

Regulacja sekrecji melatoniny w szyszynce ptaków

MAGDALENA PRUSIK, BOGDAN LEWCZUK

Zespół Histologii i Embriologii Katedry Morfologii Funkcjonalnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM,
ul. Oczapowskiego 13, 10-713 Olsztyn

Prusik M., Lewczuk B.

Regulation of melatonin secretion in the avian pineal gland

Summary

The avian pineal gland releases melatonin in a cyclic manner, with the highest level at night and the lowest level during the daytime. Mechanisms regulating melatonin secretion in birds are very complex, probably due to the phylogenetic position of the avian pineal gland as an intermediate form between the pineals of lower vertebrates and mammals. Avian pinealocytes possess an endogenous oscillator, formed by a self-regulated system of clock genes, that controls the transcription of several enzymes, among them arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT), the enzyme limiting melatonin synthesis. These cells are also directly photosensitive due to the presence of photopigments, pinopsin and melanopsin, as well as corresponding signal transduction systems. Light acting via pinopsin induces a cascade of events that leads to the decrease in cGMP and cAMP levels, AA-NAT activity and melatonin secretion. Melanopsin is probably involved in an entrainment of the circadian oscillator to the environmental light conditions. The function of the avian pineal gland is also regulated by light acting indirectly via the retina as well as by the extrapineal oscillator located in the suprachiasmatic nucleus. Both structures influence the pinealocyte activity via a common multisynaptic pathway, which ends in the gland as the sympathetic nerve fibers. Norepinephrine released from these fibers stimulates α_2 -adrenoreceptors in pinealocyte plasmalemma and inhibits adenylate cyclase activity and melatonin secretion. The significance of direct and indirect routes of light perception as well as intra- and extra-pineal oscillators in the regulation of melatonin secretion may differ between species, but this problem is poorly recognized.

Keywords: pineal gland, birds, melatonin, circadian oscillator, photoreception

Mechanizmy kontrolujące sekrecję melatoniny w szyszynce ptaków są bardzo złożone, bowiem obejmują procesy charakterystyczne zarówno dla niższych kręgowców – np. ryb, jak i dla ssaków (16, 21, 23, 27, 33). Z jednej strony, komórki mięsaczowe szyszynki ptaków, zwane pinealocytami, wyposażone są w endogenne generatory rytmu oraz struktury fotoreceptorowe (podobnie jak u ryb), z drugiej – ich aktywność jest regulowana przez światło odbierane za pośrednictwem siatkówki i oscylatory pozaszyszynkowe, przede wszystkim neurony jądra nadskrzyżowaniowego (podobnie jak u ssaków).

Główne komponenty kontrolujące wydzielanie melatoniny u ptaków

Szyszynka ptaków wydzielą melatoninę w sposób cykliczny, z najwyższym poziomem sekrecji podczas nocy i najniższym w ciągu dnia (6, 19, 21, 27). Rytm aktywności wydzielniczej tego gruczołu jest endogenne generowany przez oscylator wewnątrzszyszynkowy oraz oscylator w jądrze nadskrzyżowaniowym (SCN) podwzgórza (4, 19, 20, 27, 30). SCN reguluje sekrecję melatoniny za pośrednictwem włókien nerwowych

współczulnych uwalniających noradrenalinę, która u ptaków hamuje wydzielanie hormonu szyszynki (4, 32). Sekrecja melatoniny jest ściśle uzależniona od warunków oświetlenia w środowisku zewnętrznym. Światło wpływa na funkcję szyszynki dwutorowo – bezpośrednio, dzięki obecności w pinealocytach ptaków barwników wzrokowych oraz pośrednio – poprzez siatkówkę oka, SCN i unerwienie współczulne (4, 21, 24, 25, 27). Bodźce świetlne hamują wydzielanie melatoniny oraz wpływają na funkcjonowanie obu generatorów rytmu, dopasowując ich aktywność do pory rozpoczęcia i zakończenia ciemnej fazy doby (27, 30, 40). Schemat ilustrujący regulację wydzielania melatoniny w szyszynce ptaków przedstawia ryc. 1.

Mechanizmy kontrolujące wydzielanie melatoniny w szyszynce ptaków były szczegółowo badane jedynie u niewielkiej liczby gatunków (głównie – kury, indyka, przepiórki japońskiej). Wyniki tych badań oraz znaczne zróżnicowanie budowy tego gruczołu wskazują na możliwość występowania istotnych różnic gatunkowych w regulacji sekrecji tego hormonu, dotyczących przede wszystkim roli oscylatorów i fotoreceptorów zlokalizowanych w szyszynce i poza nią.

Synteza melatoniny

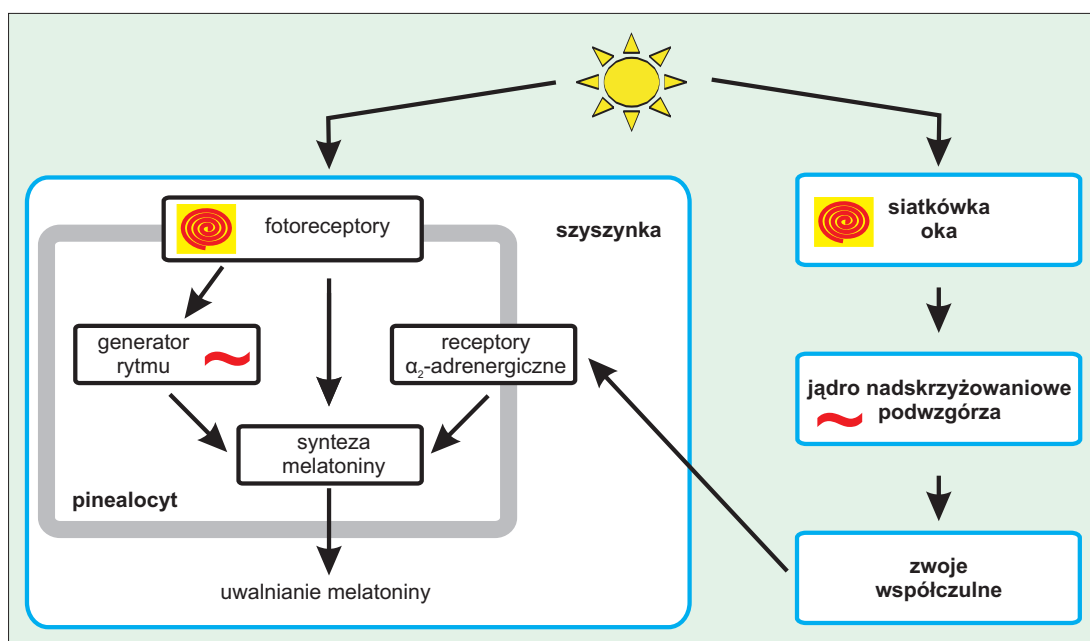
Melatonina powstaje z tryptofanu, aminokwasu aromatycznego aktywnie wychwytywanego z krwi przez pinealocyty (29). Synteza tego hormonu została przedstawiona na rycinie 2. Spośród czterech enzymów uczestniczących w tym procesie kluczową rolę w regulacji dobowych zmian w poziomie sekrecji melatoniny u wszystkich badanych kręgowców, odgrywa N-acetylotransferaza aryloalkyloaminowa (AA-NAT). Zawartość i aktywność tego enzymu w pinealocytach ptaków zmieniają się w cyklu dobowym w sposób analogiczny do wielkości sekrecji hormonu szyszynki (3, 41). Należy podkreślić, melatonina nie jest gromadzona w ziarnistościach wydzielniczych, lecz jako mała cząsteczka rozpuszczalna zarówno w tłuszczach, jak i w wodzie, jest uwalniana na drodze dyfuzji, dlatego poziom wydzielania odzwierciedla wielkość jej syntezy (29).

Szyszynkowy generator rytmu

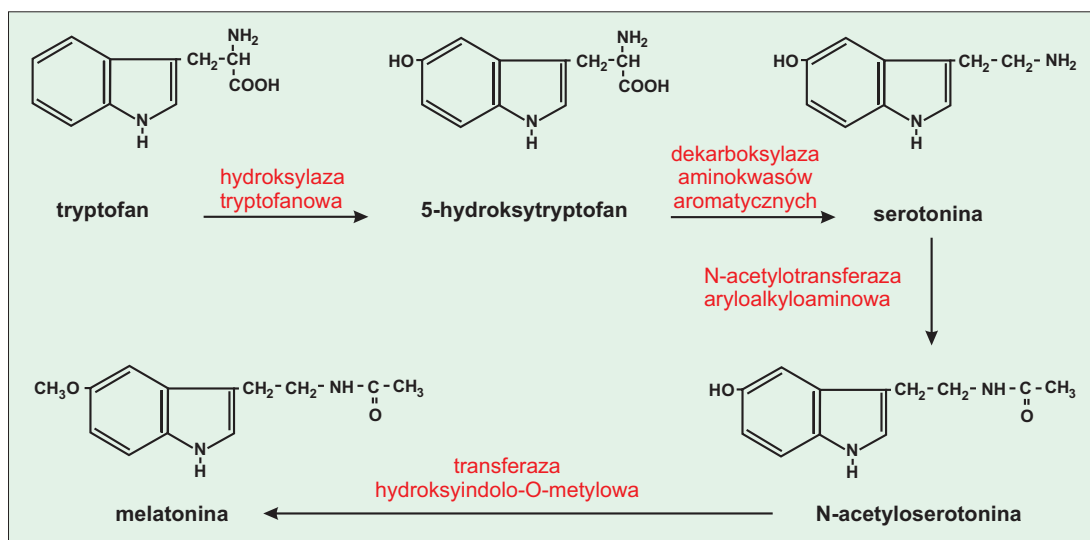
Okołodobowy rytm sekrecji melatoniny w szyszynce ptaków jest generowany endogennie w pełnym znaczeniu tego słowa, bowiem pinealocyty tej gromady, podobnie jak komórki fotoreceptorowe szyszynki niższych kręgowców, posiadają wewnątrzkomórkowy oscylator, którego aktywność zmienia się w cyklu zbliżonym do 24 godzin (ryc. 3). Jego funkcjonowanie opiera się na autoregulacyjnym systemie genów zegarowych z wzajemnie sprzężoną transkrypcją (6, 21, 23). Dotychczas w szyszynce ptaków zidentyfikowano osiem genów zegarowych – Per1, Per2, Per3, Bmal1, Bmal2, Clock, Cry1, Cry2.

Endogenne oscylator w pinealocytach ptaków wpływa na sekrecję melatoniny poprzez generowanie rytmu transkrypcji genów kodujących enzymy szlaku syntezy tego hormonu (przede wszystkim AA-NAT – ryc. 3). W szyszynce kury wykazano okołodobowy rytm zawartości kwasów mRNA

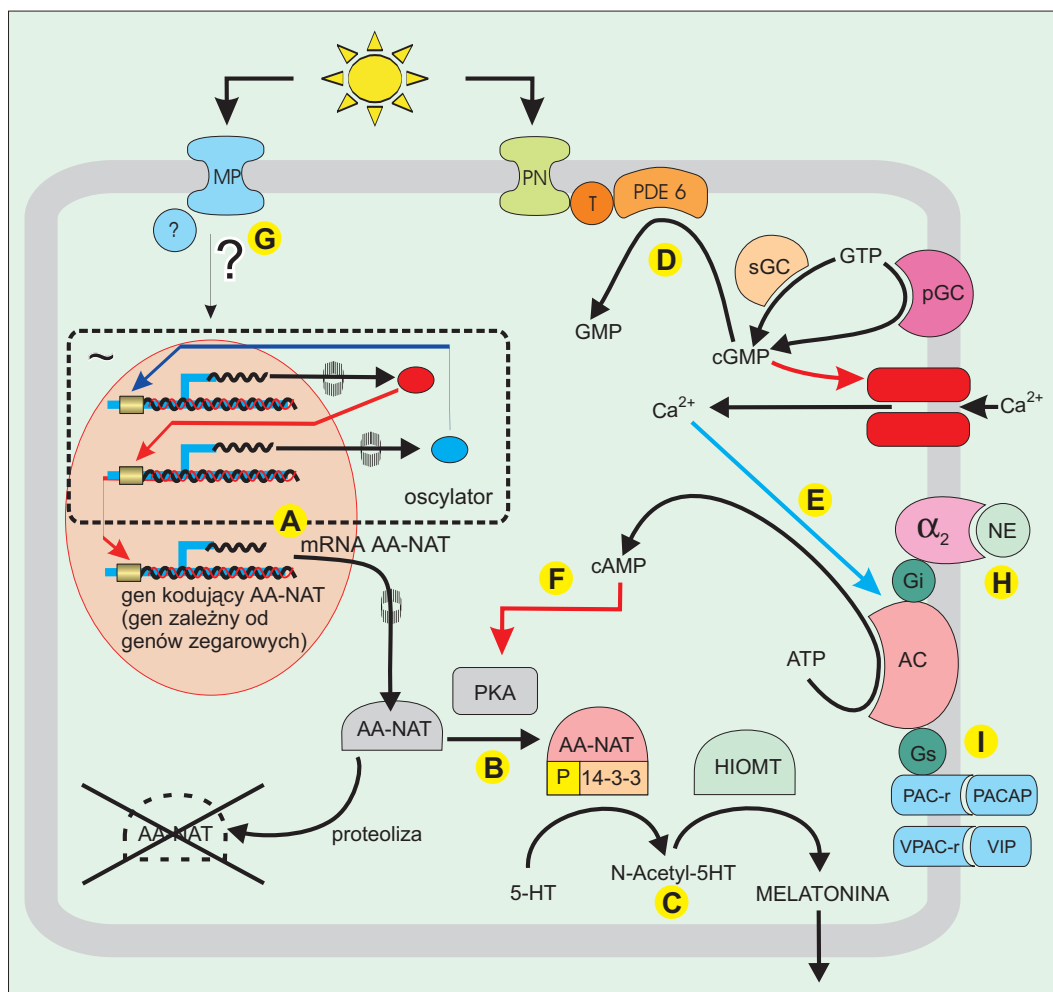
kodujących hydroksylazę tryptofanową (TPH-mRNA) i N-acetylotransferazę serotoninową (AA-NAT-mRNA), których poziom jest najwyższy podczas naturalnej nocy oraz mRNA kodującego transferazę hydroksyindolo-O-metylową (HIOMT-mRNA), którego największą zawartość stwierdza się podczas naturalnego dnia (2, 3, 10, 11). Rytmiczne zmiany poziomów TPH-mRNA oraz AA-NAT-mRNA obserwowano u ptaków przebywających w warunkach ciągłej ciemności i ciągłego światła oraz w hodowli pinealocytów prowadzonej w ciemności (3, 10). Rytm HIOMT-mRNA stwierdzono *in vivo* i *in vitro* w ciągłej ciemności, natomiast jego występowanie nie było badane w warunkach ciągłego oświetlenia (2, 11). Obserwowane w warunkach ciągłej ciemności rytmy okołodobowe zawartości kwasów mRNA kodujących omawiane enzy-



Ryc. 1. Schemat regulacji wydzielania melatoniny w szyszynce ptaków



Ryc. 2. Synteza melatoniny



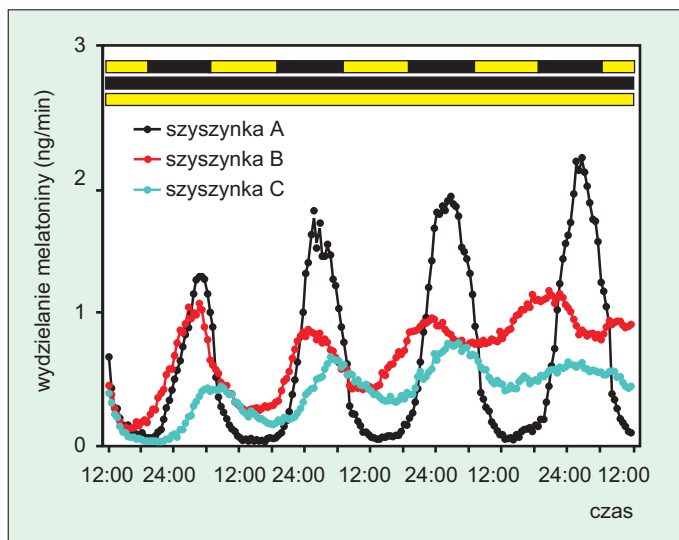
Ryc. 3. Schemat funkcjonowania głównych mechanizmów kontrolujących aktywność wydzielniczą pinealocytów ptaków. Objaśnienia: A – wewnątrzkomórkowy oscylator, będący autoregulacyjnym systemem genów zegarowych, generuje rytm transkrypcji AA-NAT (ze wzrostem poziomu mRNA kodującego AA-NAT w pierwszej części nocy i spadkiem – w drugiej). Oscylator wpływa także na biosyntezę innych enzymów szlaku syntezy melatoniny, cykazy adenylnowej oraz kanałów wapniowych, jednakże oddziaływanie to jest słabo poznane i nie zostało zaznaczone na schemacie; B – powstające w wyniku translacji cząsteczki AA-NAT są chronione przed proteolizą poprzez fosforylację zachodzącą przy udziale kinazy białkowej A (PKA) oraz tworzenie kompleksu z białkami 14-3-3. Procesy te uwarunkowane są wysokim poziomem cAMP; C – przewaga biosyntezy AA-NAT nad degradacją tego enzymu prowadzi do wzrostu syntezy i uwalniania melatoniny. AA-NAT przekształca serotoninę (5-HT) w N-acetyloserotoninę (N-Acetyl-5HT), która jest następnie metylowana przy udziale transferazy hydroksyindolo-O-metylowej (HIOMT) do melatoniny. W drugiej połowie nocy poziom wytwarzania AA-NAT obniża się, co powoduje stopniowy spadek wydzielania hormonu szyszynki; D – ekspozycja na światło powoduje aktywację fosfodiesterazy VI (PDE 6), kontrolowanej przez układ pinopsyna (PN) – transducyna (T), co prowadzi do obniżenia poziomu cGMP (jego synteza jest uwarunkowana obecnością cytoplazmatycznej – sGC i błonowej – pGC formy cykazy guanylowej; E – niski poziom cGMP wywołuje zamknięcie kanałów wapniowych zależnych od tego wtórnego przekaźnika informacji oraz spadek koncentracji jonów Ca^{2+} w pinealocytach. Powoduje to obniżenie aktywności cykazy adenylnowej (AC) zależnej od jonów wapniowych oraz w konsekwencji prowadzi do spadku poziomu cAMP; F – niski poziom cAMP nie zapewnia dalszej ochrony AA-NAT przed proteolizą, czego efektem jest gwałtowny spadek sekrecji melatoniny; G – światło odbierane bezpośrednio przez pinealocyty za pośrednictwem melanopsyny (MP) wpływa na funkcjonowanie endogennego oscylatora. Mechanizm oddziaływania światła na generator rytmu nie jest znany; H – noradrenalina (NE), uwalniana z zakończeń współczulnych włókien nerwowych stymuluje receptory α_2 -adrenergiczne powiązane z białkami Gi, co hamuje aktywność cykazy adenylnowej (AC) oraz obniża poziom cAMP; I – stężenie cAMP jest również kontrolowane poprzez neuropeptydy: naczyniowoaktywny peptyd jelitowy (VIP) oraz przysadkowy peptyd stymulujący cyklastę adenylnową (PACAP) oddziałujące na receptory VPAC-r oraz PAC-r, które łączą się z białkami Gs aktywującymi cyklastę adenylnową

my szlaku syntezy melatoniny charakteryzowały się niższą amplitudą niż ich rytmy dobowe występujące w warunkach cyklu światło–ciemność. Endogenny oscylator wpływa również na stężenie cAMP i jonów wapniowych w pinealocytach kury poprzez oddziaływanie na biosyntezę cykazy adenylnowej zależnej od kalmoduliny oraz kanałów wapniowych (6, 8, 22).

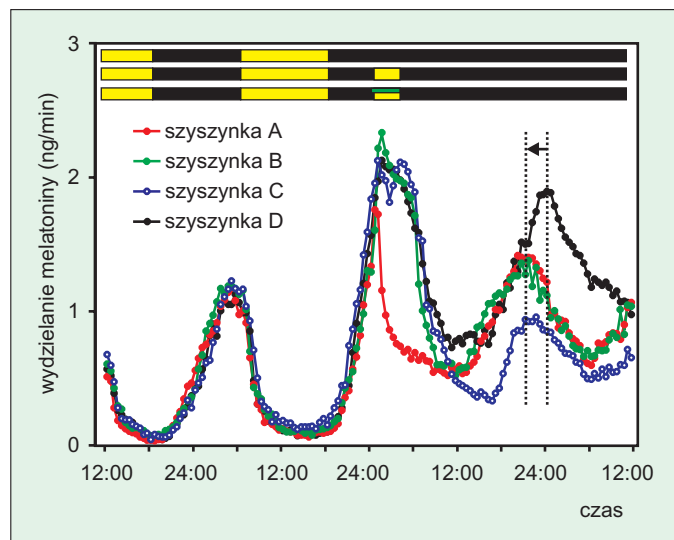
Efektem funkcjonowania oscylatora w pinealocytach jest endogennie generowany okołodobowy rytm wydzielania melatoniny, utrzymujący się *in vitro* w warunkach ciągłej ciemności i ciągłego oświetlenia przez kilka dni i nocy (ryc. 4). Mimo braku wpływu światła, sekrecja melatoniny z pinealocytów ptaków jest niska podczas subiektywnego dnia oraz wysoka podczas subiektywnej nocy (6, 19, 20, 27, 30). Spośród wymienionych powyżej genów, których transkrypcja jest kontrolowana przez oscylator, kluczową rolę w indukcji spontanicznego wzrostu sekrecji melatoniny podczas subiektywnej nocy odgrywają gen kodujący AA-NAT oraz geny wpływające na poziom cAMP i Ca^{2+} w pinealocytach.

Odbiór bodźców świetlnych przez pinealocyty

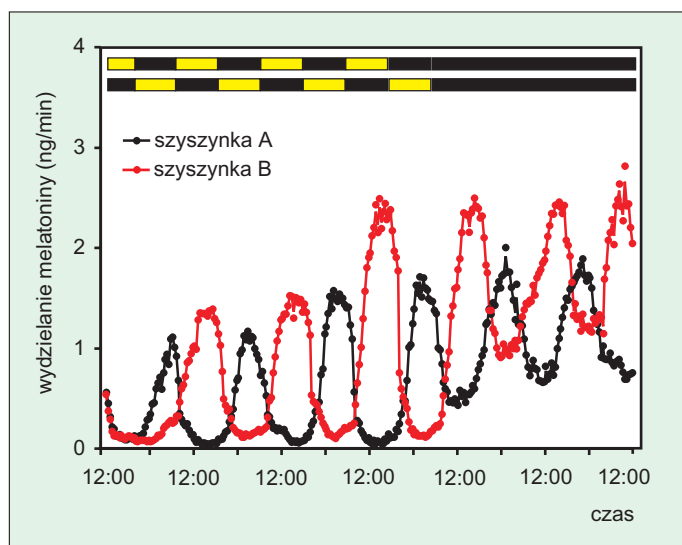
Pinealocyty ptaków, niezależnie od typu ich budowy (27, 28, 33), posiadają zdolność odbioru bodźców świetlnych, którą zawdzięczają obecności barwników wzrokowych oraz powiązanych z nimi kaskad regulacyjnych (ryc. 3). Światło oddziałuje na pinealocyty ptaków dwukierunkowo: hamuje



Ryc. 4. Wydzielanie melatoniny z szyszynek indyka w hodowli narządowej przepływowej inkubowanych: 1) gruczoł A – w warunkach cyklu świetlnego obejmującego fazę jasną trwającą od 7⁰⁰ do 19⁰⁰ i fazę ciemną od 19⁰⁰ do 7⁰⁰, identycznego ze stosowanym podczas odchowu ptaków, 2) gruczoł B – w warunkach ciągłej ciemności oraz 3) gruczoł C – ciągłego oświetlenia



Ryc. 5. Wydzielanie melatoniny z szyszynek indyka w hodowli narządowej przepływowej inkubowanych przez dwie doby w warunkach oświetlenia 12L:12D (faza jasna od 7⁰⁰ do 19⁰⁰, faza ciemna od 19⁰⁰ do 7⁰⁰), a następnie przez jedną dobę w ciemności. Podczas ciemnej fazy drugiej doby eksperymentu szyszynki poddano: 1) gruczoł A – działaniu światła przez 180 minut pomiędzy 1⁰⁰ a 4⁰⁰; 2) gruczoł B – działaniu 8-bromo-cAMP o stężeniu 1 mM pomiędzy 0⁰⁰ a 4⁰⁰ i światła pomiędzy 1⁰⁰ a 4⁰⁰; 3) gruczoł C – działaniu MG-132 o stężeniu 100 μM pomiędzy 0⁰⁰ a 4⁰⁰ i światła pomiędzy 1⁰⁰ a 4⁰⁰. Gruczoł D stanowił kontrolę i nie został poddany ekspozycji na światło podczas nocy drugiej doby oraz działaniu ww. substancji. Strzałka – przesunięcie fazy rytmu pod wpływem światła

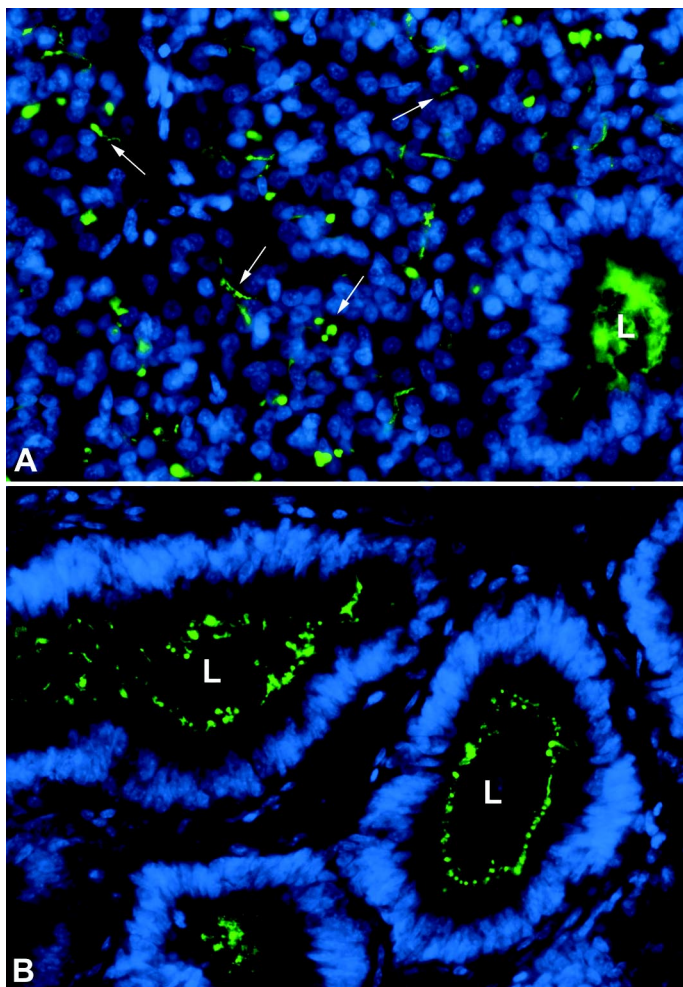


Ryc. 6. Wydzielanie melatoniny z szyszynek indyka hodowanych w przepływie medium przez 4 doby w warunkach cyklu świetlnego (obejmującego fazę jasną trwającą od 7⁰⁰ do 19⁰⁰ i fazę ciemną od 19⁰⁰ do 7⁰⁰) zgodnego ze stosowanym podczas odchowu ptaków (gruczoł A) i cyklu odwróconego – dzień od 19⁰⁰ do 7⁰⁰ (gruczoł B), a następnie przez dwie doby w ciemności

sekrecję melatoniny w trakcie ekspozycji na bodziec oraz powoduje przesunięcie fazy rytmu aktywności oscylatora, które uwidacznia się w trakcie kolejnej doby (ryc. 5). Zapewnia to precyzyjną synchronizację rytmu sekrecji melatoniny w szyszynce ptaków z warunkami oświetlenia w środowisku (ryc. 6). Wymienione dwa efekty oddziaływania bodźców świetlnych na pinealocyty są w znacznym stopniu niezależne od siebie, bowiem są wynikiem aktywacji dwóch różnych torów recepcji i przekazu sygnału (ryc. 3, 5).

Zdolność szyszynki ptaków do odbioru bodźców świetlnych opisał po raz pierwszy Deguchi (9). W oparciu o zależność pomiędzy długością fali świetlnej a jej hamującym wpływem na aktywność AA-NAT wysnuł przypuszczenie dotyczące udziału rodopsyny w procesie fotorecepcji w szyszynce ptaków (9), jednakże nie znalazło to potwierdzenia w późniejszych badaniach (24, 25).

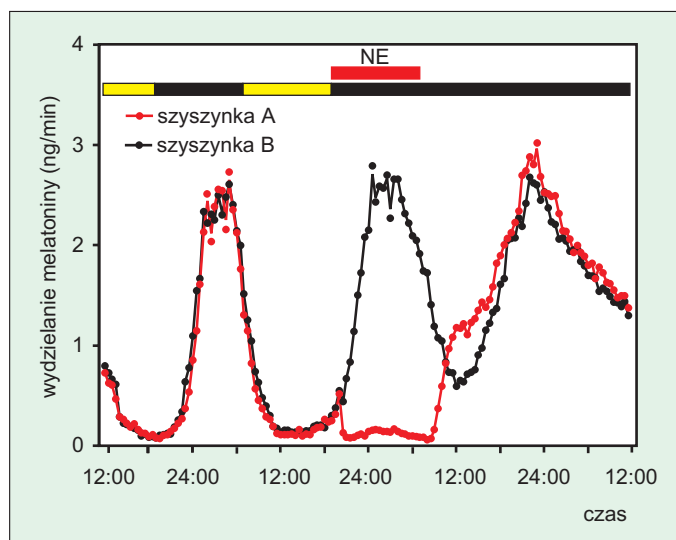
W 1994 roku u kury zidentyfikowano molekułę podobną do rodopsyny, którą jako szyszynkowy ekwiwalent opsyny nazwano pinopsyną (25). Scharakteryzowano gen kodujący pinopsynę i wykazano znaczne podobieństwa w sekwencji aminokwasów do innych pigmentów wzrokowych (18, 24, 25). Jego ekspresję stwierdzono w szyszynce kury i gołębia (15, 25, 31). Niezależnie od pory doby, poziom mRNA pinopsyny w szyszynce kury wzrasta aż sześciokrotnie pod wpływem światła (31). Ekspresja mRNA pinopsyny nie wykazuje cyklicznych zmian w warunkach ciągłej ciemności, dlatego można sądzić, że nie jest kontrolowana przez endogenne oscylatory. W odróżnieniu od mRNA kodującego pinopsynę, zawartość tego pigmentu nie podlega wpływowi światła i generatora rytmu (31). Badania szyszynek kury (24), przepiórki japońskiej (34) oraz indyka (27) wykazały, że pinopsyna występuje w wypustkach wierzchołkowych pinealocytów typu szczątkowo-receptorowego oraz w penetrujących pomiędzy sąsiednie komórki wypustkach pinealocytów wydzielniczych (ryc. 7).



Ryc. 7. Reakcja immunohistochemiczna na obecność pinopsyny w szyszynce 8-tygodniowego koguta (A) oraz indyka (B). Pinopsyna, uwidocznioma w postaci fluorescencji zielonej, występuje w wypustkach wierzchołkowych wydzielniczych pinealocytów typu szczątkowo-receptorowego otaczających światło pęcherzyków (L) oraz w krótkich wypustkach odchodzących od pinealocytów wydzielniczych (strzałki). Fluorescencja niebieska – jądra komórkowe barwione DAPI

Pinopsyna posiada pośrednie właściwości biochemiczne pomiędzy rodopsyną a pigmentami wzrokowymi komórek czopkowych siatkówki oka (18, 25). Maksimum pochłaniania wykazuje dla fal o długości 470 nm, a więc jest najbardziej wrażliwa na światło niebiesko-zielone. Pinopsyna, podobnie jak rodopsyna, zawiera w swym składzie 11-cis-retinal. W przypadku niedoboru witaminy A spadek nocnego poziomu sekrecji melatoniny w pinealocytach kury pod wpływem światła jest znacząco zredukowany, zaś typową fotowrażliwość komórki odzyskują w obecności 11-cis-retinaldehydu (36). Wyniki tych badań wskazują, że pinopsyna pośredniczy w hamującym działaniu światła na sekrecję melatoniny. Jednakże ani obecność, ani też brak retinaldehydu nie zmieniają wpływu światła na funkcjonowanie endogennego oscylatora w pinealocytach kury, co sugeruje udział innego pigmentu w tym procesie.

Ponad 90% pinopsyny kolokalizuje z dwoma typami podjednostek białka G – $G_{\alpha_{1a}}$ i $G_{\alpha_{11a}}$, występującymi również w segmentach zewnętrznych komórek pręcikowych siatkówki oka (17). Są one wrażliwe na toksynę krztuś-



Ryc. 8. Wydzielanie melatoniny z szyszynek indyka w hodowli narządowej przepływowej inkubowanych przez dwie doby w warunkach oświetlenia 12L:12D (dzień od 7⁰⁰ do 19⁰⁰, noc od 19⁰⁰ do 7⁰⁰), a następnie przez jedną dobę w ciemności. Podczas drugiej doby hodowli szyszynkę A poddano działaniu noradrenaliny o stężeniu 10 μM pomiędzy 19⁰⁰ a 7⁰⁰. Szyszynka B stanowiła kontrolę i nie była inkubowana w obecności tej katecholaminy

ca, która blokuje wpływ światła na sekrecję melatoniny w szyszynce kury, jednakże nie hamuje jego oddziaływania na funkcję endogennego oscylatora pinealocytów (40). Stanowi to kolejny dowód, że pinopsyna odgrywa kluczową rolę w hamującym działaniu światła na sekrecję melatoniny, ale nie uczestniczy w oddziaływaniu bodźców świetlnych na endogenne oscylator pinealocytów.

W procesie synchronizacji dobowego rytmu wydzielania melatoniny z zewnętrznymi warunkami oświetlenia wydaje się pośredniczyć inny, niedawno zidentyfikowany fotopigment – melanopsyna (5, 13, 16). Po raz pierwszy wykryto ją w komórkach zwojowych siatkówki ssaków, których aksony dochodzą do SCN i innych jąder podwzgórza (16). U kury wykazano ekspresję genu kodującego melanopsynę w nireceptorowych warstwach siatkówki oka oraz w komórkach szyszynki (5). W szyszynce kury najwyższy poziom mRNA kodującego melanopsynę występuje w nocy, zaś najniższy w dzień (5). Ekspresja genu melanopsyny prawdopodobnie nie podlega wpływowi światła, lecz jest zależna wyłącznie od funkcjonowania oscylatora wewnątrzkomórkowego (13). Lokalizacja melanopsyny w szyszynce ptaków jest nieznana.

W szyszynce ptaków, oprócz barwników światłoczułych, stwierdzono także obecność kilku innych składników systemu fototransdukcji, podobnych do występujących w siatkówce oka. Wykazano występowanie fosfodiesterazy 6 (PDE6), kanałów Ca^{2+} i K^{+} zależnych od cGMP, wiziny, antygeny S, IRBP (interstitial retinol-binding protein) i rekoweryny (14).

Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że podstawowe etapy kaskady regulacyjnej uczestniczącej w odbiorze bodźców świetlnych za pośrednictwem pinopsy-

ny w pinealocytach ptaków są bardzo podobne do występujących w siatkówce oka i powiązanych z aktywacją rodopsyny (14). W szyszynce kury światło, działając na pinopsynę, powoduje izomeryzację cis-retinalu do trans-retinalu, co prowadzi do zmiany konformacji tego fotopigmentu. Inicjuje to aktywację białka G – transducyny, która z kolei stymuluje cGMP-specyficzną PDE6 hydrolizującą cGMP do 5'GMP, co obniża poziom tego wtórnego przekaźnika w komórce (ryc. 3).

Rola cGMP oraz powiązania pomiędzy tym nukleotydem a wielkością sekrecji melatoniny w szyszynce ptaków pozostają nadal w sferze hipotez. Spadek poziomu cGMP powoduje zamknięcie kanałów Ca^{2+} i K^{+} zależnych od cGMP oraz obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{2+} (14). Wydaje się, że spadek stężenia jonów Ca^{2+} może prowadzić do zmniejszenia aktywności cykazy adenylanowej zależnej od kalmoduliny (14) i w konsekwencji – obniżenia w pinealocytach poziomu cAMP, odgrywającego kluczową rolę w regulacji sekrecji melatoniny w pinealocytach ptaków (patrz kolejny rozdział). Niestety, przedstawiona hipoteza nie znajduje pełnego poparcia w wynikach badań, bowiem wpływ światła na sekrecję melatoniny w pinealocytach kury był blokowany przez substancje zmieniające poziom endogenne cGMP, natomiast analogi cGMP nie wpływały na aktywność wydzielniczą tych komórek (39).

Mechanizmy związane z odbiorem bodźców świetlnych za pośrednictwem melanopsyny, w tym powiązania pomiędzy tym pigmentem a endogennym generatorem rytmu pinealocytów, są nieznane.

Rola cAMP oraz jonów wapniowych w regulacji sekrecji melatoniny

Cykliczny AMP odgrywa kluczową rolę w regulacji wydzielania melatoniny w pinealocytach ptaków (ryc. 3), podobnie jak w szyszynkach wszystkich badanych dotychczas kręgowców. Nukleotyd ten uczestniczy w aktywacji sekrecji melatoniny i warunkuje utrzymanie jej podwyższonego poziomu (20, 22, 27, 35, 39).

W szyszynce ptaków wykazano istnienie dobowego rytmu stężenia cAMP analogicznego z rytmem wydzielania melatoniny (21, 22). Poziom cAMP w pinealocytach jest uzależniony, między innymi, od wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} , które wpływają aktywując na cyklazę adenylanową zależną od kalmoduliny (22). Należy podkreślić, że biosynteza tej formy cykazy jest kontrolowana przez endogenne oscylator (6). Światło powoduje spadek stężenia cAMP w komórkach szyszynki ptaków (14, 35, 39). Poziom tego nukleotydu jest również kontrolowany przez szereg neurotransmiterów: noradrenalinę uwalnianą z włókien współczulnych (patrz następny rozdział), wazoaktywny peptyd jelitowy (26) oraz przysadkowy peptyd stymulujący cyklazę adenylanową (7).

Wzrost poziomu wydzielania melatoniny w pinealocytach ptaków stwierdzono pod wpływem analogów cAMP, aktywatora cykazy adenylanowej – forskoliny oraz inhibitorów fosfodiesteraz katalizujących hydrolizę cAMP do 5'AMP (14, 27, 39). W badaniach *in vitro*

wykazano udział kinazy białkowej A w indukcji generowanego endogennie nocnego wzrostu sekrecji melatoniny (20). Cykliczny AMP chroni enzym AA-NAT przed proteolizą proteosomalną (16, 27). Spadek poziomu cAMP pod wpływem działania światła prowadzi do intensywnej degradacji AA-NAT, której konsekwencją jest gwałtowne obniżenie sekrecji melatoniny w pinealocytach. Mechanizm ochrony AA-NAT przed proteolizą u ptaków nie jest znany, jednakże można przypuszczać, że podobnie jak u ssaków enzym ten ulega fosforylacji katalizowanej przez kinazę białkową zależną od cAMP i łączeniu z białkami 14-3-3 (16, 27). Badania prowadzone w warunkach *in vitro* wykazały, że hamujące działanie światła na nocny poziom sekrecji melatoniny w pinealocytach jest blokowane przez 8-bromo-cAMP oraz MG-132 – inhibitor proteolizy proteosomalnej (ryc. 4).

Jony Ca^{2+} wydają się odgrywać znacznie większą rolę w regulacji sekrecji melatoniny u ptaków niż u ssaków, aczkolwiek mechanizmy oddziaływania jonów wapniowych na syntezę hormonu szyszynki nie zostały dokładnie poznane (12, 14, 22).

W pinealocytach kury wykazano obecność napięciowo zależnych błonowych kanałów Ca^{2+} typu L (12), jak również wzrost poziomu sekrecji melatoniny w wyniku działania ich aktywatorów (Bay 8644), a spadek – pod wpływem ich antagonistów (nifendypina, nitrendypina) i chelatorów jonów wapniowych (22, 35, 38). Żaden z wyżej wymienionych czynników nie wpływał na synchronizację rytmu wydzielania melatoniny z warunkami oświetlenia. Dopływ jonów Ca^{2+} przez kanały wapniowe typu L wydaje się regulowany przez cykliczne nukleotydy, m.in. cGMP.

W szyszynce kury opisano również obecność nietypowych kanałów wapniowych 40-pS, zwanych także kanałami I_{LOT} (long open time), które są syntetyzowane i otwarte podczas nocy oraz degradowane w dzień, co może sugerować ich zależność od endogenne oscylatora (8). Pozostaje jednak niewyjaśnioną kwestia, czy i jak kanały te biorą udział w regulacji rytmu sekrecji melatoniny.

Jony Ca^{2+} mogą również uczestniczyć w regulacji funkcjonowania generatora rytmu, przy czym działanie to jest związane głównie z miejscami wewnątrzkomórkowego magazynowania wapnia. Wykazano, że kofeina, która w wysokich stężeniach zwiększa wypływ jonów z wewnątrzkomórkowych zasobów, indukuje synchronizację rytmu sekrecji melatoniny w sposób analogiczny do działania impulsów świetlnych (37). Kwas cyklopiasowy, który blokuje rozprzestrzenianie się jonów Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych, oddziałuje na endogennie generowany rytm sekrecji melatoniny podobnie do działania ciemności (21).

Rola siatkówki, jądra nadskrzyżowaniowego i unerwienia współczulnego w regulacji sekrecji melatoniny

Aktywność szyszynki ptaków jest regulowana nie tylko przez bodźce świetlne odbierane przez nią bezpośrednio ze środowiska zewnętrznego, lecz także przez

światło działające na siatkówkę oka (ryc. 1). Impulsy nerwowe generowane przez siatkówkę w odpowiedzi na działanie światła docierają do jąder podwzgórza, w tym SCN, a stamtąd do pnia mózgu, rdzenia kręgowego, zwoju szyjnego przedniego i dalej włóknami współczulnymi do szyszynki (4, 33). U ptaków, odwrotnie niż u ssaków, noradrenalina jest uwalniana z włókien współczulnych w największych ilościach podczas jasnej fazy doby i działa hamująco na sekrecję melatoniny. Katecholamina ta wpływa na funkcję pinealocytów ptaków poprzez błonowy receptor α_2 -adrenergiczny związany z białkiem G_i hamującym aktywność cykazy adenylanowej (4, 27, 32). Stymulacja receptorów α_2 -adrenergicznych prowadzi do spadku poziomu cAMP i obniżenia aktywności AA-NAT oraz sekrecji melatoniny (ryc. 3, 7). Znaczenie siatkówki oka oraz unerwienia współczulnego w regulacji aktywności szyszynki ptaków wykazuje istotne różnice gatunkowe. Informacje o warunkach oświetlenia, odbierane za pośrednictwem siatkówki, odgrywają ważną rolę w regulacji sekrecji melatoniny u kury (4, 21), natomiast wydają się nieistotne u przepiórki japońskiej (1).

Włókna współczulne docierające do szyszynki ptaków stanowią również drogę oddziaływania oscylatora SCN (i ewentualnie innych generatorów rytmu zlokalizowanych w jądrach podwzgórza, a nawet w siatkówce oka) na aktywność pinealocytów (4). SCN jest głównym generatorem rytmu w mózgu ssaków (16). Struktura oraz funkcja tego jądra u ptaków jest znacznie słabiej poznana, aczkolwiek wyniki dotychczasowych badań wskazują, że również u tej gromady pełni ono funkcję ważnego generatora rytmów okołodobowych (4, 27). U kury domowej SCN kontroluje rytmiczne uwalnianie noradrenaliny z włókien współczulnych szyszynki (4). Znaczenie fizjologiczne oscylatorów zlokalizowanych w SCN, innych jądrach podwzgórza oraz siatkówce w regulacji sekrecji melatoniny w szyszynce ptaków jest słabo poznane. Niemniej, dobowy rytm sekrecji melatoniny, występujący w warunkach *in vivo* powinien być rozpatrywany jako wypadkowa działania przynajmniej dwóch oscylatorów – szyszynkowego i podwzgórzowego oraz dwóch układów fotoreceptorów zlokalizowanych w szyszynce i siatkówce (21, 25, 27).

Piśmiennictwo

- Barrett R. K., Underwood H.: The superior cervical ganglia are not necessary for entrainment or persistence of the pineal melatonin rhythm in Japanese quail. *Brain Res.* 1992, 569, 249-254.
- Bernard M., Guerlotte J., Cogne M., Greve P., Collin J. P., Voisin P.: Transcriptional regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase in the chicken pineal gland: day/night changes and long-term effects of light and darkness. *Biochem. J.* 1993, 290, 661-664.
- Bernard M., Iuvone P. M., Cassone V. M., Roseboom P. H., Coon S. L., Klein D. C.: Avian melatonin synthesis: photic and circadian regulation of serotonin N-acetyltransferase mRNA in the chicken pineal gland and retina. *J. Neurochem.* 1997, 68, 213-224.
- Cassone V. M., Forsyth A. M., Woodlee G. L.: Hypothalamic regulation of circadian noradrenergic input to the chick pineal gland. *J. Comp. Physiol., A Sens. Neural Behav. Physiol.* 1990, 167, 187-192.
- Chaurasia S. S., Provencio I., Jiang G., Hayes W. P., Natesan A., Zatz M., Rollag M. D., Iuvone P. M.: Differential circadian regulation of melanopsin mRNA expression in the avian retina and pineal gland. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004, 45, 46-48.
- Csernus V., Faluhelyi N., Nagy A. D.: Features of the circadian clock in the avian pineal gland. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005, 1040, 281-287.
- Csernus V., Józsa R., Regládi D., Hollósy T., Somogyvári-Vigh A., Arimura A.: The effect of PACAP on rhythmic melatonin release of avian pineals. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2003, 135, 62-69.
- D'Souza T., Dryer S. E.: A cationic channel regulated by a vertebrate intrinsic circadian oscillator. *Nature* 1996, 382, 165-167.
- Deguchi T.: Rhodopsin-like photosensitivity of isolated chicken pineal gland. *Nature* 1981, 290, 706-707.
- Green C. B., Besharse J. C., Zatz M.: Tryptophan hydroxylase mRNA levels are regulated by the circadian clock, temperature, and cAMP in chick pineal cells. *Brain Res.* 1996, 738, 1-7.
- Greve P., Voisin P., Grechez-Cassiau A., Bernard M., Collin J. P., Guerlotte J.: Circadian regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase mRNA in the chicken pineal gland in vivo and in vitro. *Biochem. J.* 1996, 319, 761-766.
- Harrison N. L., Zatz M.: Voltage-dependent calcium channels regulate melatonin output from cultured chick pineal cells. *J. Neurosci.* 1989, 9, 2462-2467.
- Holthues H., Engel L., Spessert R., Vollrath L.: Circadian gene expression patterns of melanopsin and pinopsin in the chick pineal gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 326, 160-165.
- Holthues H., Vollrath L.: The phototransduction cascade in the isolated chick pineal gland revisited. *Brain Res.* 2004, 999, 175-180.
- Kawamura S., Blow N. S., Yokoyama S.: Genetic analyses of visual pigments of the pigeon (*Columba livia*). *Genetics* 1999, 153, 1836-1850.
- Lewczuk B.: Siatkówka, jądro skrzyżowania oraz szyszynka jako elementy zegara biologicznego ssaków. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 506-511.
- Matsushita A., Yoshikawa T., Okano T., Kasahara T., Fukada Y.: Colocalization of pinopsin with two types of G-protein alpha-subunits in the chicken pineal gland. *Cell Tissue Res.* 2000, 299, 245-251.
- Max M., McKinnon P. J., Seidenman K. J., Barret R. K., Applebury M. L., Takahashi J. S., Margolskee R. F.: Pineal opsin: a nonvisual opsin expressed in chick pineal. *Sci.* 1995, 267, 1502-1506.
- Murakami N., Nakamura H., Nishi R., Marumoto N., Nasu T.: Comparison of circadian oscillation of melatonin release in pineal cells of house sparrow, pigeons and Japanese quail, using cell perfusion system. *Brain Res.* 1994, 651, 209-214.
- Nakahara K., Murakami N., Nasu T., Kuroda H., Murakami T.: Involvement of protein kinase A in the subjective nocturnal rise of melatonin release by chick pineal cells in constant darkness. *J. Pineal Res.* 1997, 23, 221-229.
- Natesan A., Geetha L., Zatz M.: Rhythm and soul in the avian pineal. *Cell Tissue Res.* 2002, 309, 35-45.
- Nikaido S. S., Takahashi J. S.: Day/night differences in the stimulation of adenylate cyclase activity by calcium/calmodulin in chick pineal cell cultures: evidence for circadian regulation of cyclic AMP. *J. Biol. Rhythms* 1998, 13, 479-493.
- Okano T., Fukada Y.: Chicktacking pineal clock. *J. Biochem.* 2003, 134, 791-797.
- Okano T., Takanaka Y., Nakamura A., Hirunagi K., Adachi A., Ebihara S., Fukada Y.: Immunocytochemical identification of pinopsin in the pineal glands of chicken and pigeon. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1997, 50, 190-196.
- Okano T., Yoshizawa T., Fukada Y.: Pinopsin is a chicken pineal photoreceptive molecule. *Nature* 1994, 372, 94-97.
- Pratt B. L., Takahashi J. S.: Vasoactive intestinal polypeptide and alpha₂-adrenoceptor agonists regulate adenosine 3',5'-monophosphate accumulation and melatonin release in chick pineal cell cultures. *Endocrinol.* 1989, 125, 2375-2384.
- Prusik M.: Mechanizmy regulujące sekrecję melatoniny w szyszynce indyka. Praca doktorska, UWM w Olsztynie 2005.
- Prusik M., Lewczuk B., Nowicki M., Przybylska-Gornowicz B.: Histology and ultrastructure of the pineal gland in the domestic goose. *Histol. Histopathol.* 2006, 21, 1075-1090.
- Reiter R. J.: Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Rev.* 1991, 12, 151-180.
- Robertson L. M., Takahashi J. S.: Circadian clock in cell culture: II. In vitro photic entrainment of melatonin oscillation from dissociated chick pineal cells. *J. Neurosci.* 1988, 8, 22-30.
- Takanaka Y., Okano T., Iigo M., Fukada Y.: Light-dependent expression of pinopsin gene in chicken pineal gland. *J. Neurochem.* 1998, 70, 908-913.
- Voisin P., Martin C., Collin J. P.: Alpha₂-adrenergic regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase in organ-cultured chick pineal gland: characterization with agonists and modulation of experimentally stimulated enzyme activity. *J. Neurochem.* 1987, 49, 1421-1426.
- Vollrath L.: The pineal gland, [w:] *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, VI/7. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1981.
- Yamao M., Araki M., Okano T., Fukada Y., Oishi T.: Differentiation of pinopsin-immunoreactive cells in the developing quail pineal organ: an in vivo and in vitro immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.* 1999, 296, 667-671.
- Zatz M.: Relationship between light, calcium influx and cAMP in the acute regulation of melatonin production by cultured chick pineal cells. *Brain Res.* 1989, 477, 14-18.
- Zatz M.: Photoendocrine transduction in cultured chick pineal cells. IV: What do vitamin A depletion and retinaldehyde addition do to the effects of light on the melatonin rhythm? *J. Neurochem.* 1994, 62, 2001-2011.
- Zatz M., Heath J. R.: Calcium and photentrainment in chick pineal cells revisited: effects of caffeine, thapsigargin, EGTA, and light on the melatonin rhythm. *J. Neurochem.* 1995, 65, 1332-1341.
- Zatz M., Mullen D. A.: Does calcium influx regulate melatonin production through the circadian pacemaker in chick pineal cells? Effects of nifedipine, Bay K 8644, Co²⁺, Mn²⁺, and low external Ca²⁺. *Brain Res.* 1988, 463, 305-316.
- Zatz M., Mullen D. A.: Photoendocrine transduction in cultured chick pineal cells. II. Effects of forskolin, 8-bromocyclic AMP, and 8-bromocyclic GMP on the melatonin rhythm. *Brain Res.* 1988, 453, 51-62.
- Zatz M., Mullen D. A.: Two mechanisms of photoendocrine transduction in cultured chick pineal cells: pertussis toxin blocks the acute but not the phase-shifting effects of light on the melatonin rhythm. *Brain Res.* 1988, 453, 63-71.
- Ziwnilska J. B., Lorenc A., Berezińska M., Vivien-Roels B., Pévet P., Skene D. J.: Diurnal and circadian rhythms in melatonin synthesis in the turkey pineal gland and retina. *Gen. Comp. End.* 2006, 145, 162-168.

Adres autora: dr Magdalena Prusik, ul. Oczapowskiego 13, 10-713 Olsztyn;
e-mail: mprusik@uwm.edu.pl