydłużająca [26], a także trzy mutacje autosomalne, z których dwie (*psi*) dotyczą rytmu aktywności lokomotorycznej dorosłych owadów, a trzecia (*gate*) jest mutacją rytmu linień poczwarkowo-imaginalnych [32]. Brak jest bliższych danych na temat przyczyn tych mutacji na poziomie molekularnym. Są też i inne niż *Drosophila melanogaster* (do której odnosiły się wszystkie informacje przytoczone w dwóch poprzednich rozdziałach) gatunki, u których obserwuje się takiego rodzaju mutacje. Na przykład u *Drosophila pseudoobscura* mamy do czynienia z pięcioma mutacjami dającymi arytmiczność [49]. Obiecującym organizmem jest też *Neurospora crassa* — grzyb — rytmicznie, co 24 godz., odkładający swe konidia. U tego gatunku wyodrębniono szereg mutantów o bardzo ciekawych właściwościach [21, 22, 41], m.in. wrażliwych na wpływ temperatury, co jest rzadkością wśród organizmów przejawiających rytmiczność. Wreszcie Ralph i Menaker [52] donieśli o znalezieniu u chomika syryjskiego autosomalnej mutacji skracającej okres rytmu okołodobowego o dwie lub cztery godziny, co występuje odpowiednio u zwierząt hetero- i homozygotycznych.

KOMÓRKA JAKO ZEGAR BIOLOGICZNY

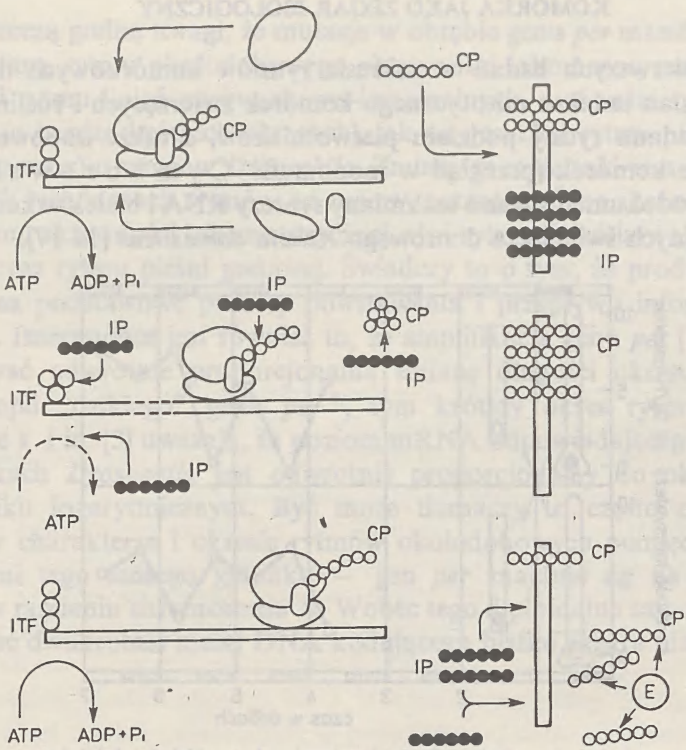
Jedne z pierwszych badań w zakresie rytmów komórkowych dotyczyły dobowych zmian indeksu mitotycznego komórek zwierzęcych i roślinnych [7, 8]. Później badano rytmy podziału pierwotniaków, a także dobowe zmiany morfologiczne komórek (przegląd w monografii Cymborowskiego [13]). Dobrze udokumentowano też zmiany syntezy RNA i białek w komórkach neurosekrecyjnych świerszcza domowego *Acheta domesticus* [14-17].



Rys. 5. Schemat doświadczenia potwierdzającego, że obecność jądra inicjuje typ rytmu

Dwie komórki *Acetabularia* hodowano w dwoch różnych fotoperiodach: 12 godz. światła i 12 godz. ciemności (górna część rysunku) i 12 godz. ciemności i 12 godz. światła (dolna część). Po upływie 1 doby odcięto górną i dolną część plechy obu osobników i wymieniono jądra między nimi (skrzyżowane strzałki), a następnie pozostawiono tak spreparowane komórki w stałej ciemności. Kropkowane pola symbolizują okresy ciemności właściwe dla dawcy plechy. Uzyskane w doświadczeniu komórki glonu podejmują fotosyntezę w rytmie charakterystycznym dla dawcy jądra (wg [63])

Kompleksowe podejście do zagadnienia zegara komórkowego, które doprowadziło do sformułowania modelu zegara komórkowego, zaprezentował zespół kierowany przez Hansa—Georga Schweigera z RFN (m.in. Mergenhagen, Karakashian, Broda, Hartwig). Badacze ci wyszli z założenia, że przyczyn funkcjonowania zegara biologicznego należy szukać w obrębie różnic pomiędzy organizmami prokariotycznymi, które w większości nie wykazują rytmiki okołodobowej czynności życiowych, a organizmami eukariotycznymi, które takie rytmy przeważnie mają. Podstawowe różnice, na które zwrócili oni uwagę, dotyczyły wyodrębnienia jądra, stopnia rozwinięcia struktur błonowych oraz różnic w budowie rybosomów. Jako organizmu doświadczalnego użyto glonu *Acetabularia mediteranea*, którego duża komórka pozwala na wygodne operowanie. Badano m.in. efektywność procesu fotosyntezy [42], zmiany potencjału elektrycznego [6] i migracje chloroplastów [5]. W wyniku wielu doświadczeń ustalono, że po pierwsze, procesy zachodzące w rytmie okołodobowym mogą utrzymywać się w odizolowanych od jądra fragmentach komórki, a także wtedy, gdy komórkę pozbawi



Rys. 6. Model membranowy zegara biologicznego

Etap I. (górna część rysunku). Przy udziale rybosomów 80 S następuje biosynteza białka zegara (CP). Białko to transportowane jest do bliżej nie sprecyzowanych struktur błonowych i tam wbudowywane. Proces przebiega przy udziale wielu czynników inicjacji translacji (ITF) oraz hydrolizie GTP i ATP. Zaznaczono tylko hydrolizę ATP ze względu na to, że zachodzi tylko u *Eucaryota*. Wbudowywaniu białka zegara do struktur błonowych towarzyszy uwalnianie z nich białka-inhibitora (IP). **Etap II.** (środkowa część rysunku). Białko-inhibitor (bezpośrednio lub poprzez mediatory) albo przerywa translację białka zegara, albo modyfikuje białko zegara tak, że to ostatnie traci swe cechy i nie wbudowuje się do błon. Translacja białka zegara może być przerwana na etapie inicjacji lub elongacji. **Etap III.** (dolna część rysunku). Struktury błonowe zostają wysycone białkiem zegara i gwałtownie uwalniają je. Białko-inhibitor może znów wbudować się do błony, co umożliwia ponowną biosyntezę białka zegara. Wcześniej uwolnione z błon białko zegara zostaje rozłożone przez enzym (E). Cały cykl ma trwać tak długo, jak okres rytmu, a „ruchem wskazówki zegara" ma być sam fakt uwolnienia białka zegara z błon lub pojawienie się produktów jego rozkładu (częściowo wg [61])

się jądra [36, 43, 44]. Jednak, jeśli będzie się hodować dwie komórki *Acetabularia* w dwóch różnych fotoperiodach, a następnie wymieni się pomiędzy nimi jądra, to uzyskane w ten sposób komórki wykażą rytmikę dobową procesów życiowych charakterystyczną dla dawcy jądra [62]. Stąd wniosek, że obecność jądra inicjuje typ rytmu, ale nie jest niezbędna, aby rytm ten się utrzymał (rys.5). Po drugie, podanie komórce inhibitorów transkrypcji rifampicyny oraz inhibitorów translacji — chloramfenikolu nie wpływa na charakter rytmu dobowego. Rifampicyna i chloramfenikol hamują jednak prokariotyczny typ

transkrypcji i tranlacji. Inhibitory translacji typu eukariotycznego — cykloheksymid i anisomycyna znoszą rytmikę dobową procesów metabolicznych u *Acetabularia*, przy czym komórka glonu jest wrażliwa na działanie cykloheksymidu tylko w pewnych okresach doby, co wskazuje na nieciągłą produkcję białka zaangażowanego w proces rytmiki dobowej. Pozbawienie komórki jądra i podanie cylkoheksymidu powoduje zanik rytmu fotosyntezy, który może być przywrócony po unieczynnieniu inhibitora. Świadczy to o zaangażowaniu błon komórkowych (np. retikulum endoplazmtycznego) w mechanizm funcjonowania zegara.

W wyniku opisanych doświadczeń doszło do skonstruowania modelu membranowego zegara biologicznego. Postuluje się w nim inicjującą rolę jądra, istotną rolę struktur błonowych oraz regulację translacji specyficznego białka zegara na rybosomach 80 S. W pierwszej fazie działania zegara dochodziłoby tu do produkcji wspomnianego białka. Białko to powinno mieć zdolność do wiązania się z błonami. W drugiej fazie, kiedy błona wysyciłaby się białkiem zegara, uwalniałaby inne białko — inhibitor translakcji. Spadek stopnia nasycenia błony inhibitorem i (lub) działalność enzymów mają powodować odłączenie białek zegara od błon i ich degradację (rys. 6).

Model membranowy ma wiele zalet. Dobrze tłumaczy zjawisko kompensacji temperaturowej, tj. braku wpływu temperatury na charakter rytmu i to w dość dużym zakresie zmian. Chociaż tempo translacji wraz z temperaturą wzrasta, to blony stają się bardziej labilne, stąd wypadkowa procesu pozostaje nie zmieniona. Ponadto znaleziono u *Acetabularia* białko o masie 230 kD, które jest produkowane cyklicznie, w rytmie odpowiadającym rytmowi procesów metabolicznych [29]. Produkcja tego białka utrzymywana jest także po usunięciu jądra z komórki i jest wrażliwa na podanie cykloheksymidu w krótkich, charakterystycznych okresach rytmu dobowego, tak jak i wspomniane procesy metaboliczne, np. produkcja tlenu. Pytanie, na jakim etapie translacji działa takie białko, pozostaje na razie bez odpowiedzi. Warto w każdym razie zwrócić uwagę na jeden z czynników inicjujących translacje u *Eucaryota*. Jest nim katalizator hydrolizy ATP — białko o masie 80 kD. Być może postulowany inhibitor wpływa na funkcjonowanie właśnie tego białka, zwłaszcza że jego obecność i udział ATP w procesie inicjacji translacji jest istotną różnicą pomiędzy *Procaryota* i *Eucaryota*. Na rolę ATP w zjawisku zegara biologicznego u *Neurospora crassa* zwrócili uwagę S h u l z i in. [60], wykazując analogiczne działanie inhibitorów ATP — i cykloheksymidu.

Co jest białkiem zegara — nie wiadomo. Wspomniany w poprzednim rozdziale 4.5 kb fragment DNA wykazuje wysoki stopień homologii z fragmentami genomu kury, myszy i człowieka [64], a także grzyba *Neurospora crassa* [47]. S c h w e i g e r [61] podaje, że sekwencje takie znaleziono w genomie szpinaku, rzepaku i u *Acetabularia*. W tym ostatnim przypadku nie na terenie jądra, lecz w genomie plastydów. Fakt ten niezbyt dobrze zgadza się z postulowanym modelem zegara i co gorsza występuje w przypadku organizmu, który posłużył jako źródło danych eksperymentalnych właśnie dla tego modelu. Trudno jest przypuszczać, że białko 230 kD jest kodowane przez gen *per*.

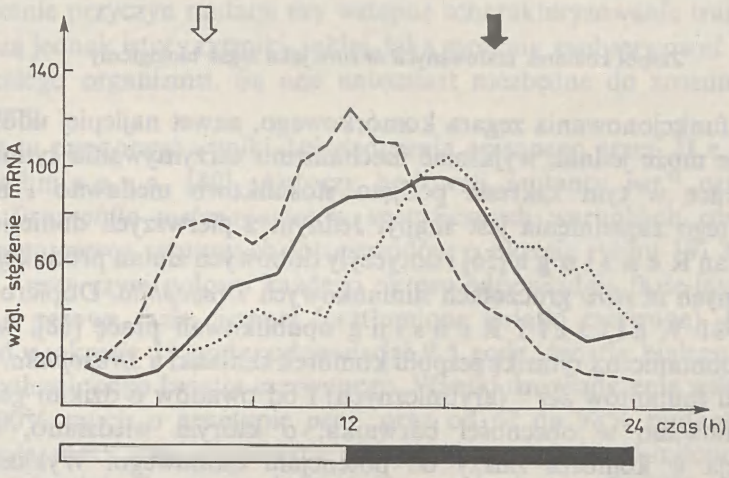
Funkcjonowanie pewnych elementów membranowego modelu zegara biologicznego u owadów jest natomiast bardzo dobrze poparte doświadczalnie.

Momentem kluczowym w procesie powstawania rytmu okołodobowego jest między innymi synteza mRNA i dlatego powinniśmy spodziewać się okołodobowej oscylacji stężenia mRNA w komórkach tych tkanek, które uważane są za oscylatory rytmu okołodobowego. Zmiany takie dotyczące RNA w komórkach neurosekrecyjnych *pars intercerebralis* mózgu świerszcza domowego (*Acheta domesticus*) zostały opisane już w roku 1969 przez Cymbrowskiego i Dutkowskiego [15]. Zaobserwowano je także w zwoju podprzełykowym [15]. Ci sami autorzy opisali również dobowe zmiany syntezy białek we wspomnianych komórkach [17]. Szczyt syntezy RNA obserwuje się u świerszcza na początku fazy jasnej fotoperiodu. Wyprzedza on syntezę białek o ok. 6 godzin. Najprawdopodobniej mamy tu do czynienia zarówno z mRNA, jak i białkiem zegara biologicznego. Świadczą o tym wyniki transplantacji tkanek — oscylatorów zegara bilogicznego u świerszcza. Cymbrowski [11] przeszczepiał mózgi zawierające nietknięte komórki naurosekrecyjne *pars intercerebralis* pochodzące od dawców rytmicznych — biorcom nierytmicznym. W doświadczeniach kontrolnych transplantowano mózgi pozbawione wspomnianych komórek naurosekrecyjnych. Wyniki pracy wskazują, że komórki neurosekrecyjne *pars intercerebralis* są rzeczywiście oscylatorem rytmu aktywności lokomotorycznej u świerszcza, bowiem ich implantacja do nierytmicznego biorcy wymusza u niego rytmikę dobową w warunkach stałej ciemności, i to o okresie rytmu charakterystycznym dla dawcy tych komórek.

Warto też zwrócić uwagę na dwie niedawno opublikowane prace dotyczące dobowych zmian stężenia mRNA u *Drosophila malenogaster*. Jedna z nich [53] dotyczy (m.in.) dobowych oscylacji mRNA, który odpowiada nie genowi *per*, lecz innemu (jak się okazuje sąsiedniemu) odcinkowi DNA. Zatem próby transformowania arytmicznych muszek wspomnianym odcinkiem DNA nie mogły przywrócić (i nie przywracały) rytmu aktywności lokomotorycznej. Ostatnio współautorzy wymienionej pracy [53] opublikowali wyniki swych badań [40], w których przypisują owemu, nie nazwanemu dotąd genowi, kodującemu transkrypt 0.9 kb, istotną rolę w procesie linienia poczwarkowo-imaginalnego. Transkrypt 0.9 kb znajdowany jest w epidermie kapsułki głowowej, tułowia i odwłoka dorosłych samic *Drosophila melanogaster* i — jak się wydaje — jego stężenie związane jest z początkiem jasnej fazy fotoperiodu. Wzajemne związki funkcjonalne wspomnianego genu i genu *per* są nadal niejasne. Dlatego ważnym dla chronobiologii odkryciem było stwierdzenie dobowych zmian poziomu mRNA odpowiadającego genowi *per* w „tkankach głowy" muszki owocowej [28]. Autorzy (rys. 7) postulują także istnienie sprzężenia zwrotnego pomiędzy stężeniem mRNA a stężeniem biosyntetyzowanego na nim białka. Wyniki te dobrze korespondują z danymi dotyczącymi czasowej i przestrzennej dystrybucji białka kodowanego przez gen *per* [65]

i przemawiają za słusznością koncepcji membranowego modelu zegara biologicznego.

Postuluje się udział innych czynników w regulacji zegara komórkowego. Niebagatelną rolę mogą tu grać jony wapnia i procesy związane z ich dystrybucją w komórce. Na przykład Earnest i Sladek [19]



Rys. 7. Relatywne, dobowe zmiany stężenia mRNA, odpowiadającego genowi *per*, w tkankach głowy *Drosophila melanogaster*. Linia ciągła reprezentuje zmiany mRNA u szczepu dzikiego rasy Canton-S, linia przerywana — mutanta per^S, linia kropkowana — mutanta per^L.

Za 100% przyjęto maksymalny poziom mRNA u dzikich muszek owocowych. Wyniki wg [28] przeliczono i przdstawiono jako średnie wędrujące. Ciemna strzałka wskazuje okres najsilniejszego wiązania przeciwciał skierowanych przeciwko białku kodowanemu pryey gen *per*, jasna — okres najsłabszego wiązania tych przeciwciał we wspomnianych tkankach [65]. Muszki były eksponowane przez 3 dni na działanie fotoperiodu LD 12:12, czwartego dnia pobierano tkanki w celu ekstrakcji RNA, w dalszym ciągu utrzymując muszki w warunkach LD 12:12, co symbolizowane jest biało-czarnym prostokątem umieszczonym pod wykresem. W momencie pobrania tkanki owady miały od 6 do 8 dni. Przy zachowaniu podobnej procedury stwierdzono, że cykliczne zmiany mRNA odpowiadającego genowi *per* mogą utrzymać się przez co najmniej 3 doby po przeniesieniu muszek w warunki stałej ciemności. Oscylacji dobowych stężenia wspomnianego mRNA nie obserwuje się u mutantów per^o, stwierdzono je natomiast u muszek arytmicznych, transformowanych DNA zawierających gen *per* (wg [28, 65 zmien.])

opisują, zależny od stężenia jonów wapnia, okołodobowy rytm uwalniania wazopresyny *in vitro* z jąder nadskrzyżowaniowych podwzgórza szczura. Są też doniesienia o cyklicznych zmianach stężenia wolnych jonów wapnia w cytozolu komórek hodowanych *in vitro* [69]. Te cykliczne zmiany, zachodzące w komórkach nabłonka jelita (linia komórkowa I-407), skorelowane są z cyklicznymi zmianami potencjału blonowego. Autorzy wspomnianego doniesienia są ponadto zdania, że to „aktywność mitochondriów" jest odpowiedzialna za cykliczne uwalnianie jonów wapnia z różnych struktur komórkowych. Oczywiście zwraca się też uwagę na białka wiążące wapń, m.in. na kalmodulinę. Nakashima [45] opisał efekt antagonistów kalmoduliny na rytm odkładania konidów u *Neurospora crassa*. Podanie niektórych antagonistów zmienia fazę rytmu, ale poziom kalmoduliny wydaje się niezmienny w ciągu doby. Dlatego sądzi on,

że wrażliwość na antagonistów kalmoduliny jest wynikiem zmian w poziomie syntezy białek wiążących kalmodulinę. Goto i in. [25] nadają nawet kluczową rolę kalmodulinie oraz zjawisku cyklicznego transportu mitochondrialnego wapnia u *Euglena*, uważając, że może być to element regulacyjny zegara biologicznego u tego pierwotniaka.

Zespół komórek hodowanych *in vitro* jako zegar biologiczny

Model funkcjonowania zegara komórkowego, nawet najlepiej udokumentowany, nie może jednak wyjaśniać mechanizmu utrzymywania rytmu przez tkankę. Prace w tym zakresie podjęto stosunkowo niedawno i materiał dotyczący tego zagadnienia jest skąpy. Jednym z pierwszych doniesień były wyniki badań Rensinga [56] i dotyczyły dobowych zmian produkcji białek w hodowanych *in vitro* gruczołach śliniankowych *Drosophila*. Dopiero jednak w roku 1981 Weitzel i Rensing opublikowali pracę [68], w której wykazali spontaniczną rytmikę zespołu komórek ślinianki u *Drosophila*. Tkanki pobrano od mutantów per^{o} (arytmicznych) i od owadów o dzikim genotypie oraz inkubowano w obecności barwnika, o którym wiedziano, że jego koncentracja w komórce zależy od potencjału błonowego. Wykazano, że charakter tego potencjału zmienia się w cyklu dobowym. Podobną metodyką posłużyli się Bargiello i in. [1] badając mutanty *Drosophila* per^{s} (skrócony okres rytmu), per^{o}, per^{+} (genotyp dziki), oraz per^{-} (delecja genu). Są oni zdania, że w śliniankach różnych mutantów obserwuje się różną zdolność przewodzenia przez synapsy elektryczne. Najgorzej mają przewodzić synapsy mutanta per^{o}, lepiej — per^{+}, najlepiej — per^{s}. Różnice przewodności są jak 100:10:1 i wydaje się, że przewodność właściwa (wyrażona w mikrosimensach na jednostkę długości) też wykazuje znaczne różnice. Jeśli wyniki te uzyskają potwierdzenie w dalszych badaniach, to teoria rytmów biologicznych zyska zupełnie nową jakość, bowiem można by wtedy zastosować do rozważań teoretycznych klasyczne modele wytwarzania informacji pozycyjnej; na pewno model Goodwina i Cohena [24], a może i inne. Aby opisać funkcjonowanie tkanki w kategoriach tych modeli, trzeba jeszcze wielu badań. Poza tym wyjaśnienie mechanizmu działania zegara bilogicznego na poziomie izolowanej tkanki czy organu może dać tylko pojęcie o potencjalnych możliwościach tych struktur. W każdym razie warto jest prowadzić takie poszukiwania, gdyż mogą one tłumaczyć pewne zjawiska morfogenezy. Mogą również dać wyobrażenie o tym, jak w obrębie fragmentu tkanki może dochodzić do wytworzenia lokalnych oscylatorów, czy do sytuacji, w której cały fragment staje się jednym oscylatorem wykazującym rytmikę rozmaitych procesów.

PERSPEKTYWY BADAŃ

Trzeba powiedzieć, że obserwowany w ostatnich latach rozwój badań nad genetycznymi i cytologicznymi aspektami rytmów bilogicznych przyniósł rezultaty otwierające przed chronobiologią nowe, szerokie perspektywy. Takie osiągnięcia, jak zlokalizowanie i sklonowanie genu *per*, zsekwencjonowanie go, zanalizowanie przyczyn mutacji czy wstępne scharakteryzowanie transkryptu, nie tłumczą jednak istoty rytmiki, takiej, jaką możemy zaobserwować — to jest rytmiki całego organizmu. Są one natomiast niezbędne do zrozumienia jej machanizmu.

Warto tu przytoczyć wyniki doświadczenia opisanego przez Helfrich i Engelmanna [30]. Autorzy hodowali mutanty per^{o} oraz dzikie osobniki *Drosophila melanogaster* w specyficznych warunkach oświetlenia. Zastosowano szereg sztucznych fotoperiodów o okresie rytmu 19, 22, 24, 26 i 27 godz., przy czym połowa każdego okresu odpowiadała fazie jasnej (białe światło), a połowa fazie ciemnej (prztłumione światło czerwone). I tak np. fotoperiod o okresie 19 godz. odpowiadał 9,5 godz. światła białego oraz 9,5 godz. przytłumionego światła czerwonego. Wyniki doświadczenia wskazują, że niemal 100% much o genetypie per^{+} oraz od 62 do 98% mutantów per^{o} dostosowuje okres swej aktywności lokomotorycznej do określonego fotoperiodu. Również Dowse i in. [18] są zdania, że 50-70% mutantów arytmicznych wykazuje różnego rodzaju rytmikę o okresie od 4 do 22 godz.

Ostatnio ukazały się publikacje wnoszące dodatkowe dane istotne dla właściwego rozumienia chronobiologii arytmicznych mutantów per^{o} u *Drosophila melanogester*.

W pierwszej pracy Forster [23] twierdzi, że zarówno u mutantów per^{o}, jak i u dzikich muszek owocowych z izolowanymi chirurgicznie płatami wzrokowymi, można zaobserwować istnienie dwóch nakładających się na siebie rytmów, jednego o okresie 22 i drugiego — 25 godzin. Podobne zjawisko obserwowane jest u *Musca domestica*, po wyżej wspomnianej operacji [31]. Autorka wysuwa przypuszczenie, że rytmika dobowa wymienionych gatunków jest wynikiem działania dwóch populacji oscylatorów; jednej o okresie 16-26 godzin, drugiej — 21-36 godzin. Obie populacje są funkcjonalnie sprzęgane ze sobą w bliżej nieznany sposób, dając w efekcie rytmikę obserwowaną u dzikich osobników *Drosophila*. U operowanych jak wyżej much, muszek owocowych oraz u mutantów per^{o} ów proces sprzęgania ma być zaburzony, co przejawia się pozorną utratą rytmiki, która w rzeczywistości jest świadectwem działalności dwóch populacji oscylatorów. Hipoteza ta wymaga jednak dalszych intensywnych badań w celu jej ewentualnego potwierdzenia.

Drugim interesującym faktem jest wynik badań Saundersa i in. [58] nad diapauzą imaginalną u *Drosophila melanogaster*. U tego owada procent diapauzujących postaci dorosłych zależy od fotoperiodu, w którym są one hodowane. Dla rasy *Canton-S* najniższy odsetek muszek diapauzujących (ok.

10%) występuje przy 16 godzinach światła oraz w ciągłej ciemności. Natomiast w przypadku mutantów *per* ^{01}, *per* ^{02}, *per* ^{03} oraz mutanta o podwójnej delecji genu *per* fotoperiodem krytycznym jest 12:12, w którym trzy z wymienionych mutantów nie diapauzują w ogóle. Co ciekawe, ogólny charakter krzywych odpowiedzi fotoperiodycznej (photoperiodic response curve) jest bardzo podobny zarówno u wymienionych mutantów, jak i dzikich *Drosophila*. Dotychczs postulowano (porównaj [12, 46], równorzedną rolę zegara biologicznego oraz swoistego „licznika" okresów światła w powstawaniu i utrzymywaniu się zjawiska diapauzy. Teraz wydaje się, że rola rytmiki dobowej może być w tym wypadku mniejsza niż sądzono.

Wyniki przytoczonych badań przemawiają za tym, że w aspekcie chronobiologicznym organizm należy traktować jako całość. Być może w obszar owej „całości" należy włączyć również jego otoczenie.

Na podkreślenie zasługuje również fakt dużego ograniczenia ekspresji genu *per* u larw i wczesnych embrionów *Drosophila*. Zastanawia tu fizjologia owadów, zwłaszcza dlatego, że rytmiczność rozwoju stadiów larwalnych muchówek jest znana (m.in. [55, 51]). Co zatem jest oscylatorem u larw, przy pomocy jakich nośników jest tu zakodowana informacja o rytmie, czy w ogóle można przyrównać rytmikę rozwoju larwy do rytmów aktywności lokomotorycznej postaci dorosłych — oto pytania, na które należy koniecznie odpowiedzieć. Znajomość istoty tych procesów pozwoliłaby głębiej opisać zjawiska metamorfozy. Warto również zająć się bliżej komórkami prapłciowymi, które wyodrębniają się (u *Drosophila virilis*) już w kilkanaście minut po rozpoczęciu bruzdkowania [37]. Czy nie stanowią one przypadkiem pierwszego, jakby macierzystego oscylatora, kordynującego działalność tych, które pojawiają się później? Pomocne w tych poszukiwaniach może być użycie przeciwciał skierowanych przeciwko produktowi genu *per* (patrz [65]).

Należy także zwrócić uwagę na możliwe związki pomiędzy zabużeniami zegara biologicznego a plagą XX wieku — rakiem. W wielu krajach coraz częściej prezentuje się pogląd, że nieunormowany lub sprzeczny z wrodzonym tryb pracy, snu i odpoczynku może powodować poważne zaburzenia układu odpornościowego organizmu. U owadów nowotwory należą do rzdkich schorzeń. Brak też jednoznacznych dowodów na to, by zaburzenia rytmu dobowego powodowały u owadów zmiany typu nowotworów. Są jednak przesłanki wystarczające do tego, aby takiej możliwości nie wykluczać. Cymborowski [10] opisał zjawisko powstawania guzów jelitowych u świerszczy *Acheta domesticus* hodowanych w stałym świetle od wyklucia z jaja do osiągnięcia dojrzałości płciowej. Guzy te, powstające w obrębie nabłonka jelita, były znajdowane 3,5 raza częściej u owadow hodowanych w stałym oświetleniu niż w grupie kontrolnej. Oczywiście należałoby przeprowadzić dodatkowe badania w tym zakresie.

Kolejnym perspektywicznym kierunkiem badań wydają się poszukiwania bazujące na różnicach między *Procaryota* i *Eucaryota*. Mogą one zwrócić uwagę

na miejsce rytmów biologicznych w procesie ewolucji oraz zagadnienia symbiozy czy też organizacji populacji w aspekcie ewolucyjnym.

Wreszcie godne podkreślenia są również perspektywy, które może stworzyć komputerowe modelowanie funkcjonowania tkanki z wykorzystaniem teorii informacji pozycyjnej oraz teorii oscylacji.

Niewątpliwie w przypadku zegara biologicznego mamy do czynienia z procesem porządkowania informacji. Rozważając ten problem teoretycznie (porównaj [39]) można powiedzieć, że formę biologiczną cechuje, oprócz przepływu materii i energii, stabilny stan „daleko od równowagi". Stan ten zależy m.in. od parametrów wewnętrznych formy, zaś jej dynamiczna struktura jest kształtowana przez powiązania między elementami oraz pewne relacje komunikacyjne. Ten teoretyczny opis, będący w zgodzie z przytoczonymi danymi doświadczalnymi, dostarcza nam jeszcze jednego argumentu, że w fizjologii najciekawsze zjawiska zachodzą na pograniczu struktur.

LITERATURA

1. Bargiello T. A., Saez L., Baylies M. K., Gasic G., Young M. W., Spray D. C. (1987) *The Drosophila clock gene per affects intercellular junctional communication*. Nature 28, 686-691.
2. Bargiello T. A., Jackson F. R., Young M. W., (1984) *Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in Drosophila*. Nature 312, 752-754.
3. Baylies M. K., Bargiello T. A., Jackson F. R., Young M. W. (1987) *Changes in abundance or structure of the per gene product can alter periodicity of the Drosophila clock*. Nature 326, 390-392.
4. Burdon M. A., Oldberg M., Piershbacker M., Rouslahti E. (1985) *Molecular cloning and sequence analysis of a chondroittin sulfate proteoglycan cDNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1321-1325.
5. Broda H., Schweiger G., Koop H-U., Schmid R., Schweiger H. G. (1979) *Chloroplast migration: A method for continuosly monitoring a circadian rhythm in a single cell of Acetabularia*. [W] *Developmental Biology of Acetabularia*, S. Bonoto, V. Kefeli, Puiseux-Dao (red.), Elsevier, North Holand, Amsterdam, 1163-1167.
6. Broda H., Schweiger H. H. (1981) *Long-term measurement of endogenous diurnal oscillations of the electrical potential in an individual Acetabularia cell*. Env. J. Cell Biol. 26, 1-4.
7. Bullough W. S. (1949) *Mitotic activity in the adult mouse, Mus musculus L.* Proc. Roy. Soc. B. 135, 212-233.
8. Bunning E. (1963) *Die Physiologishe Uhr*, Berlin – Gottingen – Heidelberg, Springer.
9. Citri Y., Colot H. V., Jacquier A. C., Qiang Y. V., Hall J. C., Baltimore D., Rosbash M. (1987) *A family of unusually spliced biologically active transcripts encoded by a Drosophila clock gene*. Nature 326, 42-47.
10. Cymborowski B. (1974) *Powstawanie guzów jelitowych u owadów jako wynik zaburzeń rytmiki dobowej*. Symp. „Chronobiologia".
11. Cymborowski B. (1981) *Transplantation of circadian peacemaker in the house cricket, Acheta domesticus*. J. Interdiscipl. Cycle Res. 12, 133-140.
12. Cymborowski B. (1984) *Endokrynologia owadów*. PWN, Warszawa.
13. Cymborowski B. (1987) *Zegary biologiczne*. PWN, Warszawa.

14. Cymborowski B., Dutkowski A. (1968) *RNA synthesis in the neurosecretory cells of the brain and in the suboesophageal ganglion of the house cricket (Acheta domesticus L.) Orthoptera: Gryllidae*. Bull. Acad. Pol. Sci. Cl. II 16, 497-499.
15. Cymborowski B., Dutkowski A. (1969) *Circadian changes in RNA synthesis in the neurosecretory cells of the brain and the suboesophageal ganglion of the house cricket*. J. Insecet Physiol. 15, 1187-1197.
16. Cymborowski B., Dutkowski A. (1970a) *Sex differences in locomotor activity and RNA synthesis in central nervous system of Acheta domesticus L. during the circadian rhythm*. Z. Vergl. Physiologie 70, 29-34.
17. Cymborowski B., Dutkowski A. (1970b) *Circadian changes in protein synthesis in the neurosecretory cells of the central nervous system of Acheta domesticus*. J. Insect Physiol. 16, 341-348.
18. Dowse H. B., Hall J. C., Ringo J. M. (1987) *Circadian and ultradian rhythms in period mutants of Drosophila melanogaster*. Behav. Genet. 17, 19-35.
19. Earnest D. j., Sladek C. D. (1986) *Mechenisms underlying the acute and circadian release of vasopressin from perfused rat suprachiasmatic explants in vitro*. Soc. Neurosci. Abst. 12, 845 (No.233.11).
20. Edmunds L. N. Jr. (1988) *Cellular and Molecular Basis of Biological Clocks*. Springer-Verlag, New York and Heidelberg.
21. Feldman J. F. (1985) *Genetic and physiological analysis of a circadian clock gene in Neurospora crassa*. [W] *Temporal Order* Rensing L., Jaeger N. I., (red.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 238-245.
22. Feldman J. F., Dunlap R. (1985) *Neurospora crassa: a unique system for studying circadian rhythms*. Photochem. Photobiol. Rev. 7, 319-368.
23. Forster C. (1989) *The circadian systems of flies — a model to explain different locomotor activity patterns*. Journal of Interdisciplinary Cycle Research. Vol 20, No 3, p. 184-185.
24. Goodwin B. C., Cohen M. H. (1969) *A phase shift model for the spatial and temporal organization of developing systems*. J. Theoret. Biol. 25, 49-107.
25. Goto K., Laval-Martin D. L., Edmunds L. N. Jr. (1985) *Biochemical modeling of an autonomously oscillatory circadian clock in Euglena*. Science 228, 1284-1288.
26. Hall J. C., Roshbash M. (1987) *Gens and biological rhythms*. Trends in Genetics 3, 185-191.
27. Handler A. M., Konopka R. J. (1979) *Transplantation of a circadian pacemaker in Drosophila*. Nature 279, 236-238.
28. Hardin P. E., Hall J. C., Rosbash M. (1990) *Feedback of the Drosophila period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels*. Nature 343, 536-540.
29. Hartwig R., Schweiger R., Schweiger H. G. (1985) *Identification of a high molecular weight polypeptide that may be part of the circadian clockwork in Acetabularia*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6899-6902.
30. Helfrich Ch., Engelmann W. (1987) *Evidences for Circadian Rhytmicity in the per*° mutant of *Drosophila melanogaster*. Z. Naturforsch. 42 c.
31. Helfrich Ch., Cymborowski B., Engelmann W. (1987) *Circadian activity rhythm of the house fly continues after optic tract severance and lobectomy*. Chronobiology International Vol.2, No.1, 19-32.
32. Jackson F.R. (1983) *The isolation of biological rhythm mutations on the autosomes of Drosophila melanogaster*. Neurogenet. 1, 3-15.
33. Jackson F. R., Bargiello T. A., Yun S-H., Young M. W. (1986) *Product of per locus of Drosophila shares homology with proteoglycans*. Nature 320, 185-188.
34. James A. A., Ewer J., Reddy P., Hall J. C., Rosbash M. (1986) *Embryonic expression of the period clock gens in the central nervous system of Drosophila melanogaster*. EMBO J. 5, 2313-2320.

35. Johnson C. H., Hastings J. W. (1986) *The elusive mechanism of the circadian clock.* Am. Sci. 74, 29-36.
36. Karakashian M. W., Schweiger H-G. (1976) *Circadian properties of the rhytmic system in individual nucleated and enucleated cells of Acetabularia mediteranea.* Exp. Cell Res. 97, 366-377.
37. Klag J. (1988) *Powstawanie komórek prapłciowych.* [W]: *Biologia rozwoju owadów.* Cz. Jura (red.) PWN, Warszawa.
38. Konopka R. J., Benzer S. (1971) *Clock mutants of Drosophila melanogaster.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2112-2116.
39. Kowalczyk E. (1981) *O istocie informacji.* WKiŁ, Warszawa.
40. Lorenz L. J., Hall J. C., Rosbash M. (1989) *Expression of a Drosophila mRNA is under circadian clock control during pupation.* Development 107, 869-880.
41. Loros J. J., Feldman J. F. (1986) *Loss of temperature compensation of circadian period lenght in the fry-9 mutant of Neurospora crassa.* J. Biol. Rhytms 1, 167-198.
42. Mergenhagen I., Schweiger H-G. (1973) *Recording the oxygen production of a single Acetabularia cell for a prolonged period.* Exp. Cell Res. 81, 360-364.
43. Mergenhagen I., Schweiger H-G. (1975a) *Circadian rhythm of oxygen evolution in cell fragments of Acetabularia mediteranea.* Exp. Cell Res. 92, 127-130.
44. Mergenhagen I., Schweiger H-G. (1975b) *The effect of different inhibitors of transcription and translation on the expresion and control of circadian rhythm in individual cells of Acetabularia.* Exp. Cell Res. 94, 321-326.
45. Nakashima H. (1986) *Phase shifting of the circadian conidiation rhythm in Neurospora crassa by calmodulin antagonists.* J. Biol. Rhythms 1, 163-169.
46. Page T. L. (1985) *Clocks and Circadian Rhythms.* [W] *Comprehansive insect physiology, biochemistry and pharmacology.* Vol. 6, p.577-644. G. A. Kerkut, L. I. Gilbert (red.). Pergamon Press. Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt.
47. Parker E., O'Donnel C., Levy R., Feldman J. (1986) *Sequence homology between a Drosophila clock gene and Neurospora DNA.* Abstract of 13th *Neurospora* Information Conference, April 6-9, Columbia, S. L.
48. Pittendrigh C. S. (1967) *Circadian systems: I. The driving oscillation and its asay in Drosophila pseudoobscura.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 1762-1767.
49. Pittendrigh C. S. (1974) *The Neurosciences Third Study Program.* F. O. Schmidtt, F. G. Worden (red.). MIT Press, 437-458.
50. Pittendrigh C. S., (1981) *Circadian systems: entrainment in bilogical rhythms.* J. Aschoff (red.). *Handbook of Behavioral Neurobiology.* Vol. 4, 95-124. Plenum Press. New York.
51. Pyza E., Wojtusiak J. (1988) *Circiadian rhythms of locomotor activity at the ist and 2nd instars of Egyptian cotton leaf-worm (Spodoptera littoralis Boisd) Lepidoptera: Noctuidae.* [W] *Endocrinological Frontiers in Physiolodical Insect Ecology.* F. Sehnal, A. Zabza, D. L. Denlinger (red.), Wrocław Technical University Press, Wrocław.
52. Ralph M., Menaker M. (1988) *A Mutation of the Circadian System in Golden Hamsters.* Science 241, 1225-1227.
53. Reddy P., Zehring W. A., Wheeler D. A., Pirotta V., Hadfield C., Hall J. C., Rosbash M. (1984) *Molecular analysis of the period locus in Drosophila melanogaster and identification of a transcript involved in biological rhythms.* Cell 38, 701-710.
54. Reddy P., Jacquier A. C., Abovich N., Petersen G., Rosbash M., (1986) *The period clock locus of Drosophila melanogaster codes for a proteoglycan.* Cell 46, 53-61.
55. Rensing L. (1966) *Zur circadianen Rhythmik des Sauerstoffverbrauches von Drosophila.* Z. Vergl. Physiol. 53, 62-83.
56. Rensing L. (1969) *Genetische Untersuchungen ber den circadianen Rhythmus des Sauerstoffvebranchs von Drosophila.* Zool. Anz. (Suppl.) 32, 298-307.

57. Rensing L., Brunken W., Hardeland R. (1968) *On the genetics of a cicradian rhythm in Drosophila.* Experientia 24, 509-507.
58. Saunders D. S., Henrich V. C., Gilbert L. I. (1989). *Induction of diapause in Drosophila melanogaster: photoperiodic regulation and the impact of arrythmic clock mutations on time measurements.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol.86, p.3748-3752.
59. Sawaki Y., Nihonmatsu I., Kawamura H. (1984) *Transplantation of the neonatal suprachiasmatic nuclei into rats with complete bilateral suprachiasmatic lesions.* Neurosci. Res. 1, 67-72.
60. Schultz R., Pilatus U., Rensing L. (1985) *On the role of energy metabolism in Neurospora circadian clock function.* Chronobiology International vol. 2, No. 4, 223-233.
61. Schweiger H-G. (1987) *Cellular and molecular aspects of circadian rhythms: a review.* [W] *Chronobiology and Chronomedicine. Basic Research and Applications.* G. Hildebrandt, R. Moog, F. Raschke (red.), Peterlang, Frankfurt am Main, Bern, New York, Paris, 1987.
62. Schweiger E., Wallraff H-G. Schweiger H-G. (1964) *Endogenous circadian rhythm in cytoplasm of Acetabularia: Influence of the nucleus.* Science 146, 658-659.
63. Schweiger H-G., Schweiger E. (1965) *The role of the nucleus in a cytoplasmic diurnal rhythm.* [W] *Circadian clocks.* J. Aschoff (red.), North Holland Publishing Co. Amsterdam.
64. Shin H-S., Bargiello T. A., Clark B. T., Jackson R. J., Young M. W. (1985) *An unusual coding sequence from Drosophila clock gene is conserved in vertebrates.* Nature 317, 445-448.
65. Siwicki K. K., Eastman C., Petersen G., Rosbash M., Hall J. C. (1988) *Antibodies to the period gene product of Drosophila reveal diverse tissue distribution and rhythmic changes in the visual system.* Neuron 1, 141-150.
66. Smith F. R., Konopka R. J. (1981) *Circadian Clock Phenotypes of Chromosome Aberrations with a Breakpoint at the per Locus.* Mol. Gen. Genet. 183, 243-251.
67. Smith F. R., Konopka R. J. (1982) *Effects of Dosage Alterations at the per Locus on the Period of the Circadian Clock of Drosophila.* Mol. Gen. Genet. 185, 30-36.
68. Weitzel G., Rensing L. (1981) *Evidence for Cellular Circadian Rhythms in Isolated Fluorescent Dye-Labelled Salivary Glands of Wild Type and an Arrhythmic Mutant of Drosophila melanogaster.* J. Comp. Physiol. 143, 229-235.
69. Yada T., Oiki S., Ueda Y. (1986) *Synchronous oscillation of the cytoplasmic Ca^{2+} concentration and membrane potential in cultured epitelial cells* (*Intestine* 407). Biochim. Biophys. Acta 887, 105-112.
70. Young M. W., Jackson F.R., Shin H-S., Bargiello T. A. (1985) *A biological clock in Drosophila.* Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 50, 865-875.
71. Yu Q., Jacquier A. C., Citri Y., Colot H. V., Hamblen M., Hall J. C., Rosbash M. (1987) *Molecular mapping of point mutations in the period gene that stop or speed up biological clocks in Drosophila melanogaster.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 784-788.

KOSMOS 1991, 40 (1): 111-116

KRYSTYNA ZUŻEWICZ
Wojskowy Instytut
Medycyny Lotniczej
Warszawa

SŁOWNIK PODSTAWOWYCH TERMINÓW I POJĘĆ STOSOWANYCH W CHRONOBIOLOGII

Akrofaza (acrophase) — faza odpowiadająca maksymalnej wartości funkcji opisującej rytm biologiczny (patrz analiza kosinorowa). Wyróżnia się trzy typy akrofaz:

Akrofaza obliczona (computative — $\emptyset$) — wyznaczona zgodnie z przyjętym modelem, odnoszona najczęściej do północy, tj. godziny 24.00;

Akrofaza zewnętrzna (external acrophase — φ) określana w odniesieniu do punktu czasowego zsynchronizowanego z cyklami środowiska (np. środek fazy oświetlenia);

Akrofaza wewnętrzna (internal acrophase - φ) — odnoszona do innego rytmu o tej samej częstotliwości w tym samym organizmie.

Dryf akrofazy (acrophase drift) — przyspieszenie lub opóźnienie fazy rytmu w następujących po sobie cyklach (dobach miesiącach itp.).

Amplituda (amplitude — A) — różnica pomiędzy maksymalną wartością najlepiej dopasowanej funkcji kosinus i mezorem.

Analiza kosinorowa (cosinor analysis) — metoda statystyczna opisująca rytm biologiczny za pomocą trzech parametrów: amplitudy (A), akrofazy ($\emptyset$) i mezora (M), będących współczynnikami krzywej o równaniu $f(t)=M+A\cos(\omega t+\emptyset)$, dopasowanej metodą najmniejszych kwadratów, do doświadczalnej serii czasowej pomiarów (rys. 1) Analiza kosinorowa umożliwia przedstawienie rytmów biologicznych w sposób łatwy do interpretacji w układzie współrzędnych biegunowych (w tzw. kole kosinorów, gdzie kąt 360°C odpowiada okresowi rytmu). Obszar ufności pary zmiennych: amplitudy i akrofazy umożliwia ocenę występowania rytmu z określonym prawdopodobieństwem (np. 99%, 95%) (rys.2) Analiza kosinorowa obejmuje wyznaczanie:

— pojedynczego kosinora (single cosinor) — opis pojedynczej serii czasowej za pomocą trzech parametrów A, M, $\emptyset$;

— grupowego, średniego kosinora (group mean-cosinor) — wyznaczenie amplitudy, mezora i akrofazy opisujących rytm biologiczny dla grupy zwierząt czy ludzi;

— populacyjnego, średniego kosinora (population, mean-cosinor) — na podstawie parametrów wyznaczonych dla kilku biologicznych serii czasowych, ocena rytmu populacyjnego.

Antyfaza (antiphase) — różnica między akrofazami dwóch rytmów biologicznych o tej samej częstotliwości, wynosząca 180° ± 15°.

Chronobiologia — nauka badająca mechanizmy biologicznych struktur czasowych, opisująca procesy rytmiczne zachodzące na różnych poziomach organizacji życia: ekosystem, organizm, tkanka, komórka, struktura wewnątrzkomórkowa.

Chronogram (chronogram) — prezentacja indywidualnych lub uśrednionych danych w funkcji czasu, wyrażanego w sekundach, minutach, godzinach, dniach, miesiącach, latach itp.

Cykl oświetlenia (photoperiod) — czas trwania oświetlenia w cyklu światło-ciemność (light-L, darkness-D). Przyjęto oznaczenia:

LD — naprzemienność faz światło-ciemność,

LL — ciągłe oświetlenie trwające przynajmniej przez czas odpowiadający jednemu okresowi rytmu.

DD — stała ciemność, brak fazy jasnej przez czas odpowiadający minimum jednemu okresowi.

Częstotliwość (frequency) — odwrotność okresu (patrz okres).

Dawca czasu — synchronizator (Zeitgeber, time-giver, synchronizer) — czynniki środowiska, których wahania wymuszają synchronizację endogennych rytmów biologicznych.

Desynchronizacja (desynchronization) — utrata synchronizacji pomiędzy dwoma lub więcej rytmami, prowadząca do zróżnicowania ich okresów. Wyróżnia się kilka typów desynchronizacji:

Desynchronizacja wewnętrzna (internal desynchronization) — utrata zgodności fazowej między dwoma lub więcej rytmami w obrębie tego samego organizmu, spowodowana zróżnicowaniem okresów ich swobodnych przebiegów;

Desynchronizacja wewnętrzna przejściowa (transient internal desynchronization) — wewnętrzna desynchronizacja pomiędzy rytmami, trwająca przez kilka kolejnych cykli. Występuje zazwyczaj po przesunięciu fazowym dawcy czasu, gdy różne rytmy wymagają innego czasu do uzyskania ponownej synchronizacji.

Desynchronizacja wewnętrzna wymuszona (forced internal desynchronization) — występuje w sytuacji, gdy organizm znajduje się pod wpływem jednego lub kilku dawców czasu synchronizujących tylko część jego funkcji rytmicznych.

Desynchronizacja zewnętrzna (external desynchronization) — utrata zgodności fazowej pomiędzy rytmem biologicznym i jego dawcą czasu.

Element aktywny (active element) — część układu biologicznego zdolna do generowania samopodtrzymujących się oscylacji.

Element pasywny (passive element) — część układu biologicznego, której rytmiczność wymuszona jest przez inne oscylacje. Jest niezdolna do samodzielnego generowania rytmu.

Elipsa ufności (confidence ellipse) — obszar zawierający parametry rytmu: amplitudę i akrofazę badanej populacji, z zadanym prawdopodobieństwem (najczęściej 95% lub 99%).

Faza (phase) — chwilowy stan oscylacji w obrębie okresu.

Krzywa odpowiedzi fazowej (phase response curve — PRC) — wykres ilustrujący jak wielkość i kierunek przesunięcia fazowego indukowanego przez pojedynczy bodziec zależą do fazy, w której ten bodziec zadziałał na rytm.

Przesunięcie fazowe (phase shift) — dla pojedynczego rytmu przemieszczenia się oscylacji wzdłóż osi czasu, występujące natychmiast po zadziałaniu bodźca lub po kilku niezaburzonych cyklach.

Mediator (mediotor) — czynnik przekazujący informację z rozrusznika rytmów do tkanek docelowych.

Mezor (mesor — MD = średnia wartość rytmu — średnia arytmetyczna największej i najmniejszej wartości funkcji opisującej rytm.

Okres (period-T) — odstęp czasowy pomiędzy dwoma kolejnymi maksimami (lub innymi powtarzającymi się wartościami) funkcji okresowej, dopasowanej do wartości wyznaczonych doświadczalnie.

Oscylator (oscillator) = zegar biologiczny — wewnętrzny element organizmu zdolny do generowania rytmu biologicznego;

Oscylator drugorzędowy (secondary oscillator) — element zdolny do generowania w obrębie organizmu oscylacji mniej stabilnych i trwałych, niż wzbudzone przez rozrusznik i nie podlegających bezpośredniej synchronizacji przez dawców czasu.

Przekaźnik (transducer) — część układu biologicznego zdolna do wykrywania środowiskowych dawców czasu i przetwarzania informacji czasowej w taką jej formę, która może synchronizować oscylatory.

Rozrusznik (peacemaker) — część układu nerwowego spełniająca następujące funkcje: 1 — odbiór informacji o stanie synchronizatorów środowiskowych, 2 — generowanie rytmów biologicznych w obrębie organizmu (oscylacje pierwszorzędowe), 3 — synchronizacja rytmów endogennych z dawcami czasu.

Rytm biologiczny (biological rhythm) — zmiany cech biologicznych powtarzające się regularnie w czasie pod względem kształtu, czy wielkości opisujących pojedynczy cykl i wyznaczonych obiektywnie, zgodnie z przyjętym modelem matematycznym.

Rytm egzogenny (exogenous rhythm) — rytm generowany przez cykliczne sygnały środowiskowe działające na organizm, ulegający wygaszeniu z chwilą zaniku bodźca zewnętrznego.

Rytm endogenny (endogenous rhythm) — samopodtrzymujący się rytm generowany w obrębie organizmu.

Rytm swobodnie biegnący (free-running-rhythm) — rytm endogenny w środowisku pozbawionym synchronizatorów.

Struktura czasu biologicznego (biological time structure) — spektrum rytmów o różnych częstotliwościach, powiązanych ze sobą nieprzypadkową czasową zależnością biologicznej zmienności, włącznie z procesem wzrostu, rozwoju i starzenia się. Istnieje ona w ekosystemach i populacjach, pojedynczych organizmach, narządach, tkankach, komórkach i strukturach subkomórkowych (tab. 1).

Tabela 1

Struktura czasu biologicznego

Nazwa rytmu (polska/ang.)		Okres
Ultradialny	ultradian	$T < 20g^*$
Okołodobowy	circadian	$20g \leqslant T \leqslant 28g$
dzienny	dian	$23{,}8g \leqslant T \leqslant 24{,}2g$
Infradialny	infradian	$T > 28g$
okołosiedmiodniowy	circaseptan	$T = 7 \pm 3d$
okołoczternastodniowy	circadiseptan	$T = 14 \pm 3d$
okołodwudziestojednodniowy	circavigintan	$T = 21 \pm 3d$
okołotrzydziestodniowy	circatrigintan	$T = 30 \pm 5d$
okołoroczny	circannual	$T = 1r \pm 2m$

*g — godz, d — dzień, m — miesiąc, r — rok

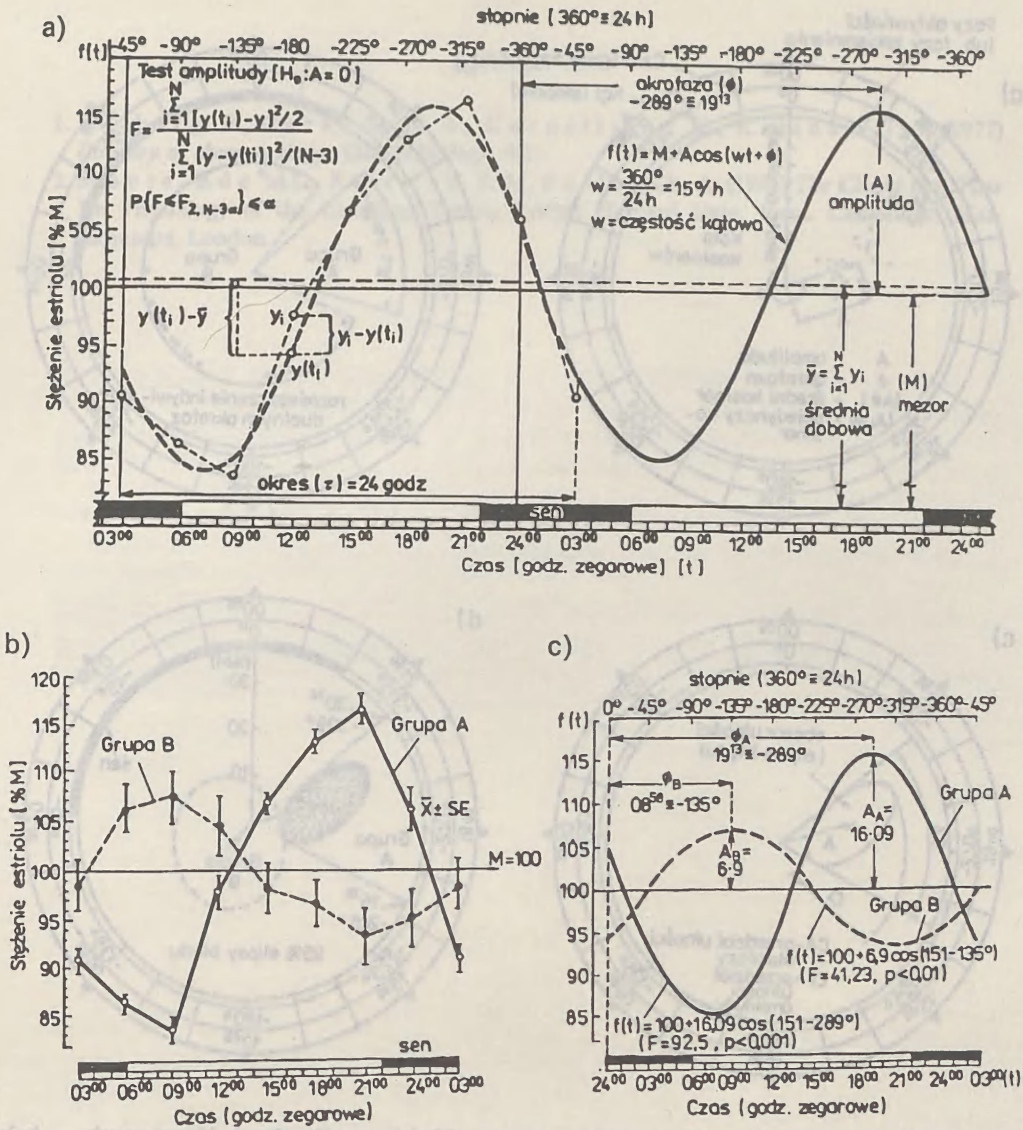
Średnia próby (mean value — $\bar{y}$) — średnia arytmetyczna obserwacji wykonanych w określonym przedziale czasowym. Na przykład średnia dobowa, średnia roczna itp.

Synchronizacja (entrainment, synchronization) — utrzymywanie stałej sekwencji fazowej rytmów, zgodnej z fazą wahań środowiska zewnętrznego.

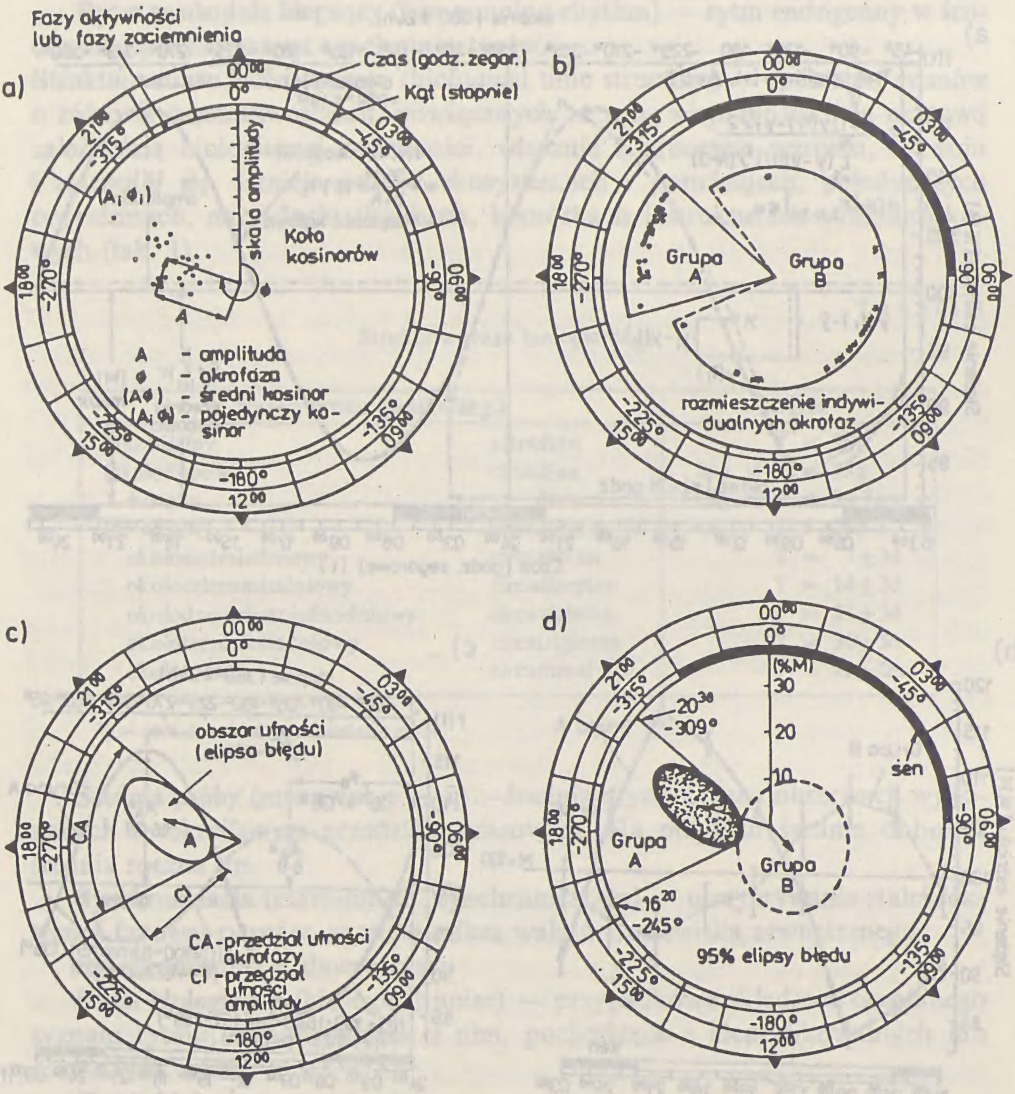
Synchronizator = dawca czasu

Szum biologiczny (biological noise) — przypadkowe składowe ocenianego sygnału rytmu, współistniejące z nim, pochodzące z identyfikowalnych lub nieznanych źródeł.

Zegar biologiczny = oscylator.



Rys. 1. Interpretacja graficzna parametrów okołodobowych rytmu biologicznego w układzie współrzędnych prostokątnych (na przykładzie dobowych wachań stężenia estriolu w surowicy kobiet, w trzecim trymestrze ciąży — dzięki uprzejmości dr J. Latoszewskiej-Smółko). a — Krzywa opisująca dobowe wahania stężenia estriolu, dopasowana metodą najmniejszych kwadratów do serii czasowej utworzonej ze średnich wartości stężeń oznaczonych ośmiokrotnie w ciągu doby, w równych, 3-godzinnych odstępach czasowych. b — Dobowe wahania stężenia estiolu (chronogramy) w dwóch grupach kobiet (A-norma, B-patologia ciąży). c — Krzywe dopasowane do serii czasowych przedstawionych na rys. 1. Interpretacja graficzna parametrów rytmu stężenia estriolu (amplitud i akrofaz) w dwóch grupach kobiet. Zwraca uwagę przesunięcie akrofazy i obniżenie amplitudy grupy B względem grupy A



Rys. 2. Interpretacja graficzna parametrów rytmu w układzie współrzędnych biegunowych — koło kosinorów. a — W kole kosinorów każdą pojedynczą serię czasową reprezentuje wektor opisany parą wartości $(A,Ø)$, gdzie A jest amplitudą (długość wektora), a $Ø$ — akrofazą (kąt zorientowany). Na rysunku umieszczono tylko jeden wektor (średni kosinor), końce pozostałych wektorów, odpowiadających pojedynczym seriom czasowym (pojedynczy kosinor), zaznaczono kropkami. b — Rozmieszczenie, w kole kosinorów, indywidualnych akrofaz dla wszystkich analizowanych serii czasowych. Grupa A — kropki, grupa B — gwiazdki. c — Obszar ufności (elipsa błędu) wyznaczony dla par $(A_i,Ø_i)$ charakteryzujących dobowe wahania stężenia estriolu u poszczególnych osób grupy A. D — Obszary ufności amplitydy i akrofazy dobowych wahań stężenia estiolu w dwóch grupach kobiet. Położenie elips błędu względem środka koła kosinorów pozwala wnioskować o występowaniu rytmu w grupie A (norma) i jego braku w grupie B (patologia)

LITERATURA

1. Halberg F., Carandate F., Cornelissen G., Katinas G. S. (1977) *Glossary of chronobiology*. Chronobiologia 4(1).
2. Moore-Ede M.C., Sulzman F. M. Fuller Ch. A. (1982) *The Clocks that Time Us*. Physiology of the Circadian Timing System Harvard Univ. Press. Cambridge, Massachusetts. London.

SPROSTOWANIE

W numerze 1/1990 KOSMOSU, do artykułu Pana Profesora Andrzeja Wiercińskiego „O osobliwości natury gatunkowej człowieka", wdarły się dwa błędy, a mianowicie:

na str. 115 jako miejsce pracy podano Państwowe Muzeum Archeologiczne, Warszawa, a powinno być: Zakład Antropologii Historycznej Instytutu Archeologii Uniwersytetu Warszawskiego,

na str. 120 — tab. 2, wiersz 10 od dołu podano: depresja, powinno być derepresja.

Za te przeoczenia Redakcja bardzo przeprasza Autora i Czytelników.

Przy okazji uprzejmie prosimy naszych autorów, aby — zgodnie z przyjętym zwyczajem — przesyłając maszynopisy podawali dokładne, aktualne informacje dotyczące miejsca pracy i zamieszkania, a także numeru konta bankowego. Pierwsza informacja zostanie podana na stronie tytułowej artykułu, następne są potrzebne do wypłacenia honorarium.

Redakcja

SPIS TREŚCI

Bronisław Cymborowski — Wprowadzenie do zagadnień rytmów biologicznych 3
Wolfgang Engelmann — Zegary żywych organizmów 7
Krzysztof Kwarecki — Wprowadzenie do chronobiologii człowieka i chronomedycyny ... 31
W. J. *Rietveld, J. Ruis, J. Meijer, J. P. Buys* — Nerwowa regulacja rytmów okołodobowych u kręgowców 53
Grażyna Barbacka-Surowiak, Józef Surowiak — Możliwości oddziaływania na rytmy biologiczne 63
D. S. Saunders — Diapauza a zegar fotoperiodyczny u trzech gatunków muchówek 73
Maciej A. Pszczółkowski, Bronisław Cymborowski — Cytogenetyczne podłoże zegara biologicznego 93
Krystyna Zużewicz — Słownik podstawowych terminów i pojęć stosowanych w chronobiologii 111

SZEROKI WYBÓR KSIĄŻEK PWN

oferują

Księgarnia Firmowa PWN, Warszawa, ul. Miodowa 10
Księgarnia PWN, Łódź, ul. Więckowskiego 13
Główna Księgarnia Naukowa, Warszawa, ul. Krakowskie Przedmieście 7
Akademicka, Warszawa, ul. Waryńskiego 10
Studencka, Warszawa, ul. Rakowiecka 41
Księgarnia Techniczna, Kraków, ul. Podwale 4
Księgarnia Naukowa, Kraków, ul. Podwale 6
Księgarnia „Skarbnica", Kraków-Nowa Huta, oś. Centrum C bl. 1
Księgarnia „Mercurius", Gliwice, ul. Konstytucji 14b
Księgarnia, Olsztyn, Pl. Konstytucji 3 maja 3
Księgarnia Uniwersytecka, Wrocław, Pl. Uniwersytecki 9/13
Księgarnia „OMEGA", Opole, ul. Rynek 19/23
Księgarnia – Antykwariat, Płock, Pl. Narutowicza 1
Firma Handlowo-Usługowa „INDEKS", Toruń, ul. Kościuszki 9
Spółka Cywilna „ATTYLA", Zamość, ul. Przyrynek 1
Księgarski Skład Konsygnacyjny, Gdynia, ul. Władysława IV 61
Księgarnia Naukowa, Kielce, ul. Sienkiewicza 37
Księgarnia „ETHOS", Łódź, ul. Piotrkowska 11
Księgarnia Naukowa, Łódź, ul. Piotrkowska 102a
Księgarnia „EUREKA", Łódź, Aleja Piłsudskiego 24
Księgarnie OR PAN,
oraz punkty sprzedaży PWN (tylko hurt)
w Warszawie, ul. Miodowa 10
w Krakowie, ul. Pachońskiego 5
w Łodzi, ul. Więckowskiego 13
we Wrocławiu, ul. B. Krzywoustego 91/93a

UWAGA!!!

Sprzedaż wysyłkową prowadzi Księgarnia-Wzorcownia OR PAN,
Pałac Kultury i Nauki, 00–901 Warszawa oraz Księgarnia
Akademicka, 00–650 Warszawa, ul. Waryńskiego 10

Informacji o publikacjach PWN udzielają:
Dział Sprzedaży, tel. 26–09–50
Redakcja Reklamy, tel. 31–46–09

Państwowe Wydawnictwo Naukowe
00–251 Warszawa, ul. Miodowa 10
tel. centr. 26–22–91, tlx 813763, fax 267163

Informacje o nowościach PWN można znaleźć także w „TELEGAZECIE"

SPIS TREŚCI ROCZNIKA 1991

(Nr zeszytu, *strona*)

ARTYKUŁY

Barbacka-Surowiak Grażyna, Surowiak Józef — Możliwości oddziaływania na rytmy biologiczne **1** *63*
Cymborowski Bronisław — Wprowadzenie do zagadnień rytmów biologicznych . **1** *3*
Engelmann Wolfgang — Zegary żywych organizmów **1** *7*
Gabryelak Teresa — Źródła zanieczyszczeń wód powierzchniowych **4** *399*
Golinowski Władysław, Grymaszewska Grażyna — Reakcja tkanek korzenia na porażenie nicieniami z rodzaju *Heterodera* **4** *319*
Golinowski Władysław, Łotocka Barbara — Charakterystyka układu symbiotycznego. Rośliny motylkowate — Rizobia **4** *331*
Gregorczyk Andrzej — Termodynamiczna interpretacja stosunków wodnych w glebie **4** *421*
Gregorczyk Andrzej — Wymiana ciepła między rośliną a jej otoczeniem . . . **4** *411*
Jasieńska Grażyna — Synchronizacja cykli reprodukcyjnych u kobiet — Aspekty ekologiczne i ewolucyjne **2–3** *187*
Karczmarczuk Roman — Sinice i glony oraz ich znaczenie w przyrodzie i gospodarce człowieka **2–3** *225*
Kołodziejczyk Joanna — Zmodyfikowane formy śluzowca *Physarum polycephalum* jako modele do badań eksperymentalnych **2–3** *195*
Kubowicz Dorota — Transport jonów wapnia przez błony komórek roślinnych . **4** *347*
Kwarecki Krzysztof — Wprowadzenie do chronobiologii człowieka i chronomedycyny **1** *31*
Nawrat Janusz — Elektrofizjologiczne i farmakologiczne właściwości jąder nadskrzyżowaniowych — *nuclei suprachiasmatici* (SCN) podwzgórza ssaków **4** *373*
Osmólska Halszka — Dinozaury w liczbach **2–3** *145*
Pszczółkowski Maciej A., Cymborowski Bronisław — Cytogenetyczne podłoże zegara biologicznego **1** *93*
Rietveld W.J., Ruis J., Meijer J., Buys J.P. — Nerwowa regulacja rytmów okołodobowych u kręgowców **1** *53*
Sabath Karol — Na bezdrożach kreacjonizmu „naukowego" **2–3** *153*
Saunders D.S. — Diapauza a zegar fotoperiodyczny u trzech gatunków muchówek **1** *73*
Stempniewicz Lech — Z ekologii ptaków morskich **4** *381*
Szala Stanisław — Nowotwory a geny **4** *311*
Urbanek Adam — Współczesne niekonwencjonalne teorie ewolucji **2–3** *123*
Wolański Napoleon — Ekologia człowieka. Człowiek i jego kultura jako dynamiczna część ekosystemów **2–3** *165*
Zagrodzka Jolanta — Zachowania łowcze i agresja u kotów — Analiza mechanizmów ośrodkowych **2–3** *209*
Zużewicz Krystyna — Charakterystyka okołodobowych rytmów biologicznych człowieka w wysokich szerokościach geograficznych (77°–80° N) **4** *357*
Zużewicz Krystyna — Słownik podstawowych terminów i pojęć stosowanych w chronobiologii **1** *111*

DYSKUSJE

Badura Lech — Pojęcie ekosystemu w ekologii mikroorganizmów 2–3 *257*
Barciszewski Jan — O nauce i uczonych 2–3 *285*
Barciszewski Jan — Piękno, sztuka i nauka 2–3 *279*
Janion Stefan M. — Nadzieja w ekologicznej doktrynie społecznej 2–3 *265*
Janion Stefan M. — Samoregulacja 2–3 *273*
Michajłow Włodzimierz — Ekorozwój — ideologia przyszłości? 2–3 *237*
Promińska Elżbieta — O przyczynach chorób 2–3 *243*

RECENZJE

Borsuk-Białynicka Magdalena — D.B. Weishampel, P. Dodson, H. Osmólska: The Dinosauria 4 *429*
Karczmarczuk Roman — W.W. Chochłaczow: Drewniejszij złak 2–3 *307*
Karczmarczuk Roman — P.A. Krawczuk: Gieograficzeskij kalejdoskop 4 *443*
Kośmicki Eugeniusz — M. Hanf: Farbatlas der Feldflora. Wildkräuter und Undkräuter 2–3 *304*
Kośmicki Eugeniusz — J. Herbig, R. Hohlfeld: Die zweite Schöpfung. Geist und Ungeist in der Biologie des 20. Jahrhunderts 2–3 *298*
Kośmicki Eugeniusz — H. Meier: Die Herausforderung der Evolutionsbiologie . 4 *436*
Kośmicki Eugeniusz — J.H. Reichholf: Das Rätsel des Menschwerdung. Die Entstehung des Menschen im Wechselspiel mit der Natur 2–3 *301*
Kośmicki Eugeniusz — B. Verbeek: Die Anthropologie der Umweltzerstörung. Die Evolution und der Schatten der Zukunft 4 *439*
Kowalski Kazimierz — A.J. Boucot: Evolutionary Paleobiology of Behavior and Coevolution 4 *433*
Malinowski Andrzej — A. Bochenek, M. Reicher: Anatomia człowieka 4 *435*
Michajłow Włodzimierz — Earth Summit News 2–3 *297*
Michajłow Włodzimierz — Global 500 . . . . . 2–3 *296*
Michajłow Włodzimerz — M.S. Gilarow 2–3 *295*
Namiotko Tadeusz — Cytherissa — the Drosophila of paleolimnology 4 *442*

ZEBRANIA, ZJAZDY I KONFERENCJE NAUKOWE

Kowalski Marek — V Ogólnopolska Konferencja Chiropterologiczna 4 *456*
Kuźnicki Leszek — Pierwsze letnie sezony na Stacji Hydrobiologicznej w Mikołajkach 4 *447*
Niemierko Stella — Sylwetka Liliany Lubińskiej (Wystąpienie na Sesji Naukowej poświęconej Pamięci Prof. dr Liliany Lubińskiej) 4 *450*
Żernicki Bogusław — Sesja Naukowa poświęcona Pamięci Liliany Lubińskiej — wybitnego polskiego neurobiologa 4 *450*

Cena zł 10 000,—

Tylko prenumerata zapewnia regularne otrzymywanie kwartalnika

KOSMOS

Wpłaty na prenumeratę przyjmowane są tylko na okresy kwartalne. Informacji o cenach udzielają urzędy pocztowe oraz oddziały Kolportażowe Przedsiębiorstwa Upowszechniania Prasy i Książki w miastach.

Prenumeratę przyjmują:

— oddziały PUPiK właściwe dla miejsca zamieszkania lub siedziby prenumeratora; odbioru zamówionych egzemplarzy dokonuje prenumerator w wyznaczonych punktach sprzedaży lub w inny, uzgodniony sposób,

— urzędy pocztowe i listonosze — od prenumeratorów z terenów wiejskich lub innych miejscowości, w których nie ma oddziałów PUPiK, a w miastach tylko od osób niepełnosprawnych — poczta zapewnia dostawę zamówionych egzemplarzy pod wskazany adres pod warunkiem uiszczenia dodatkowej opłaty za każdy doręczony egzemplarz; wysokość opłat za każdy kwartał ustala poczta

— Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, 00-958 Warszawa, konto PBK XIII Oddział Warszawa 370044-1195-139-11 — tylko od prenumeratorów zlecających dostawę za granicę.

Prenumerata ze zleceniem dostawy za granicę jest o 100% wyższa; w przypadku zlecenia dostawy drogą lotniczą — koszt dostawy lotniczej w pełni pokrywa prenumerator.

Terminy przyjmowania wpłat na prenumeratę:

— krajową i zagraniczną —	do 20.XI.	na I kw. roku następnego
	do 20.II.	na II kw.
	do 20.V.	na III kw.
	do 20.VIII.	na IV kw.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Ośrodka Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa.

Subscription orders for all the magazines published in Poland available through the local press distributors or directly through the

Foreign Trade Enterprise

ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland

Our bankers:

BANK HANDLOWY S.A. 20 1061-710-13100

Indeks 36260