Biológiai ritmusok hosszútávú követése kísérletes állatmodellben: circadian és extracircadian ritmusok feltárása.

Megváltozott külső környezet (fényviszonyok, elektromágnesesség, krónikus stressz) hatásai az endocrin rendszerek ritmusaira

Doktori (PhD) értekezés

Oláh András

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bódis József

Programvezető: Prof. Dr. Kovács L. Gábor

Témavezető: Dr. Józsa Rita

Pécsi Tudományegyetem

Egészségtudományi Kar

2008.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke 3

1 ÁLTALÁNOS BEVEZETŐ. ELMÉLETI ALAPFOGALMAK 4

1.1 Biológiai ritmusok 4

1.2 Melatonin szerepe a biológiai ritmusok szabályozásában 6

1.3 Endocrin rendszerek ritmusa 8
1.3.1 A corticosteron ritmusa 8
1.3.2 A prolactin ritmusa 9
1.3.3 Az Endothelin-1 ritmusa 10

1.4 Megváltozott ritmusok hatásai. Ritmuszavarok váltóműszakban. Rövid irodalmi áttekintés 11
1.4.1 A stressz szerepe a ritmuszavarok kialakulásában 13
1.4.2 Váltóműszak és egyes kórképek előfordulási gyakorisága közötti összefüggések 14

1.5 Krónikus enyhe stressz (CMS), állatkísérleti modell 15

2 CÉLKITŰZÉSEK ÉS HIPOTÉZISEK 17

3 VIZSGÁLATI ANYAG ÉS MÓDSZER 19

3.1 Kísérleti állatok 19

3.2 Megvilágítás 19

3.3 Testhőmérséklet vizsgálata 20

3.4 Mintavétel 20

3.5 Hormon-meghatározások 21
3.5.1 A corticosteron meghatározása 21
3.5.2 A melatonin meghatározása 22
3.5.3 A prolactin meghatározása 23
3.5.4 Az Endothelin-1 meghatározása 23

3.6 Adatfeldolgozás, statisztikai módszerek 24
3.6.1 A hormonok ritmusparamétereinek vizsgálata 24

3.7 Krónikus stressz modell (CMS) 25

4 EREDMÉNYEK 27

4.1 A ritmus paraméterek hosszú távú követését lehetővé tevő állatkísérleti modell kidolgozása és a modell segítségével nyert eredmények 27
4.1.1 A kísérleti módszer kidolgozása 27
4.1.2 A testhőmérséklet ritmusának vizsgálata a kidolgozott állatkísérleti modellben 28
4.1.3 A kidolgozott állatkísérleti modell felhasználása a corticosteron ismert napi ritmusa mellett meglévő extracircadian ritmusok vizsgálatára 32

4.1.4 A kidolgozott állatkísérleti modell felhasználása a prolactin napi ritmusa mellett meglévő extracircadian ritmusok vizsgálatára 34
4.1.5 A kidolgozott állatkísérleti modell felhasználása az endothelin-1 extracircadian ritmusának vizsgálatára patkány vérmintákban és az agyalapi mirigyben. Összehasonlítás emberi mintákból nyert irodalmi adatokkal 37
4.1.6 Melatonin napi ritmusa a tobozmirigyben, plazmában és a gyomor-bélrendszerben 40
4.1.7 Éheztetés hatása a melatonin circadian ritmusára 45
4.1.8 Mágneses vihar hatása a melatonin ritmusára 49
4.1.9 Krónikus enyhe stressz hatásai 53

5 ÚJ EREDMÉNYEK ÉS GYAKORLATI HASZNOSÍTÁS 57

6 MEGBESZÉLÉS 59

6.1 Corticosteron ritmusai 59

6.2 A kidolgozott állatkísérleti modell felhasználásával a melatonin ritmusának vizsgálata központi és perifériás szervekben 62

6.3 A kidolgozott állatkísérleti modell felhasználásával a mágneses tér endocrin ritmusokra gyakorolt hatásainak vizsgálata 64
6.3.1 Mágneses vihar 64
6.3.2 A mágneses vihar hatásai 66

6.4 A kidolgozott állatkísérleti modell felhasználásával az extracircadian endothelin-1 termelődés vizsgálata patkány vérplazmában és tobozmirigyben, valamint emberi vérben 67

6.5 A kidolgozott állatkísérleti modell felhasználásával a krónikus enyhe stressz endocrin rendszer ritmusára gyakorolt hatásainak vizsgálata 67

6.6 Különböző változók kronomja: circadian ritmus-akrofázisok eltérő megjelenése. Circadian fázis-térkép laboratóriumi patkányban 68

7 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 70

8 IRODALOMJEGYZÉK 71

9 PUBLIKÁCIÓS LISTA 82

Rövidítések jegyzéke

SCN	nucleus suprachiasmaticus
CRH	corticotrophin-releasing hormon
POMC	proopiomelanocortin
ACTH	adrenocorticotroph hormon
PRH	prolactin releasing hormon
TRH	thyreotrophin-releasing hormon
PIF	prolactin inhibiting factor
DA	dopamin
SST	somatostatin
GABA	gamma-aminovajsav
VIP	vasoactive intestinal polypeptide
ET-1	endothelin-1
NO	nitrogén-monoxid
K. I.	Kockázat Index
HHA	hypothalamo-hypophyseo-adrenocorticalis tengely
PVNm	nucleus paraventricularis medialis
POMS	Profile of Mood States
CMS	chronic mild stress
VF	váltakozó fény
LD/DL	L=Light, D=Dark
HALO	hours after light onset
ZT	Zeitgeber Time
CT	Circadian Time
RIA	radioimmunoassay
H-MEL	human melatonin
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EDTA	etilén diamin tetraecetsav
MESOR	midline estimating statistic of rhythm
CI	confidencia intervallum
GI	gastrointestinalis
Kp	planetáris K index
Dst	geomagnetic equatorial disturbance index
HT	hypothalamus
PIN	corpus pineale
ST	stromy - viharos
Q	quiet - csendes
Φ	acrophase - a ritmus akrofázisa, a fázison belüli legnagyobb érték
CS	corticosteron
FEO	the feeding-entrained oscillator
IMAGE	Imager for Magnetopause to Aurora Global Exploration
BIOCOS	the biosphere int he cosmos
M	male - hím
F	female - nőstény

1 Általános bevezető. Elméleti alapfogalmak

1.1 Biológiai ritmusok

A biológiai ritmusok alapvető célja a megváltozott körülményekhez történő sikeres alkalmazkodás. A biológiai ritmusokkal a kronobiológia és a kronoterápia tudományágak foglalkoznak. A kronobiológia a periódikusan változó tényezők élőlényekre, élőlény-csoportokra vagy akár az ökoszisztémákra gyakorolt hatását - annak mechanizmusát és következményeit vizsgáló tudomány. A kronofarmakológia ugyanezen periódikusan változó tényezők és a gyógyszerhatások összefüggéseit hivatott feltárni.

A biológiai és élettani folyamatok nagy része természetes ritmusoknak megfelelően változik. Az ember napi biológiai ritmusát három tényező határozza meg: a külső ingerek (Zeitgeberek) és azok intenzitása, a belső biológiai óra és a test belső állapotai [1]. A sejtszintű szabályozás a test összes sejtjében kifejeződik az óragének működése révén (endogen ritmus). Időtartamuk szerint többféle biológiai ritmus ismert, ultradian (gyors, másodpercek alatt lezajló, pl. szívritmus), circadian (kb. 24 óránként ismétlődő), semicircadian ritmus (kb. 12 órás), illetve infradian ritmusok is, mint a circasemiseptan, circaseptan, circannualis (több napos/hetes/éves vagy szezonális) ritmusok. Egy adott szerv vagy hormon esetében lehet többféle ritmusról beszélni, mint pl. a gonadotroph hormonok pár percig tartó ritmusa mellett ismertek a circadian és az úgynevezett évszaki ritmusok is. Ezeket a ritmusokat sejtszinten az úgynevezett óragének vezérlik, de a ritmusok összerendezésében, szinkronizációjában az úgynevezett centrális óra (pacemaker) irányít. A centrális pacemaker az emlősök esetén a nucleus suprachiasmaticus (SCN), madarak esetén ez nem egységes, vannak fajok, ahol a corpus pineale az elsődleges központ.

A természeti ritmusok sokfélesége közül elsősorban a nap-éj ritmus gyakorol hatást a szervezetre, melyet a szem segítségével érzékelünk. A napfény és más környezeti tényezők mindennapi állandóságukkal segítenek a circadian ritmus pontos

beállításában. A biológiai óra rendszer külvilággal kapcsolatot tartó legfőbb eleme a retina, ahol a fényérzékeny receptorok találhatók. Innen indul a tractus retino-hypothalamicus, mely az SCN idegsejtjein végződik és azok ritmusgeneráló működését befolyásolja. Az SCN kb. 10000 neuronból áll, melyek az agy középvonalában, mindkét oldalon megtalálhatók [2]. Ha ezek a neuronok megsérülnek, a napi ritmus felborul. Eltávolítása után az úgynevezett szabadon futó ritmus (free running) jön létre, a sejtszintű órák össze-vissza „ketyegnek" [3; 4].

A circadian ritmusokat az SCN szinkronizálja, mely az agy számos más területével (hypothalamus, vegetatív idegi központok, tobozmirigy, hypophysis) kapcsolatban áll, így szabályozva többek között a testhőmérsékletet, a táplálékfelvételt, az endocrin rendszerek működését vagy az alvás-ébrenlét ciklusát is. Az SCN-ből az információ eljut a tobozmirigyhez is, ahol a fény által keltett inger szabályozza a melatonin termelését. A circadian ritmusok szabályozásában a fénynek van elsődleges szerepe, de egyéb tényezők (hőmérséklet, elektromágneses sugárzás, táplálkozás, kémiai hatások stb.) is jelentős szereppel bírnak [1]. Az SCN működését a fentieken kívül számos neurotransmitter és egyéb, még nem teljesen ismert faktorok modulálják [5]. Számos tényező befolyásolja a ritmusgörbét, változtatja a ritmus nagyságát (amplitudó), fázisát és a ritmusközépértéket (mesor), vagyis erősít vagy gyengít.

A legtöbb ember természetes circadian ritmusa kicsivel több, mint egy nap, mintegy 25 óra [6]. A környezeti tényezők befolyása nélkül, az emberi test circadian ritmusának hullámzása körülbelül egy napos periódussal hosszabbodna meg hosszútávon. Egészséges emberben a különböző circadian ritmusok összhangban vannak, a biológiai ritmus tényezői a reggeli időszakban általában regresszív görbét mutatnak, délután a ritmusgörbe emelkedik, este pedig hanyatlik [7; 8]. A testhőmérséklet például az alvás utolsó óráiban kezd emelkedni, éppen csak az ébredést megelőzően. Ez elősegíti a reggeli éberség kialakulását. Este a testhőmérséklet csökken, előkészítve a szervezetet az alvásra. A hőmérséklet csökkenése délután 2 és 4 óra között is megjelenik, ami magyarázhatja, miért érzik sokan álmosnak magukat kora délután [9]. Habár még nem bizonyították, hogy a testhőmérséklet változásai határozzák meg alvási szokásainkat, a kettő között azért kapcsolat mutatkozik.

A szaporodásban szerepet játszó hormonoknak is különböző ritmusai ismertek. A gonadotroph hormonoknak is több ritmusa létezik: az infradian ritmus, mely kb. 30 naponta ismétlődő alacsony frekvenciájú ritmus; a diurnalis ritmus, a napszakonként változó gonadotroph szekréció ritmusa; a pulzációs ritmus: a néhány óránként megjelenő nagy frekvenciájú pulzusok; a női gonadok ciklikus működéséért is az azokat szabályozó hormonok ritmusa a felelős [10].

A biológiai ritmusok alapvető életműködéseket jellemeznek (vérkeringés, légzés), melyek a szervezet egyensúlyát (homeostasis) és a környezethez való alkalmazkodást biztosítják. Szinte minden élettani folyamatnak van(nak) ritmusa(i), mely a legtöbb szerv, szervrendszer esetén egyidejűleg párhuzamosan több, különböző ritmusidejű működési ritmicitást jelent. A periódusidő külső környezeti tényezők hatására csak szűk határok között változik, a ciklusok fázisai viszont könnyen befolyásolhatók és ez tobozmirigy szöveteken *in vitro* is bizonyított [11]. A ritmusok és a ritmuszavarok vizsgálatának éppen ezért nagy jelentősége van, többek között azért is mert a mindennapi életben a munkavállalók több mint egyharmadára gyakorolnak hatást a munkahellyel összefüggő munkarend változással kapcsolatos ritmuszavarok, amelyek gyakran különböző betegségekhez vezetnek.

1.2 Melatonin szerepe a biológiai ritmusok szabályozásában

A harmadik agykamra mögött elhelyezkedő tobozmirigy a diencephalonhoz kapcsolódik, melatonint termel, amely a circadian ritmusok szabályozásában fontos humorális szabályozó. A ritmus szabályozásában a melatonin a szervezet számára a sötétség szignálját jelenti. A melatonin szintézise fényfüggő, sötétedéskor megnő a vérszintje, elindítva ezzel egy sor olyan folyamatot, mely a szervezetet előkészíti az éjszakai állapotra. A melatonin circadian ritmusa, miután a szintézisét és a kidobását a fényviszonyok irányítják (külső Zeitgeber a fény), mind a diurnalis, mind a nocturnalis emlősöknél a sötét periódusban mutatja a legmagasabb értékeket [12; 13]. A vegetatív idegrendszerre hatva a sympathicus, illetve a parasympathicus idegrendszeren keresztül serkenti vagy gátolja a különböző működéseket. Érdekesség, hogy a rénszarvasokra nem jellemző a gerincesek legtöbbjénél meglévő

circadian ritmus, vagyis az, hogy a nap egy részét ébren, másik, egybefüggő részét alvással töltik. Ehelyett aktivitásszintjük napszaktól függetlenül, szabályos időközönként rövid időre lecsökken (szundikálnak), majd újra visszaáll. Vérvizsgálatokkal igazolták, hogy a rénszarvasok vérében igen alacsony a napi ritmus fenntartásában jelentős melatonin szintje. Hasonló jelenség a madárvilágban is tapasztalható, pl. a baglyok esetében [14].

A corpus pineale jelentőségére, melyet Descartes még a lélek központjának tartott, először a múlt század végén figyeltek fel kórosan korai nemi érést mutató betegeknél, ahol az esetek nagy részében daganatos elváltozást találtak a tobozmirigyben. Az is kiderült, hogy a kor előrehaladtával csökken a mirigy hormontermelése.

A melatoninnak azóta számos élettani hatása ismert, szinte mindenben szerepet játszik, ami a ritmusokkal összefügg: szabályozza az alvás-ébrenlét folyamatokat, javítja a szív-keringési rendszer működését, fokozza a szervezet immunvédekezését, egyes rosszindulatú daganatos betegségek kezelésében adjuváns hatású, véd a szabadgyökök sejtkárosító hatása ellen, mérsékli az időzónák átlépéséből, illetve a több műszakos munkavégzésből adódó zavarokat stb.

Nemcsak a melatonin képződés és kibocsátás ritmusa, de az általa vezérelt más circadian ritmusok is zavart szenvednek számos neurodegeneratív folyamatban és endocrin zavarok esetén is. A hétköznapi életben legismertebb a melatonin-ritmus zavara jet-lag során és a váltóműszakban dolgozóknál. Váltóműszakban dolgozóknál leggyakoribb, hogy alvás- és közérzetzavar jelentkezik [15; 16; 17; 18], melyek hátterében többnyire nem szervi okok, hanem a külső tényezők és életmódváltozások következtében ritmus deszinkronizáció áll. A váltóműszak rövid- illetve hosszútávon más-más psychosomaticus elváltozások megjelenéséhez is vezethet [19; 20]. Számos közlemény vizsgálatai dokumentálják a gyomor-bél traktus-, a szív-keringési rendszer betegségeinek [21] és a daganatos megbetegedéseknek [22] nagyobb gyakoriságát, valamint a koraszülések nagyobb kockázatát [23] váltóműszakban dolgozók esetén. Ezen kutatások hosszú követéses időtartamban, több országban történő vizsgálatok, melyek a váltóműszakban hosszabb ideig dolgozóknál követik

az elváltozások megjelenésének gyakoriságát különböző országok populációjának vizsgálatával.

A fentiek alapján merült fel a kérdés, hogy a váltóműszak esetén mely tényezők, milyen mértékben és mely mechanizmusok révén vezethetnek el a megbetegedésig. Az elsődleges kérdés, a circadian és extracircadian ritmusparaméterek feltárása, a szabályozásban résztvevő gének (és fehérjék) szabályozó mechanizmusainak feltárása, ezt követően a ritmuszavarok hátterének tisztázása (bemeneti- és kimeneti oldal).

1.3 Endocrin rendszerek ritmusa

Már régóta ismert, hogy az élő szervezetben lejátszódó élettani folyamatok egyik fő szabályozója a hormonrendszer. Az is ismert, hogy ezen folyamatok ritmusosságot mutatnak.

1.3.1 A corticosteron ritmusa

A hypothalamus nucleus paraventricularis-ban termelődő CRH (corticotrophin-releasing hormon) az ún. POMC (proopiomelanocortin) polipeptid hasításával szabadítja fel a glycocorticoidot mobilizáló ACTH-t (adrenocorticotroph hormon) és a β-endorfint a hypophysisben. A mellékvese glycocorticoid hormontermelése (patkányban corticosteron) az ACTH irányítása alatt áll. A hypothalamo-hypophysealis rendszeren keresztül sokféle tényező befolyásolhatja a mellékvesék működését: így fájdalomingerek, betegségek, de akár a psychosocialis stressz is fokozza a hormontermelést, ezáltal elősegíti a szervezet fokozott igénybevételéhez történő alkalmazkodását.

A vizsgálatunkban szereplő corticosteron napi ritmusa az ötvenes évek óta ismert, a glycocorticoidok napi ritmusát embernél és különböző állatfajoknál egyaránt kimutattak (madaraknál ismert az évszaki ritmusa is). Felmerült a kérdés, hogy az

ismert napi ritmus mellett léteznek-e más ritmusok is ugyanezen hormon esetén. Továbbgondolva, kérdéses, hogy egyfajta éjszakai műszakot modellezve, a megvilágítási viszonyokat megfordítva, a hormontermelés, illetve a biológiai ritmus is megváltozik–e. Tehát az éjszakai műszak vagy egyéb műszakrendek változatai hogyan befolyásolják szervezetünk ritmusait. A kísérletet terveink szerint a későbbiekben követni fogja éjszakás műszakban, illetve többféle műszakrend szerint dolgozó ápolók csoportján végzett hormon, illetve egyéb paraméterek megfigyelésére kiterjedő (hangulati élet, vérnyomás, pulzusszám, hőmérséklet) vizsgálat, de ennek elvégzése előtt állatkísérlet keretében kívántuk modellezni a különféle műszakrendeket és vizsgálni azok lehetséges hatásait a biológiai ritmusokra. Egy ilyen tervezett vizsgálat jelentőségét abban látjuk, hogy segítségével pontosabb képet kaphatunk az éjszakai és váltott műszakrendek élettani hatásairól, és eredményeink segítségével szeretnénk meghatározni a legoptimálisabb műszakrendek jellemzőit.

A glycocorticoidok circadian ritmusa ismert, a ritmusvizsgálat jelentőségét mégis az adja meg, hogy a glycocorticoidok számos folyamat regulációjában vesznek részt, pl. cukor-, zsír-, fehérje anyagcsere, immunrendszer működésének szabályozásában, az érzelmi és tudati élet szabályozásában résztvevő agyi struktúrák befolyásolásában, így ezen folyamatok ritmusaira is kihatással vannak. A corticosteron, mint transcripcios faktor sejtszinten mélyreható változásokért felelős. Távoli célunk a corticosteron ritmusparamétereinek vizsgálata váltóműszakban, hiszen az általuk befolyásolt folyamatokra is kihatnak a ritmus zavarai.

1.3.2 A prolactin ritmusa

A prolactin (PRL) az agyalapi mirigy által termelt egyik hormon. A prolactin szerepe a reprodukcióban (laktáció, corpus luteum működés szabályozása, az anyai magatartás kialakítása, illetve fenntartása), a homeostasis regulációjában, az immunválaszokban /celluláris és humorális/, az osmoregulációban (Na^+ transzport serkentése, K^+ transzport gátlása), valamint az angiogenesis gátlásában egyaránt jelentős. A prolactin egyfajta stresszhormonnak is tekinthető abban az értelemben, hogy akut fizikai vagy psychosocialis stressz gyors, jelentős és átmeneti prolactin

elválasztáshoz vezet, bár a stressz-hatás ismétlődése után az ingerre refrakter állapot jelentkezik. A krónikus stressz a prolactin elválasztását csökkenti és ezt dopamin antagonistával (haloperidol) fel lehet függeszteni. Az újabb megfigyelések alapján egyértelműnek tűnik a prolactin immunstimuláns szerepe is. A prolactin ritmust külső és belső tényezők szabályozzák, ezek közül jelentős szerepe van a fénynek. A serkentő hatások a PRL-t termelő sejtekhez a PRL-releasing faktorokon (PRH-prolactin-releasing hormon; TRH-Thyreotrophin-releasing hormon; oxytocin; neurotensin), a gátló hatások a prolactin-gátló faktorokon (PIF) jutnak el (ilyen gátló faktorok: a dopamin (DA), somatostatin (SST) és a gamma-aminovajsav (GABA)). Új adat, hogy a paracrin, illetve autocrin szabályozásban részt vesz az agyalapi mirigyben lokálisan termelődő endothelin-1 is, mely gátolja a PRL kidobást. A serkentő és a gátló faktorok ritmusát, a PIF és a PRH circadian ritmusát a SCN neuronjai szabályozzák a VIP (vasoactive intestinal polypeptide) transmitterrel, melyet a retinából a magba érkező fényimpulzusok aktiválnak [24; 25; 26].

1.3.3 Az Endothelin-1 ritmusa

Az erek belső felszínét borító endotheliumról az utóbbi 20 évben bebizonyosodott, hogy nemcsak egy egyszerű sejtsor, hanem egy autocrin-paracrin szerv, amely szabályozza az érfal contractilitását. Egyidejűleg érintkezve a keringő vérrel és az érfallal, az endothelium kölcsönhatásban van mindkét oldalról érkező celluláris és hormonális mediátorokkal. Az erekben és a szívben képződő peptidek közül a legutóbbi évtizedben megkülönböztetett érdeklődés középpontjába kerültek az endothelinek. A hatóanyag, melyet Yanagisawa munkatársaival együtt eredetileg 1988-ban izolált [27] malac endothelsejt tenyészetből, az endothelin-1 (ET-1), mely a 21 aminosavat tartalmazó peptidek családjának (ET-l, ET-2, ET-3) egyik tagja. A leghatásosabb közülük az ET-1, melyet az endothelium sejtjei szelektíven választanak el, míg a szervezet többi szövetei (igen kevés kivétellel) szintén szecernálnak endothelineket - a három izoformot együtt, váltakozó arányban.

Az endothelin-1-nek többféle funkciója van, legismertebb az erek falában lévő simaizmokra gyakorolt paracrin hatás, mely vasoconstrictiot okoz. A vesében is

vasoconstrictiót okoz, csökken a glomerulus filtrációs ráta és a Na^+ kiválasztás is. Számos szervre hat, végső soron vérnyomás emelkedéshez vezet, így az egyik kulcsfontosságú tényező a magas vérnyomás kialakulásának folyamatában. Az endothelin termelésre számos faktor hat. Az endothelin-szint zavarának következménye a magas vérnyomáson kívül a szív működési zavarai, érelmeszesedés, a tüdőkeringés romlása, koszorúér megbetegedés, stb. Tehát klinikailag jelentős faktor, melynek mérését gyakran alkalmazzák az ismertetett kórformákban. Az endothel által termelt nitrogén-monoxid (NO) protektív hatást biztosít az érelmeszesedéssel és a vasoconstrictióval szemben, az endothelin-1 pedig az NO antagonistája és ismert a prolactin-szekréciót gátló hatása is. A NO-rendszer és az ET-1 közötti egyensúly megbomlása szerepet játszhat a hypertonia pathogenezisében. Az endothelin-1 tulajdonképpen az endothel funkció egyik markere. Humán vonatkozásban a leginkább ismert és széleskörűen vizsgált ritmusok a szív-érrendszer ritmusai. A magas vérnyomás betegségben a ritmus-amplitúdó csökkenése, de főként a napi értékek kisfokú változékonysága jelentős rizikófaktor egy súlyosabb infarktus vagy stroke prognózisában. Ismert az is, hogy hypertonia esetén az ET-1 fokozottan expresszálódik [28, 29].

Az ET-1 tekintetében a kisszámú irodalmi adatok alapján humán vérben nem található circadian ritmus. Jelen vizsgálatunkban először patkány vérmintákban és az agyalapi mirigy szöveteiben néztük meg, hogy milyen ritmuskomponensekkel jellemezhető a napi változása.

1.4 Megváltozott ritmusok hatásai. Ritmuszavarok váltóműszakban. Rövid irodalmi áttekintés

A váltóműszakkal kapcsolatosan nagyon sok és sokrétű vizsgálat folyik a világ minden részén, melynek áttekintése csak a teljesség igénye nélkül lehetséges a jelen dolgozatban. Néhány példával mégis illusztrálható, milyen jellegű következményei vannak a váltóműszak által fellépő ritmuszavaroknak.

Dél-Koreában, váltott 3 műszakos munkarendben dolgozó férfiak esetében a vizelet catecolamin és cortisol szintje, valamint a szubjektív fáradtságérzet összefüggéseinek vizsgálata során azt tapasztalták, hogy a váltott műszaknak 5 évnél kevesebb ideig kitett férfiak esetén a norepinephrin, epinephrin és a dopamin koncentráció a fáradtsággal szorosan összefügg, míg az 5 vagy több éve dolgozóknál nem lehetett szignifikáns mértékű pozitív korrelációt kimutatni [30]. Egy Ausztráliában elvégzett vizsgálat során a műszakforgás ápolókra gyakorolt pszichikai és élettani hatásait vizsgálták. Az eredményeik alapján élesen kirajzolódik, hogy a 40 évnél idősebb dolgozók esetén a türelem és figyelem csökken, továbbá aggasztó hatásai vannak az alvászavarok kialakulására [31]. West és munkatársai [32] megfigyelték, hogy a munka minősége romlást mutat a két műszak váltását követően, mert ilyenkor a napi funkciók ritmusváltása elkerülhetetlen. Megfigyelték azt is, hogy a tartósan nappal vagy tartósan éjszakai műszakban dolgozók munkája hatékonyabb, mint a gyakoribb váltásokban dolgozóké, feltehetően azért, mert kevesebb ritmusváltásnak vannak kitéve.

Az Egyesült Királyságban vizsgálták a circadian ritmusok munkahelyi balesetekre gyakorolt hatásait. A szerző a Kockázat Index (K. I.) használatával a munkahelyi ártalmak és balesetek relatív kockázatának meghatározásával törekedett a műszakkockázat felmérésére. A vizsgálatot 24 órán keresztül végezték 3 műszakban. Ezen vizsgálat eredménye szerint a munkahelyi balesetek kockázatának akrofázisa (maximum kockázat) az éjfél körüli időszakra tehető. A megfigyelések azt mutatták, hogy ezen időtartományban jelentős a reakcióidő növekedés, az egyszerű feladatok elvégzését nagyfokú bizonytalanság és csökkent koncentráció jellemzi [33].

Az eddigiekből nyilvánvalónak érezzük, hogy a ritmikus biológiai folyamatok működésének tanulmányozása a korszerű biológiai kutatások egyik legígéretesebb területe. Ahhoz, hogy egy biológiai folyamatot megismerjünk, annak működési hibáit korrigálhassuk, egy megfelelő biológiai modell és alkalmas módszerek kellenek. Korábban e területen elsődleges témák a női gonadális ciklus működésének, valamint a mellékvesekéreg hormonelválasztásának vizsgálatai voltak. A tobozmirigyet, melyet sokáig "idejétmúlt, felesleges" szervnek véltek, az utóbbi időben a napi és szezonális biológiai ritmusok egyik legfontosabb karmesterének tartják [34].

1.4.1 A stressz szerepe a ritmuszavarok kialakulásában

A stressz egyik legfőbb jellemzője csaknem minden esetben a glycocorticoidok (patkányban a corticosteron) szintjének emelkedése a vérben, a hypothalamo-hypophyseo-adrenocorticalis (HHA) tengely útján. A stresszorok a hypothalamust, azon belül a nucleus paraventricularis medialis (PVNm) parvicellularis részét aktiválják. A PVNm-hez vezető utak közül egyet pontosan azonosítottak, az ún. „immun-stressz" pályáját pontosan leírták [35]. Az, hogy a többi stresszor milyen úton aktiválja a HHA tengelyt, még nem teljesen ismert.

A szociáldemográfiai háttér, a stresszterheltség, a különböző psychosomaticus tünetek, egészségmagatartás, gyógyszerfogyasztás, érzelmi megterhelés és társas támogatás terén egy ápolókra kiterjedő hazai vizsgálat megállapítja, hogy bizonyos psychosomaticus tünetek, a rendszeres alkoholfogyasztás, trankvillánsok és altatók szedése, valamint az erős dohányzás alkalmas indikátorai az ápolók stresszterheltségének. Különösen veszélyeztetettek a szakképzetlenek, az 51-60 évesek, illetve a három műszakban dolgozók. Az ápolók munkahelyi körülményeinek és a psychosomaticus egészségi állapotuk összefüggéseinek vizsgálatakor pedig arra a következtetésre jutottak a szerzők, hogy az ápolók psychosomaticus egészsége nagymértékben függ munkahelyük psychosocialis jellemzőitől [36; 37; 38].

Egyes vizsgálatok szerint a Sürgősségi Betegellátó Osztály ápolói megterhelőbbnek érzik munkájukat az általános ápolóknál és több stresszt érzékelnek, reggeli cortisol szintjük pedig szignifikánsan alacsonyabb, míg a reggeli és délutáni cortisol koncentráció közötti eltérés esetükben alacsonyabb, mint az általános ápolóknál. Nem volt eltérés a két csoportban a délutáni nyál cortisol szint között [39].

A nem munkából származó stresszhatásokon (különböző élethelyzetek, a szülői szerepből származó követelmények, stb.) túlmenően a munkavégzés hatásaira is egyre inkább ráirányul a figyelem. A minőségi ápolói munkafeltételek biztosítása épp ezért válhatott fontosabb céllá az elmúlt években. A teljes munkaidős ápolóknak

nagyobb az esélye (rizikója) a munkavégzéstől függő egészségügyi probléma kialakulására a munkakörnyezeti hatásoknak való nagyobb kitételükből adódóan. A mentális egészséget érintő zavarok manapság felveszik a versenyt a mozgásszervi betegségekkel a munkavégzésből adódó rokkantság előidézésében. Következésképpen a megterhelő munkahelyi környezet hatásának felmérése egyre inkább fontos kutatási tevékenységgé válik. Megvannak a munkahelyi stressz mérésének megfelelő eszközei, a legszélesebb körben használt Karasek munka megerőltetés modellje és Siegrist erőfeszítés-jutalom-kiegyensúlyozottság modellje [40; 41]. Az ápoláskutatásban az Ápolói Munka Index használt, mint ápolás specifikus mértéke a munkahelyi környezetnek [42].

1.4.2 Váltóműszak és egyes kórképek előfordulási gyakorisága közötti összefüggések

Összehasonlítva azokat az ápolókat, akik sohasem dolgoztak éjszakai műszakrend szerint azokkal, akik 15 vagy több éve dolgoznak éjszakai műszakban, 50%-kal alacsonyabb a Parkinson kór rizikója. Az alvási időintervallum pozitív kapcsolatot mutat a Parkinson kór rizikójával. A vizsgálat szerint a hosszabb alvási idő korai jele is lehet a Parkinson kórnak [43].

Scott és mtsai azt találták, hogy növelheti az éjszakai világítás a mellrák kockázatát azáltal, hogy elnyomja a tobozmirigy normál éjszakai melatonin termelését, mert vizsgálatuk során bebizonyosodott, hogy a mellrák kockázata megnőtt azoknál az alanyoknál, akik gyakran nem aludtak az éjszakának azon periódusában, amikor a melatonin szint tipikusan a legmagasabb. A kockázat nőtt az éjszakai műszakban végzett munkaórák heti számának növekedésével [44].

A coping stratégiákra irányuló vizsgálat szerint az ápolók gyakran élnek az ún. „fehér hang" technikával, az üzenetrögzítő, sötétítő függönyök (redőnyök) használatával annak érdekében, hogy javítsák a nappali alvás minőségét és mennyiségét. Emellett testmozgást is végeznek és emelt koffein fogyasztással próbálják éjszakai teljesítményüket javítani. Körükben igen gyakoriak az autóbalesetek és azon helyzetek, amelyek majdnem balesetben végződnek, a

munkahely felé vezető úton vagy a munkahely elhagyásakor, és ez jelentős közegészségügyi kockázattal jár [45].

Egy másik kutatásban az éjszakai műszak hatását vizsgálták Profile of Mood States (POMS) használatával. Öt POMS dimenzió circadian ritmicitást mutatott: jókedv élénkség(vigor)-aktivitás, fáradtság-tehetetlenség (inertia), zavarodottság-csodálkozás, barátságosság és totális hangulatzavar. Ez az öt dimenzió érzékenynek mutatkozott az életmód minták változásaira, circadian ritmusukban fáziseltolódást mutatva akkor, amikor a vizsgálati alanyoknál váltakoztak a nappali és éjszakai életmódminták. Azok az alanyok, akik "négy nap munka, három nap pihenés" beosztással dolgoztak, hasonló fáziseltolódásokat mutattak, mint azok az alanyok, akik „nyolc munkanap, hét nap pihenés" beosztásban dolgoztak, ami arra utal, hogy a hangulatváltozás az éjszakai rotáció negyedik napján következik be. A szerzők szerint az „elkötelezettség" az éjszakai életmód minták iránt hatással van az ápoló hallgatók éjszakai műszakokhoz való alkalmazkodására, a hangulat vonatkozásában [18].

A nagyobb stressznek kitett ápolók nagyobb kockázatot viselnek arra nézve, hogy ciklusaik hosszabbak és monofázisosak lesznek. A rotációs műszakminta összefüggésbe hozható a rövidebb ciklusok és az inadekvát luteális fázisok nagyobb arányú előfordulásával, összehasonlítva azokkal az ápolókkal, akik nappal vagy éjszaka állandó műszakokban dolgoznak. Tehát a menstruációs funkcióra hatással lehetnek a stresszes munkahelyi állapotok [46].

1.5 Krónikus enyhe stressz (CMS), állatkísérleti modell

Számos közlemény szolgáltat adatot arra vonatkozóan, hogy a stressznek jelentős szerepe van a humán depresszív kórformák kialakulásában, melyekben kimutatható a megváltozott kronóm (idő-struktúra), főként a circadian ritmus deszinkronizációja. Humán depresszív kórképben a ritmuszavar megléte a biológiai óra malfunkciójára utal [47]. Váltóműszakban nemcsak a megvilágítási rendek gyakori változtatása,

hanem a krónikus stressz is feltehetően jelentős egészségkárosító rizikófaktor. A váltóműszakban dolgozóknál circadian ritmuszavar a testhőmérséklet, vérnyomás, mozgás-aktivitás, psyches állapot és az endocrin rendszer zavaraiban is kimutatott [17; 44; 48; 49; 50].

A krónikus stressz okozta ritmuszavarok precíz mechanizmusa kevéssé ismert. Feltehetően celluláris és molekuláris szinten történnek változások, melyek az idegi plaszticitást is megváltoztatják. A közölt módszerek és ebből következően az adatok is sokszor ellentmondásosak, amely megnehezíti a depresszió kronopatológiájának megértését és kísérletes modellezését is. Az irodalomból ismert CMS (chronic mild stress) állatkísérleti protokoll [51; 52; 53] elfogadott modellje a depressziónak. A CMS modellben a váratlan stresszorok ismételt alkalmazása corticosteron szint emelkedéshez vezet [54; 55], de csökkenést is leírtak [56]. Az ellentmondás adódhat abból is, hogy részletes ritmometriai analízis ezekben a közleményekben nem szerepel.

2 Célkitűzések és hipotézisek

- **A ritmus paraméterek hosszú távú követését lehetővé tevő állatkísérleti modell kidolgozása.** A cél, olyan állatkísérleti modell felállítása, melyben a váltóműszakban is meglevő paraméterek közül az eltérő fényviszonyok és a stressz biológiai ritmusokra gyakorolt hatása hosszabb követési idő alatt is vizsgálható. Feltevésünk szerint, az ellentétes megvilágítási renddel több napos 24 órás profil vizsgálható kimerítő éjszakai fennmaradások nélkül úgy, hogy az egy napnál hosszabb infradian ritmus jellemzőit szintén fel lehet tárni a kizárólag nappali órákban történő mintavételekkel.

- Speciális ritmus-elemző program alkalmazásával, **a maghő és a corticosteron, mint ritmus-marker vizsgálata a modell-kísérletben alkalmazott eltérő megvilágítási rendekhez történő szinkronizáció bizonyítására**.

- A modell felhasználása **a corticosteron ismert circadian ritmusa mellett meglévő egyéb ritmusparamétereinek vizsgálatára, mindkét nemben.**

- **A plazma prolactin circadian és circasemiseptan ritmusának vizsgálata patkányban.** A modell felhasználása annak megállapítására, hogy vajon a prolactin ismert napi ritmusán túlmenően a patkányokban megtalálható-e infradian ritmus 7 napos időintervallumban, valamint arra is keressük a választ, hogy van-e nemek közötti különbség a ritmusparaméterek tekintetében.

- **Az endothelin-1 ritmusparamétereinek vizsgálata patkány vér- és szövetmintákban, valamint emberi vérben. A cél annak tisztázása, hogy az endothelin-1 koncentrációk napi változása mutat-e ritmicitást.**

- A kidolgozott állatkísérleti modell **felhasználása a krónikus enyhe stressz endocrin rendszer ritmusára gyakorolt hatásainak vizsgálatára**.

- **A modell felhasználása annak megállapítására, hogy miként alakul a melatonin szint a 24 órás circadian periódusban a patkány különböző szöveteiben.** Kérdésként merül fel, hogy a modell segítségével patkányok esetében megvizsgálható-e, hogy az emlősök bélrendszerének működésében fellelhetők-e olyan változások, melyek alapján „a zero circadian amplitúdó" feltételezést, vagyis azt, hogy nincs napon belüli ritmus, el lehet vetni. A melatonin szint időbeli változásait vizsgáljuk a duodenumban, ugyanazon állatok tobozmirigy szövetében és vérmintáiban is. A melatonin-szintek ritmusparamétereinek elemzésével arra keressük a választ, hogy a duodenumban található melatonin a vérből felvett és ott tárolt, vagy helyben képződött hormon-e, valamint azt, hogy a centrális illetve a perifériás szövetekben található melatonin ritmusa miként viszonyul egymáshoz.

- **Az állatkísérleti modell felhasználása a tobozmirigy és a duodenum melatonin szintek ritmusparamétereinek összehasonlítására éheztetést követően**. A kérdésfelvetés alapja az a hipotézis, mely szerint a gyomor-bélrendszer működésének ritmusát elsődlegesen nem a fényviszonyok, hanem a táplálkozás stimulusai szabályozzák.

- **Az állatkísérleti modell felhasználása a Föld eletromágneses terének a biológiai ritmusokra gyakorolt hatásának vizsgálatára.** A kérdésfeltevés alapja az a ma már elfogadott tény, hogy a napkitörések befolyásolják a Föld körüli magnetoszférát, mely továbbhatva megváltoztatja az ionoszférát. A Földön az elektronikai berendezések zavarai ezt egyértelműen bizonyítják. Az viszont, hogy az élő szervezetre milyen hatással van, szinte alig ismert. A hosszútávú mintavételi módszer lehetővé teszi, hogy a biológiai ritmusok esetleges megváltozását detektálni tudjuk.

3 Vizsgálati anyag és módszer

3.1 Kísérleti állatok

Kísérleteinkben azonos korú felnőtt beltenyésztett Wistar (Amsterdam) patkányokat használtunk. Az általunk kidolgozott állatkísérleti modell szerint két, egymással ellentétes megvilágítású szobában helyeztük el az állatokat, és a kísérletek megkezdése előtt 1 hónapig zavartalanul hagytuk őket. Az állatokat ugyanazon feltételek mellett tartottuk (ellenőrzött hőmérséklet-, páratartalom-, fényerősség), szabad víz- és táplálékfelvételük biztosított volt minden helyiségben, kivéve az éheztetési kísérletet, melyben az éheztetett állatoktól megvontuk a táplálékot leölés előtt 2 nappal. Az állatokat nemek szerint külön-külön ketrecben tartottuk, egy ketrecbe 3 állat került.

3.2 Megvilágítás

Két ellentétes megvilágítású szobában (1. ábra) helyeztük el a véletlenszerűen kiválasztott Wistar patkányokat, azonos számú hímet és nőstényt egyaránt. Az egyik szobában a napszaknak megfelelő fény-sötét periódusban tartottuk az állatokat 12 órás megvilágításban és ezt követő 12 órás sötétben (LD), a másik szobában fordított megvilágítási rend szerint (DL). Az LD és DL az angol megfelelő szavak elfogadott rövidítése (L=Light, D=Dark). A fényerő a ketrecek felett 750 lux volt. LD megvilágítás esetén (I. szoba) a normál kinti napszakhoz igazodva a fény bekapcsolása reggel 6.00 h-kor történik, a sötét szak 12 óra múlva, este 18.00 h-kor kezdődik (LD= 12 h fény (Light): 12 h sötét (Dark) periódus). A másik helyiségben (II. szoba) a megvilágítási rend fordított, azaz a világos szakasz este 18.00 h-kor kezdődik és másnap 06.00 h-ig tart (DL= 12 h sötét (D): 12 h fény (L) periódus). Mindkét helyiségben fényszabályozó lett felszerelve, mely a fény be- ill. kikapcsolását automatikusan vezérli.

A kísérletek a nap egy-egy adott időpontjában történtek. Az időpont nemzetközileg elfogadott jelölése a megvilágítás kezdetéhez viszonyítva történhet, melyet „HALO" (hours after light onset, azaz hány órával a bekapcsolás /HALO 0/ után), vagy a ZT (Zeitgeber time) alapján használnak a közleményekben. Megadható a szubjektív nap órái szerint is, akkor CT (Circadian Time) a jelölés. Jelen dolgozatunkban a HALO illetve a CT megjelöléseket használjuk.

3.3 Testhőmérséklet vizsgálata

Mielőtt elhelyeztük az állatokat a fordított megvilágítású szobában, elvégeztük a testhőmérséklet mérést, az állatok maghőmérsékletének akrofázisa az LD feltételeknek megfelelő ritmust mutatta.

Minden kísérlet megkezdése előtt elvégeztük a ritmus-markerként alkalmazott testhő méréseket annak ellenőrzésére, hogy a fordított megvilágítási rendhez történő adaptáció megtörtént-e: a szinkronizáció igazolására egy teljes napon keresztül (24 óra) 4 óránként testhőmérsékletet mértünk rectalisan, digitális hőmérővel, mindkét szobában tartott állatokon (LD és DL). Egy adott időpontban mindig 2-2 állatot mértünk. A 6 mérés a 24 órás ciklust lefedte, a 7. minta az első mérési időpont másnap történő megismétlésével készült. A testhő méréssel nyert adatokat cosinor ritmus analizátor programmal kiértékeltük. A cosinor ritmus analizátorral történő vizsgálata során külön is vizsgáltuk a hím és nőstény egyedeket mindkét megvilágítási rendben. Paraméter teszttel összehasonlításra kerültek a hím és nőstény patkányok circadian jellemzői, mindkét megvilágítási rendben.

3.4 Mintavétel

Minden kísérlet megkezdése előtt, az egy hónapig tartó adaptáció után, a kidolgozott állatkísérleti modellnél meghatározottak szerint megtörtént a maghőmérséklet mérése, majd ezt követően a vér corticosteron mérését is elvégeztünk a 24 órán át 4

óránként (4 állat/időpont) gyűjtött vérmintákból 28 beltenyésztésű Wistar patkánynál (14 hím és 14 nőstény) az LD és a DL szobában egyenlően elosztott állatoknál. Ez utóbbi vizsgálatnál is az volt a cél, hogy a corticosteron ismert circadian ritmusa igazolható-e, vajon a hormonszintek igazolják-e azt, hogy az állatok alkalmazkodtak az ellentétes megvilágítási feltételekhez. Csak ennek igazolása után kezdtük meg a hosszabb időtartamú mintavételeket a két szobában tartott többi állattal.

A kísérletekben – a szinkronizáció igazolása után – már csak napi 3 alkalommal, munkaidőben történt a mintavétel, 4 óránként (HALO 2, -6, -10, mely a CT idő szerint 9-; 13-; 17 h, illetve ugyanez a közleményekben az óraátállítások miatt értelemszerűen 8- 12- 16 h). Vér- és szövetmintákat gyűjtöttünk az ellentétes megvilágításban tartott csoportokban 7 napon keresztül. A kísérletektől függően napi 3 mintavétellel egy adott időpontban 2 hím és 2 nőstény állat került felhasználásra mind az LD, mind a DL szobából. Az éheztetési kísérleteknél ez a szám megkétszereződött, a kontroll és az éheztetett csoportok állatszámát figyelembe véve. A vérmintákat gyors éter-altatásban szívpunctioval nyertük (2 ml/állat), ezt követően a mintát tartalmazó csöveket a lehető legrövidebb idő alatt jégre tettük. Ezután a vért 20 percen át 4˚C-on centrifugáltuk (4000 rpm), majd a plazmát leválasztottuk, a későbbi mérésekhez szétosztottuk 50-200 µl-ként, majd -70 ˚C-on tároltuk. A kivéreztetés után cervicalis dislocatio-t követően eltávolítottuk az agyat, az agyalapi mirigyet, a tobozmirigyet, valamint néhány esetben a duodenumot is, a szöveteket tartalmazó csöveket azonnal száraz jégbe tettük A minták feldolgozásáig a szöveteket is -70 ˚C-on tároltuk.

3.5 Hormon-meghatározások

3.5.1 A corticosteron meghatározása

A corticosteron koncentrációt radioimmunoassay–val (RIA) határoztuk meg plazmából. 5 µl szérum és100 µl assay buffer keverékét (ASB: 0,5 M PBS) foszfát-pufferelt sóoldat mely 1 g/l zselatint és 1 g/l Na-azidot tartalmaz, pH 7,4) extraháltuk 1 ml dietil-éterrel. Az extraktumhoz 1,25 ml ASB-t adtunk, amiből két paralel

meghatározást végeztünk. Minden cső 2 µl mintát tartalmazott, melyhez 12 000 cpm tríciummal jelölt corticosteront (NEN, NET-399 1,2,6,7-3 H Corticosterone, 90-120 Ci/mmol) és 15 nl/cső CS-RCS-57 antitestet (az Anatómiai Intézetben készített, 1:47 000 végső hígításban használt) adtunk, végtérfogat 700 µl volt. Standardként gyári (Calbiochem) corticosteront használtunk 9-mintás szériában 15-4000 fmol koncentrációkban. Egy éjszakán át 4°C-on történő inkubáció után a kötött és szabad steroidokat szétválasztottuk (dextránhoz kötött charbachol). A rádióaktivitást mértük liquid scintillációs rendszerben. Az antitest 19%, 7,1%, 5,5%, 5,1% és 3,0%-os keresztreakciót mutatott progesteronnal, dezoxicorticosteronnal, testosteronnal, 20α-dihydroprogesteronnal ill. androstendionnal, külön-külön. Más természetes steroidok az antitesttel <1 % keresztreakciót mutattak. Az inter- és intra-assay coefficiens variáció 9,2% és 6,4 % volt.

3.5.2 A melatonin meghatározása

A meghatározásig a vér- és a szövetmintákat -70 ˚C fokon tároltuk. A melatonin szint meghatározása RIA módszerrel történt [57] a plazmából és metanolos, illetve kloroformos extrakció után a hypothalamusból, a tobozmirigyekből és a duodenumból. Az assay és az extrahálási eljárás a pozsonyi egyetem (Univerzita Komenskeho v Bratislave) Physiologiai Intézetével kollaborációban történt. A RIA és az extrakció validitását ugyanitt igazolták már a korábbi eljárások során. Az extrakció hatékonyságát humán melatonin (H-MEL) hozzáadásával teszteltük a szövet mintákból, ami 80% körüli keresztreakciót adott. A radioimmunoassay vizsgálat során juh melatonin-antiszérum (G/S/704-8485, Stockgrand Ltd., Guildford, UK) és ^{3}H-jelölt melatonin (fajlagos aktivitás - 0.925–1.85 TBq/mmol; NEN Life Science Products, Bad Homburg, Germany) került felhasználásra. Az adatok elemzése cosinor analízissel történt a circadian eltérés egyirányú elemzési módszere szerint, a cosinor eredmények paraméter teszttel kerültek összehasonlításra.

3.5.3 A prolactin meghatározása

A prolactin mérése RIA-val történt. A RIA eljáráshoz használt kit alkalmazása egy korábbi közleményben meghatározottak szerint történt [58]. Chloramine-T eljárást használtunk a jódozáshoz és protein A-t (BactASorb, Human Rt, Gödöllő) a kötött és szabad hormon elválasztáshoz. Adatrögzítéshez és a kalibrációs görbe analíziséhez LKB Clinigamma software-t használtunk. Az intra- és interassay variáció 10%, illetve 14% volt. A prolactin-assay érzékenysége 0.5 ng/ml patkány plazma, patkány prolactin RP-3 standard (25 pg PRL)–hoz viszonyítva. 50 µl szérumot használtunk mintánként. Minden mintából duplikátum készült.

3.5.4 Az Endothelin-1 meghatározása

Meghatározása ELISA módszerrel történt. A módszertani részben ismertetettek szerint vett vérmintát 1%-os aprotinint és 0.01% EDTA-t tartalmazó fiziológiai sóoldattal összekeverve jégen tároltuk. Az alvadásban gátolt vért centrifugáltuk (4000 rpm, 20 min), majd a további tárolás -20 °C-on történt. A vérvételt követően dekapitálás után eltávolítottuk az agyalapi mirigyet, amit szárazjégben, majd -20 °C-on tároltuk a mérésig. Az ET-1 méréséhez ELISA ET-1 kit-et használtunk (Biomedica, Magyarország). A kithez tartozó protokollok közül, az „A" protokollt a vérmintákhoz a „B"-t az agyalapi mirigy mintákhoz használtuk. Az analízis cosinor programmal történt.

3.6 Adatfeldolgozás, statisztikai módszerek

3.6.1 A hormonok ritmusparamétereinek vizsgálata

Az adatokat egyszerű és összetett cosinor módszerrel lineáris és nem lineáris ritmometriával és paraméter tesztekkel analizáltuk (http://www.msi.umn.edu/~halberg/introd/biom.html).

A cosinor analízis szoftwer számszerűsíti a ritmusparamétereket: a MESOR-t (midline estimating statistic of rhythm), ritmus becsült középértékét az időstukturált modellhez igazítva, a dupla amplitudó-t (2A), a legmagasabb és a legalacsonyabb értékek változásának mértékét egy cikluson belül, vagyis a cikluson belüli legnagyobb változás mértékét, és az akrofázis-t (acrophase (ϕ), azt az időpontot, melyre a legmagasabb érték esik és minden ciklusban visszatér, a fázist (period (τ)) amely egy adott ritmus egy ciklusát adja. A DL-ben tartott állatok akrofázisának 180^{o}-os megfordításával nyert adatot használtuk az LD-ben tartott állatok akrofázisaival való összehasonlításakor. Az adatok összátlagát hím- és nőstényállatoknál külön-külön is vizsgáltuk, mindegyik megvilágítási rendben egyszerű és/vagy csoport-átlag cosinor szerint. Paraméter-teszteket alkalmaztunk a circadian akrofázisok összehasonlítására. A paraméter tesztek két adott időpont, vagy két különböző csoport circadian ritmusparamétereinek összehasonlítására alkalmas P-értékeket adja meg. Paraméter teszttel és az összetett cosinor programmal így pl. összehasonlítottuk a hím és nőstény patkányok circadian ritmusának jellemzőit a két megvilágítási rendből egész nap vett mintákból. A nemek közötti különbségek igazolására az átlag-értékek %-t is kiszámoltuk, mindkét szobából felhasznált mindkét nemnél.

A programmal az eredeti adatok $\log_{10}$-transzformálás után is kiértékelhetők, melyek a varianciák kiegyenlítésével adják meg a relatív adatokat. A didaktikusabb felhasználhatóság kedvéért az adatok szórását $\log_{10}$-transzformálás segítségével normalizáltuk (relatív értékek), de az eredeti adatok elemzését is feltüntettük.

3.7 Krónikus stressz modell (CMS)

Vizsgálatainkkal, az általunk kidolgozott ellentétes megvilágítási rendre alapozott állatkísérleti modell alkalmazásával azt kívántuk megvizsgálni, hogy a krónikus enyhe stressz önmagában alkalmazva és ismétlődő változó megvilágítási rendekkel kombinálva, miként befolyásolja a ritmusparamétereket adott hormonok esetén. A megvilágítási rendeket aszerint választottuk, hogy reprezentálják a váltóműszakban leggyakrabban alkalmazott megvilágítási rendeket. A CMS protokoll lényege, hogy az állatokat a hét minden napján előre ki-nem-számítható rendszerben, különböző stresszorokkal (ketrec megdöntése /40°/; vizes alom; folyamatos éjszakai megvilágítás; ismeretlen csoport és zsúfoltság; fényhatás /stroboscop – 300 villanás/perc/; hanghatás /~90 dB/; hideg hatás /4°C/) ingereljük 4 héten át [53]. Ez idő alatt az állatok lassan elvesztik érdeklődésüket a kezdetben preferált ízekhez, melyet a heti egy alkalommal (szerdánként 08.00 h-tól 11.00 h-ig) végzett cukor-fogyasztási (1%-os cukor vs. víz) és cukor-preferencia vizsgálattal követtünk. A cukor-teszt előtt 17 órával elvettük a táplálékot és a vizet is. Minden héten egyszer testsúlyokat is mértünk. A 4. hét után az állatokat leöltük, és a vérből corticosteron, testosteron és serotonin koncentráció méréseket végeztünk.

Modelleztük az ápolói munkakörrel kapcsolatos leggyakoribb műszakrendeket (4 munkanap 3 szabadnap; 8 munkanap 6 szabadnap; 2 munkanap 2 szabadnap) és a különböző műszakrendeknek megfelelő megvilágítási viszonyok közé helyeztünk megközelítőleg azonos életkorú 108 Wistar patkányt. *1. csoport:* kontroll csoport, LD megvilágítási rend: 12 óra fény és 12 óra sötét periódus. Ez a csoport teljesen elkülönítve a többi csoporttól, izolált szobában lett elhelyezve (n=6 hím, n=6 nőstény). *2. csoport:* LD megvilágítási rend, krónikus enyhe stressznek kitett állatok (n=6 hím, n=6 nőstény). *3. csoport*: 3 nap LD, 4 nap DL megvilágítási rend, krónikus enyhe stressznek kitett állatok (n=6 hím, n=6 nőstény). *4. csoport:* 6 nap LD, 8 nap DL megvilágítási rend, krónikus enyhe stressznek kitett állatok (n=6 hím, n=6 nőstény). *5. csoport:* 2 nap LD, 2 nap DL megvilágítási rend, krónikus enyhe stressznek kitett állatok (n=6 hím, n=6 nőstény). *6. csoport:* LD megvilágítási rend az állatok nem voltak krónikus enyhe stressznek kitéve (n=6 hím, n=6 nőstény). *7. csoport:* 3 nap LD, 4 nap DL megvilágítási rend, az állatok nem voltak krónikus enyhe stressznek kitéve (n=6 hím, n=6 nőstény). *8. csoport:* 6 nap LD, 8 nap DL

megvilágítási rend, az állatok nem voltak krónikus enyhe stressznek kitéve (n=6 hím, n=6 nőstény). *9. csoport:* 2 nap LD, 2 nap DL megvilágítási rend, az állatok nem voltak krónikus enyhe stressznek kitéve (n=6 hím, n=6 nőstény).

4 Eredmények

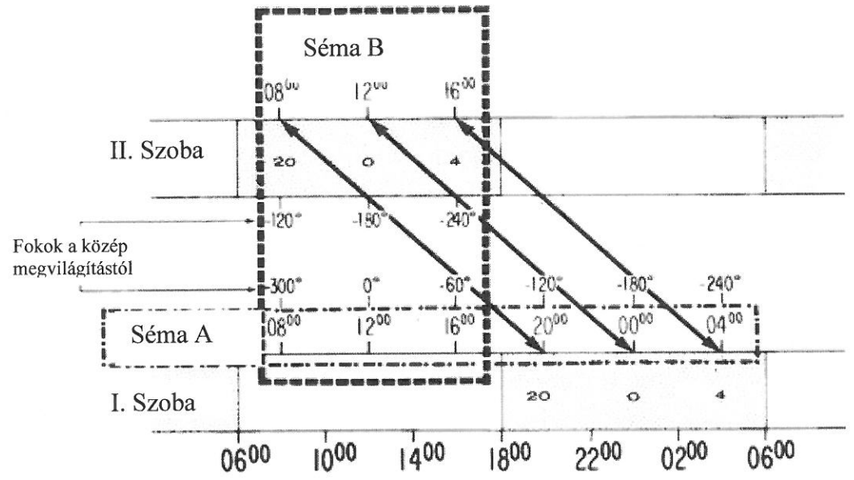
4.1 A ritmus paraméterek hosszú távú követését lehetővé tevő állatkísérleti modell kidolgozása és a modell segítségével nyert eredmények

4.1.1 A kísérleti módszer kidolgozása

Az állatkísérleti modellünk lényege az, hogy hosszabb követési távon technikailag megoldható legyen, hogy munkaidőben a teljes circadian profilt vizsgálni tudjuk. Az 1. ábrán az ellentétes fény-sötét periódusokra (normál: LD és megfordított: DL) alapozott fáziseltolódás sematikus rajza látható, mely modellünk alapjául szolgál. A vizsgálati anyag és módszerben részletezett elképzelés szerint az állatkísérleti modellünk akkor működőképes, ha a két különböző megvilágítási feltételben tartott állatok esetén megvalósítható úgy a mintavétel, hogy a teljes napi profil lefedett legyen anélkül, hogy éjszaka is mintákat gyűjtsünk. Tekintve, hogy hosszútávú megfigyelés volt a cél, egy vagy két hétig minden éjszaka fennmaradni technikailag nehezen lett volna kivitelezhető. Ahhoz, hogy csak nappal, munkaidőben lehessen ezt megoldani, két, egymástól teljesen elkülönített helyiségre volt szükség. Az egyikben (I. szoba) a normál kinti napszakhoz igazodik a fény bekapcsolása (reggel 6.00 h-kor) míg a sötét szak 12 óra múlva, este 18.00 h-kor kezdődik (LD megvilágítási rend). A másik helyiségben (II. szoba) a megvilágítási rend fordított (DL), azaz a világos szakasz este 18.00 h-kor kezdődik és másnap 06.00 h –ig tart.

Egy teljes napi, azaz 24 órás követés - ami legalább 4 óránkénti, tehát 24 óra alatt 6 alkalommal történő mintavételt kíván – munkaidőben csak úgy válik kivitelezhetővé, ha a mintavétel napi 3 alkalommal történik (4 óránként) és egy adott időpontban mindkét csoportból vesszük a mintákat (egyszerre, egy adott időpontban mind az LD-ben, mind a DL-ben tartott állatok közül 1-1 állat kerül felhasználásra). Csak egy példa az 1. ábra alapján: ha reggel 08.00 h-kor a DL-ben tartott állatokat is figyelembe vesszük, az megfelel a 12 órás eltolódásnak, azaz olyan, mintha este

20.00 h-kor vettünk volna mintát. Így könnyen átlátható, hogy az LD és DL megvilágításból a 12 órás fáziseltolódás miatt egyszerre két időpontot is nyerhetünk.



1. ábra Állatkísérleti modellünk két megvilágítási rendje. A két szobában 12-órás a fáziseltolódás a normál (LD) és a fordított (DL) megvilágítási rend szerint.

Mielőtt a két különböző megvilágítású helyiségekbe helyeztük az állatokat, a maghőmérsékletek circadian ritmusának akrofázisa megegyezett, majd a szinkronizációs időszakot követően 180 fokos (12 órás) eltolódást találtunk a DL-ben tartott állatoknál. Az ellentétes megvilágítási rendhez történő szinkronizációt természetesen minden kísérlet megkezdése előtt ellenőriztük. Az eredményeinket az alábbiakban részletezzük [59].

4.1.2 A testhőmérséklet ritmusának vizsgálata a kidolgozott állatkísérleti modellben

A maghőmérséklet circadian ritmusának tesztelésére 6 mérési időpontot használtunk. Ezzel igazolni tudtuk mindkét szobában tartott állatoknál az ismert circadian ritmus meglétét ($P<0,05$), valamint a DL szobában tartott állatoknál az akrofázis eltolódást. A testhőmérés eredménye egyúttal a módszer validitását is igazolta, ezért ezt a vizsgálatot minden további kísérlet megkezdése előtt elvégeztük 24 állaton, 6

méréssel, 4 óránként, 24 óra alatt, az LD és a DL megvilágítási rendben tartott állatoknál. Minden adott időpontban 4 állatnál történt a mérés.

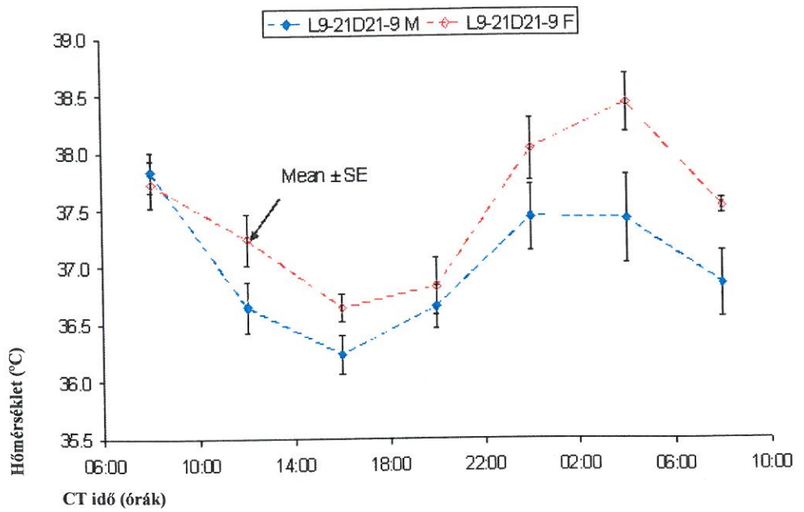
Ebben a fejezetben csak az első két alkalommal nyert adatok összesített elemzését mutatjuk be.

A circadian ritmus csoportszinten egyértelműen statisztikai szignifikanciával ($P<0,05$) igazolódott. Paraméter teszttel megállapítottuk, hogy a nőstény patkányok maghőmérsékletének MESOR értéke magasabb, mint a hímeknél, ahogy azt a 6 időpontos mérés igazolta (LD: 37,2 °C vs. 36,8 °C, F=3,189, P=0,096; DL: 37,5 °C vs. 37,0 °C, F=5,547, P=0,038). Az egyes állatok akrofázisainak összehasonlító vizsgálata – a megvilágítási rendhez igazítva – statisztikai szignifikáns egybeesést mutatott a hímeknél (F=5,812, P=0,035) de a nőstényeknél nem (F=0,289, P=0,600). Ez arra utal, hogy az állatok egyedileg is teljesen szinkronizálódtak a saját megvilágítási rendjükhöz hímek esetén. Nőstények esetén nagyobb volt az egyéni variáció az akrofázisok esetén, noha csoportszinten igazolódott a két eltérő megvilágításhoz való szinkronizáció. A nagyobb egyedi variáció magyarázata feltehetően az, hogy a nőstények kevésbé érzékenyek a külső hatásokra mint a hímek. (1. táblázat)

világítás	nem	N	PR(%)	P	M	±SE	2A	(95%CI)	ø	(95%CI)
LD12:12	hím	7	58,7	0,031	36,8	0,2	1,26	(0,49;2,04)	-206	(-174,-253)
LD12:12	nőst.	9	53,3	0,008	37,2	0,2	1,32	(0,68;1,95)	-234	(-213,-257)
DL12:12	hím	6	64,5	0,012	37,0	0,2	1,46	(0,76;2,16)	-69	(-57,-91)
DL12:12	nőst.	7	79,1	0,007	37,5	0,1	1,75	(1,03;2,48)	-62	(-31,-87)

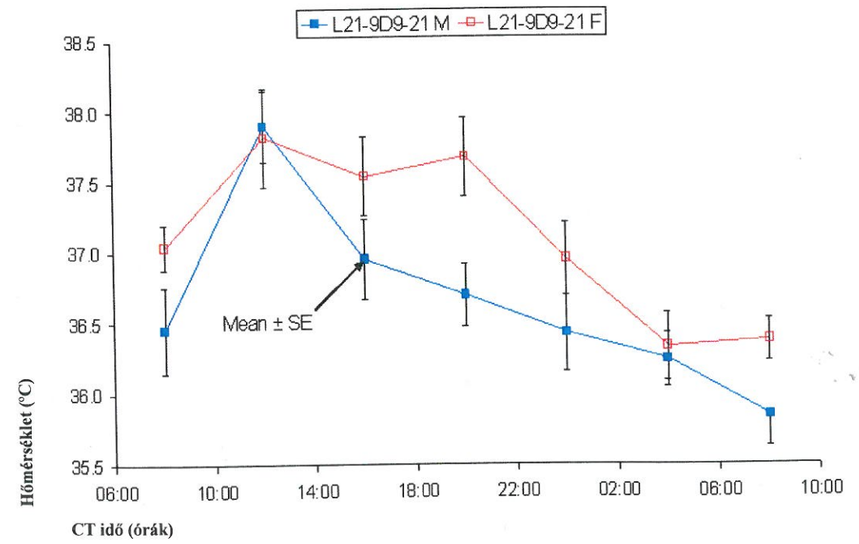
1. Táblázat A maghőmérséklet napi ritmusa hím és nőstény patkányokban.

Az 1. táblázat eredményeit tekintve elmondható, hogy mindkét megvilágítási rend (LD és DL) esetén a nőstényeknél (nőstény: n=16, hím: n=13) kissé magasabb a ritmus-középérték (M, MESOR). Az adatok azt is megmutatják, hogy fáziseltolódás (**ø**) van az LD és DL értékekben, azaz a legmagasabb hőmérséklet időpontja 12 órával eltolódott. Hímek esetében méréseknél LD-ben: -206° az eltérés, DL-ben:-69°. Ugyanitt nőstényeknél LD-ben: -234° az eltérés, DL-ben: -62°.



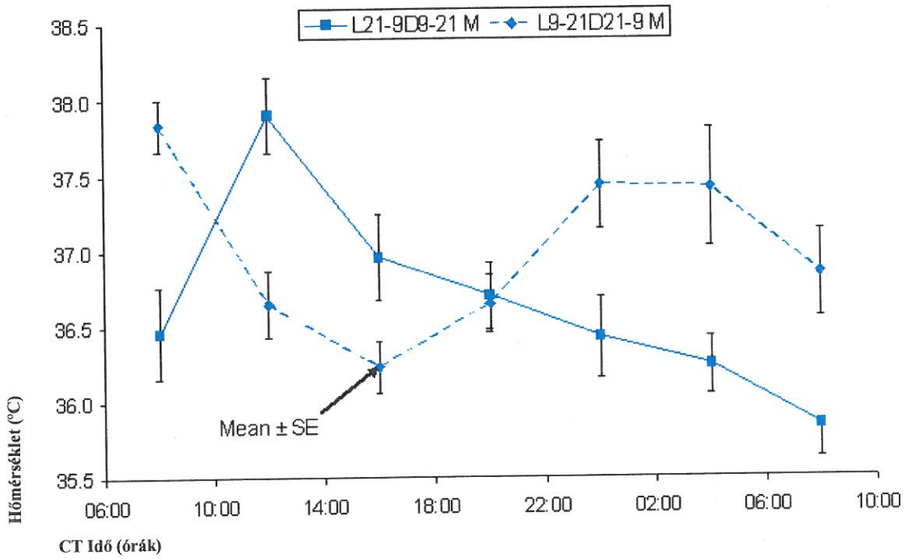
2. ábra A normál megvilágítású (LD) csoportba tartozó patkányok maghőmérsékletének napi ingadozás nemenként (M=hím, F=nőstény).

A 2. ábrán az LD csoportban 7 időpontban mért testhőértékek átlaga alapján készült diagram látható (kék színnel a hím, piros színnel a nőstény állatok értékei alapján). Az egy időponthoz rendelt érték 4 állat testhő-átlaga. Az átlagértékek ábrázolásával jellegzetes kétfázisú sinus-görbe látható, a legmagasabb értékek az éjszakai aktivitás periódusában vannak. A nőstény állatok testhőmérséklete magasabb, mint a hím állatoké (LD: P=0,060).



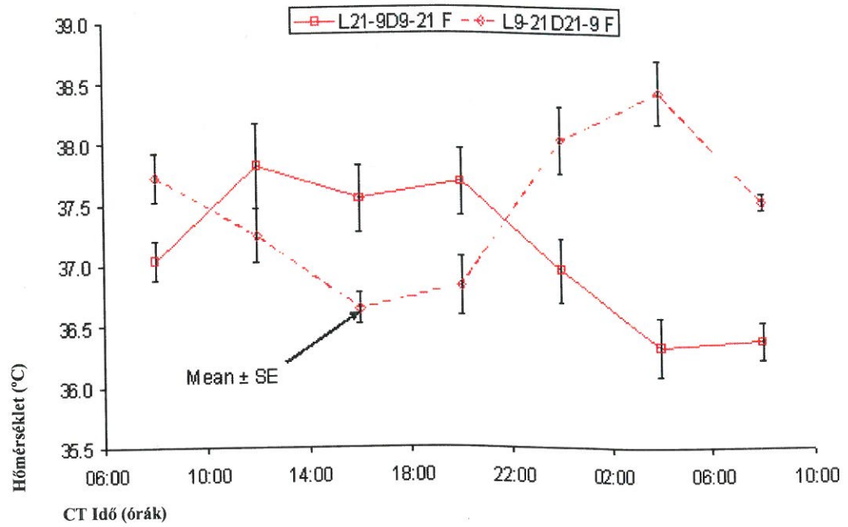
3. ábra A fordított megvilágítású (DL) csoportba tartozó patkányok maghőmérsékletének napi ingadozása nemenként (M=hím, F=nőstény).

A DL csoportban a megfordított fényviszonyoknak megfelelően a délelőtti órákban (ám a számunkra a HALO idő szerinti éjszakai időszakot jelentő fázisban) találhatóak a magasabb értékek (3. ábra). A nőstény állatok testhőmérséklete (piros színnel feltüntetve az ábrán) itt is magasabb, mint a hím állatoké (DL: P=0,028). Nőstények esetében ciklustól függetlenül végeztük a mérést, de az adatok arra utalnak, hogy a ritmus tendenciáját nem befolyásolja az, hogy a ciklus mely szakaszában vannak az állatok.



4. ábra A testhő napi ingadozásának összehasonlítása LD és DL megvilágításban tartott hím állatok esetében. (M=hím)

A maghőmérséklet átlagértékeinek ábrázolásakor jellegzetes kétfázisú sinus ritmus látható, a legmagasabb értékek az aktivitás periódusában, a sötét szakaszban vannak. Az előző két diagram alapján két csoport értékeit egy ábrán illusztráljuk (4. ábra), így még egyértelműbben látható, hogy megfordult a ritmusgörbe mintázata a DL csoportban. A nőstény állatok esetében az eredmények a hím állatok esetében kapott eredményekkel megegyezően alakultak [60]. (5. ábra)

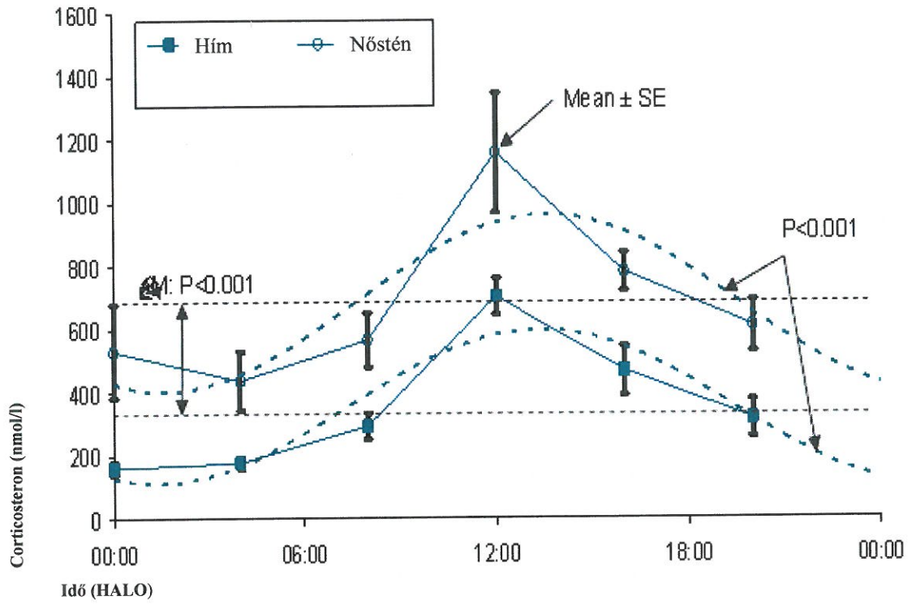


5. ábra A nőstény patkányok mindkét csoportjának (LD, DL) napi testhőingadozásának összehasonlítása. (F=nőstény)

4.1.3 A kidolgozott állatkísérleti modell felhasználása a corticosteron ismert napi ritmusa mellett meglévő extracircadian ritmusok vizsgálatára

4.1.3.1 A corticosteron circadian ritmusának igazolása

A hosszútávú, több napos követés előtt az ellentétes megvilágítási rendhez való adaptációt ellenőriztük a corticosteron circadian ritmusának kimutatásával is mindkét megvilágítási rendben. Ehhez 24 órán át 4 óránként mintavétel történt mindkét csoportnál (LD és DL). A circadian ritmusparaméterek egyedi vizsgálatakor 4 csoportból 3-ban szignifikáns ($P<0,05$) eredményt kaptunk mindkét megvilágítási rendben tartott állatok esetében, az LD csoport nőstény állatai kivételével.



6. ábra A corticosteron circadian ritmusa hím és nőstény patkányokban.

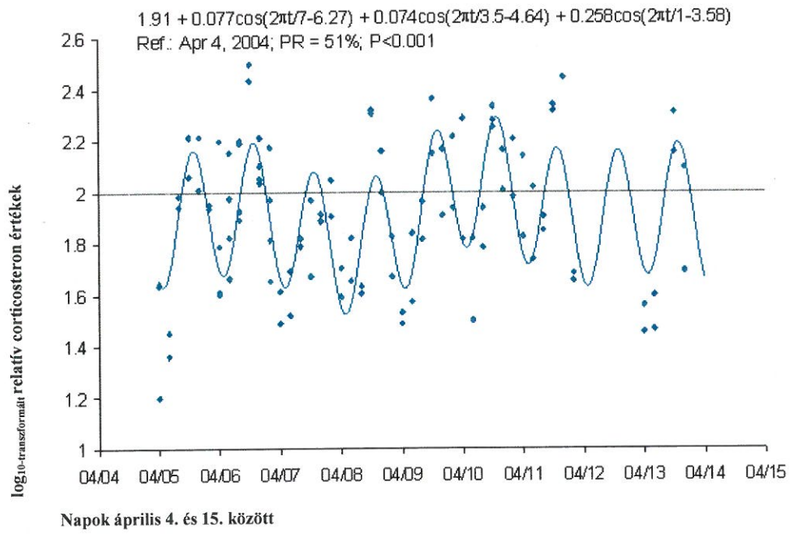
A teljes napos mintavételezés adatai megmutatták, hogy a corticosteron szintek minden vizsgált időpontban magasabbak a nőstényekben, mint a hímekben (6. ábra). Látható a tényleges mért értékek (összefüggő kék vonal) viszonya a cosinor program által korrigált (szaggatott kék vonal) értékekhez. A vízszintes szaggatott vonalak a nemek átlag-ritmus értékét, a MESOR-t jelzik. A nemek közti különbség mindegyik csoport átlagértékeiben is kimutatható (világos periódus: 530 ± 64 (nőstény) vs. 235 ± 27(hím), t=4,226, P<0,001; sötét szakasz: 826 ± 87 (nőstény) vs. 474 ± 51 (hím), t=3,541, P<0,001). Paraméter teszttel igazoltuk a MESOR érték különbséget a hímek és nőstények között (F=34,65, P<0,001). A circadian ritmus demonstrálható volt mindkét hím és nőstény csoport esetében. A legalacsonyabb corticosteron értékek a sötét fázisból a világos fázisba átlépéskor, a legmagasabb értékek világosból a sötét fázisba való átlépéskor (tehát az aktivitás kezdetekor) találhatóak.

4.1.3.2 A corticosteron infradian ritmusa

A hosszútávú követéses módszerrel a következő kísérletet végeztük el: 11 napon át (2004. április 4. és április 15. között; M: n=52, F: n=51) a modellnél kidolgozott protokoll szerint, napi 3 alkalommal mintavétel történt. A corticosteron szinteket

RIA módszerrel meghatároztuk. A nemenkénti analízis is azt mutatta, hogy jelen van egy prominens circadian ritmus (P<0,001), amihez hozzájárul egy másik harmonikus 12 órás periódus (hím: P=0,048; nőstény: P=0,058), valamint egy közel szignifikáns circaseptan komponens (P=0,057) is kimutatható. A modell a hímek esetében a variációk 65%-át (P<0,001) és a nőstények esetében 38%-t (P=0,002) igazolja.

Az összesített, log_{10}-transzformált (relatív) adatok nem lineáris analízise a corticosteron circadian ritmusa (24,03 h) mellett infradian ritmus-komponens (103,8 óra, 4,3 nap) jelenlétét is igazolta (95% CI: 3,3–5,3 nap). Ezek az eredmények kis eltérést mutatnak hím és nőstény patkányok között: a hímeknél a circadian és infradian periódus-idő 24,00- és 108,2 óra; nőstényeknél 24,03- és 101,9 óra [61]. (7. ábra)



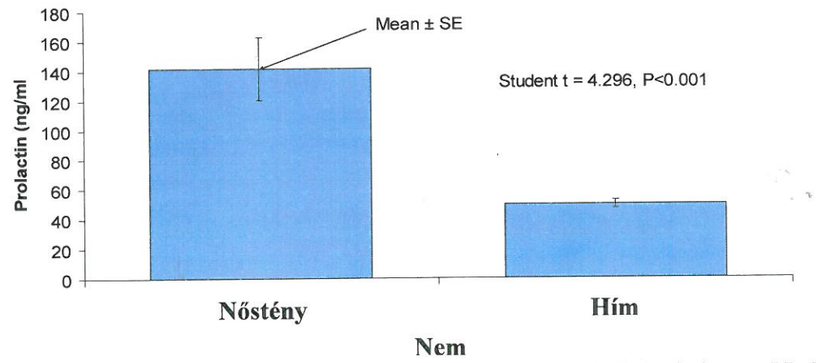
7. ábra A corticosteron infradian ritmusa log_{10}-transzformált (relatív) adatok alapján.

4.1.4 A kidolgozott állatkísérleti modell felhasználása a prolactin napi ritmusa mellett meglévő extracircadian ritmusok vizsgálatára

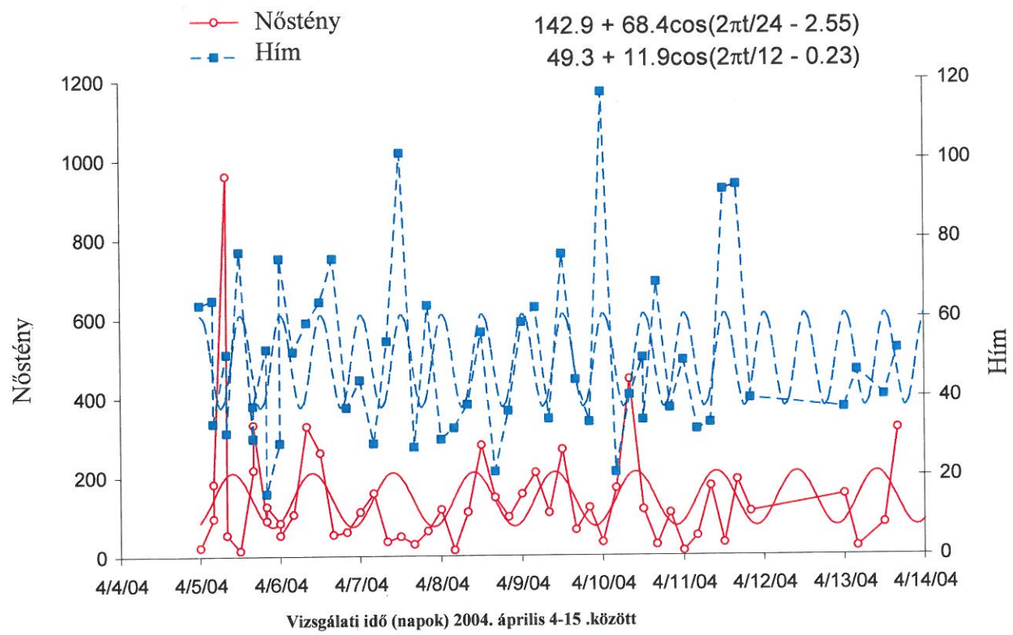
A 8. ábra a hím (M) és a nőstény (F) állatokban (M: n=52, F: n=51) mért prolactin szintek összértékeinek átlagát mutatja. Az összesítés után a két különböző fényviszony (LD, ill. DL) szerint tartott állatok mintáit nemenként vizsgáltuk és mindkét csoportban jóval magasabb értékeket kaptunk a nőstényekben, mint az

azonos korú hímekben, függetlenül attól, hogy milyen fényviszonyok között tartottuk az állatokat. A különbség a nemek közötti átlágértékekben statisztikailag szignifikáns volt az ellentétes megvilágítási rend szerinti mindkét szobában. (LD12:12: 158,4 ± 38,4 (nőstény) vs. 48,3 ± 4,1 ng/ml (hím), t=2,852, P=0,006; DL12:12: 124,4 ± 17,3 (nőstény) vs. 50,8 ± 4,4 ng/ml (hím), t=4,204, P<0,001). Tehát, függetlenül attól, hogy normál vagy fordított fényviszonyok között tartott állatokról van-e szó, nincs szignifikáns különbség a hím csoportok között sem és a nőstény csoportok között sem (LD vs. DL).

Ritmusparaméterek analizálásával kiszámolható, hogy a variancia hátterében nőstény állatokban elsősorban a circadian változások állnak (P=0,079), míg hím állatokban elsősorban a 12-órás variáció (ultradián ritmus komponens) a domináns, mely a variancia 16%-át adja (P=0,016). Az összes adat átlagérték %-ban kifejezett relatív értékének legkisebb négyzetes spektrumát az 1 ciklus/hét és 2 ciklus/nap frekvenciára számolva a circadian ritmus az összvariáció 6%-ért felelős. Az adatok további modellezése összetett cosinor modellben történt, melyben az 1- és 3,5 napos periódusok összevetésre kerültek. A statisztikai eljárás igazolta a circadian (24 h) ritmus komponens és az infradian ritmus komponens (3,5 nap) együttes jelenlétét, melyek együtt a variancia 8%-át adják. Hasonló eredményt adott a $\log_{10}$-transzforrmációval nyert relatív adatok elemzése is, 7% -os variancia megadásával. Ezzel a számolással a 3,5 napos komponens és a 24-órás komponens a szignifikanciai határérték közelében van (P=0,140, illetve P=0,113). A parameter teszt igazolta a MESOR közti különbséget (F=20,132, P<0,001) és signifikáns különbséget igazolt a 24-órás amplitúdók esetén is (F=4,440, P=0,040).

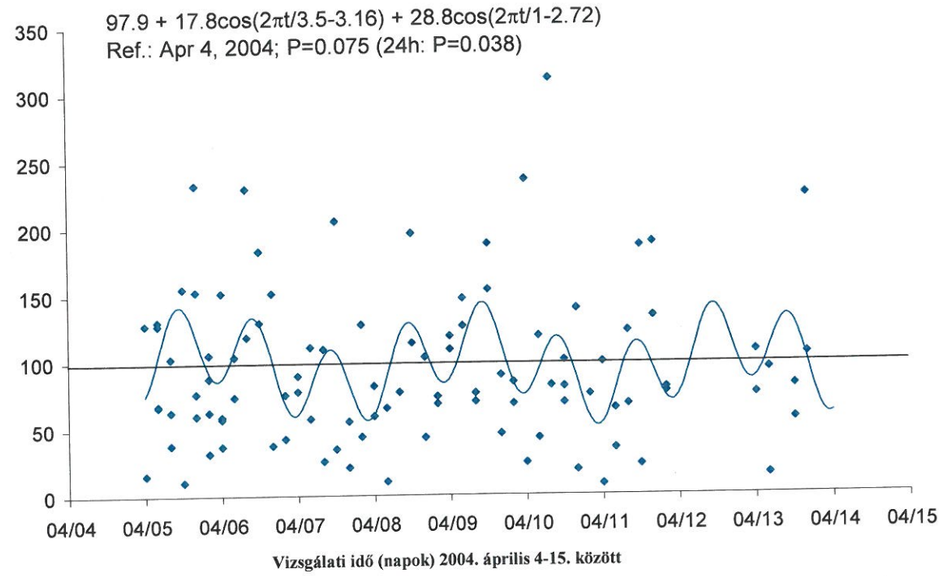


8. ábra Nemek közötti különbség a plazma-prolactin 24 órás átlagértékek alapján az LD+DL csoportokban



9. ábra A szérum-prolaktin koncentráció napi változásai 10 napos követéssel.

A 9. ábra a ritmusparaméterek alakulását kívánja bemutatni. Bár abszolút értékben a nőstények esetében magasabbak a PRL koncentrációk, mint a hím állatoknál, ahhoz, hogy a két nem adatait egyazon ábrán szemléltetni tudjuk, az Y-tengely eltérő számskálájából adódóan a hím állatokba mért PRL koncentrációk (pg/ml) láthatóak felül. Ebből jól látható, hogy a nőstényeknél a piros színnel demonstrált görbék jellegzetes circadian ritmust mutatnak, ezzel szemben hímeknél a kék színnel ábrázolt görbék a kisebb periódushossz, azaz a 12 órás ritmuskomponens dominanciáját igazolja. Nemenként elkülönítve a prolactin MESOR értékeit, ennek megfelelően, hímeknél kisebb.

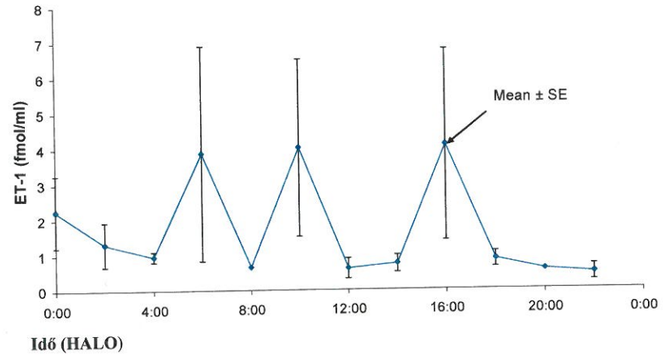


10. ábra A PRL extracircadian ritmusa a relatív adatok alapján (log-10 transzformáció után)

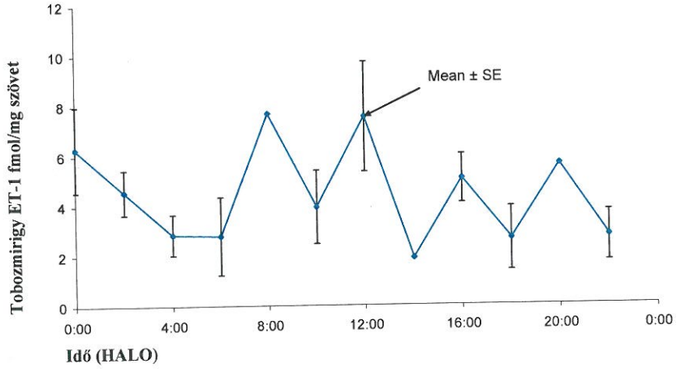
A 10. ábrán a 3,5-napos periódusidők az infradian ritmus-komponens jelenlétét mutatják. Az összesített relatív adatok analízisét modellező cosinor görbe igazolja mind a circadian (24 h) ritmus komponens, mind a semiseptán ritmus komponens (3,5 nap) jelenlétét, melyek a variancia 8%-át adják.

4.1.5 A kidolgozott állatkísérleti modell felhasználása az endothelin-1 extracircadian ritmusának vizsgálatára patkány vérmintákban és az agyalapi mirigyben. Összehasonlítás emberi mintákból nyert irodalmi adatokkal

Ebben a kísérletben 24 órás ciklust lefedve, 2 óránkénti mintavétel történt a módszereknél leírt módon LD és DL fényviszonyokban tartott hím és nőstény állatoknál (n=34). Mint ahogyan az a 11. ábrán látható, vizsgálatunk során azt tapasztaltuk, hogy patkányokban nincs a plazmában circadian ritmus az endothelin-1 koncentrációk esetén, de egy kb. 4,8 órás circasemidian ritmus (P=0,024) kimutatható.

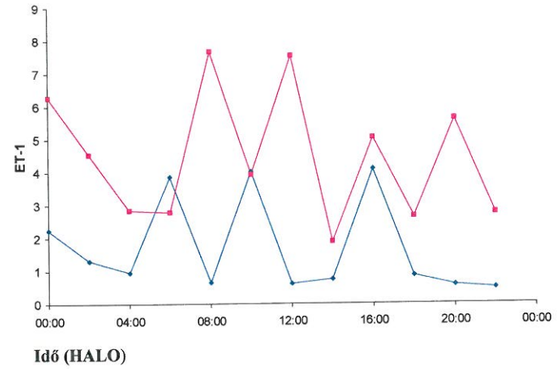


11. ábra A plazma ET-1 extracircadian ritmusa patkányokban



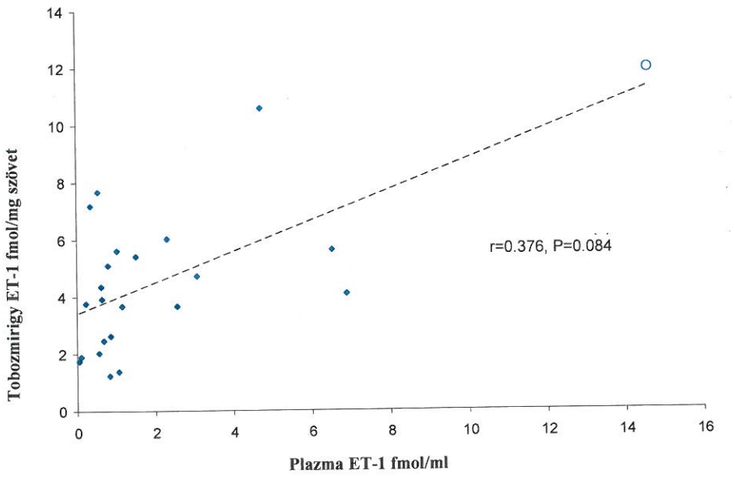
12. ábra Az agyalapi mirigy ET-1 extracircadian ritmusa patkányokban

Az agyalapi mirigyben az ET-1 ultradian ritmusa, bár több csúcs jelenik meg, nem igazolható statisztikailag szignifikáns módon. (12. ábra)



13. ábra A plazma (sötétkék vonal) és az agyalapi mirigy (rózsaszín vonal) ET-1 koncentrációk együttes ábrázolása.

A hypophysisben mért csúcsok egybeesést mutatnak a plazma csúcsokkal a sötét periódusban a világos szakaszban kismértékű, de nem szignifikáns fáziskésés mutatható ki. (13. ábra)



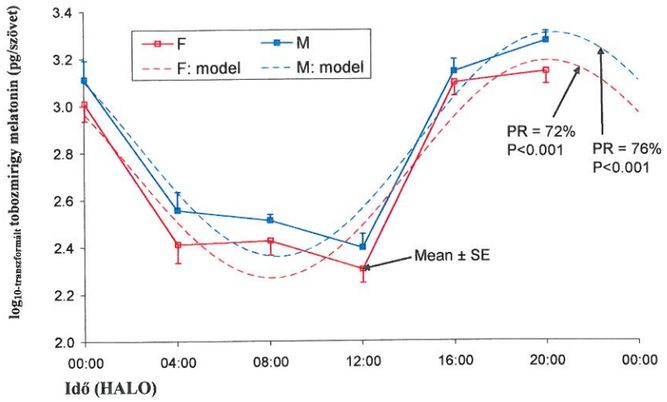
14. ábra A plazma- és az agyalapi mirigy ET-1 koncentrációk együttes ábrázolása.

A hypophysisben az ET-1 ultradián ritmus nem szignifikáns, ennek ellenére a koncentrációváltozása lineáris korrelációt mutat a plazmából mért endothelin-1 szintekkel (r=0,376; P=0,084). A 14. ábrán a plazmára és az agyalapi mirigyre vonatkozó adatok egyaránt láthatók [62].

4.1.6 Melatonin napi ritmusa a tobozmirigyben, plazmában és a gyomor-bélrendszerben

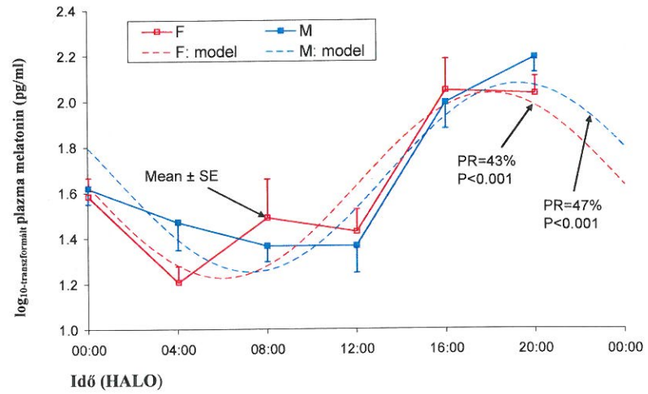
A tobozmirigyben termelt melatonin circadián ritmusa régóta ismert. A tobozmirigyben termelődik a melatonin nagy része, viszont az újabb kutatások más szervekben is kimutatták a melatonin termelést, így a retinában és a gastrointestinalis (GI)-rendszerben immunhisztológiai módszerrel és RIA módszerrel is [63; 64]. Ez utóbbi számos vitát indított el, vajon a gyomor-béltraktus szerveiben kimutatható melatonin helyben termelt vagy csak raktározott, felvett hormon? A vitát az sem zárta le, hogy a melatonin kimutatható az enteroendocrin sejtekben [65].Vizsgálatunk célja ehhez kapcsolódóan az volt, hogy összehasonlítsuk a tobozmirigy, a plazma és a duodenum melatonin szintek napi ritmusát (M: n=52, F: n=51).

Elsődlegesen 4 óránként történő 24 órás mintavételekkel igazoltuk a corpus pineale melatonin circadian ritmusát, egy adott időpontban 2-2 állatból nyert vér- és szövetmintákból (n=24). A 15. ábrán jól látható a sötét fázisban meglévő csúcs a tobozmirigyben termelt melatonin szintekben, mely megegyezik a korábbi irodalmi adatokkal [66]. A $\log_{10}$-transzformáció során nyert értékek sokkal jobban megközelítik a jellegzetes circadian mintázatot a sötét periódusban jelentkező csúccsal (HALO 20), ami az eredeti adatok alapján kevésbé kiemelkedő, azonban a $\log_{10}$-transzformáció után jól látható.



15. ábra A tobozmirigy melatonin koncentráció napi szintjének változásai log_{10}-transzformált értékek alapján. (F=nőstény, M=hím)

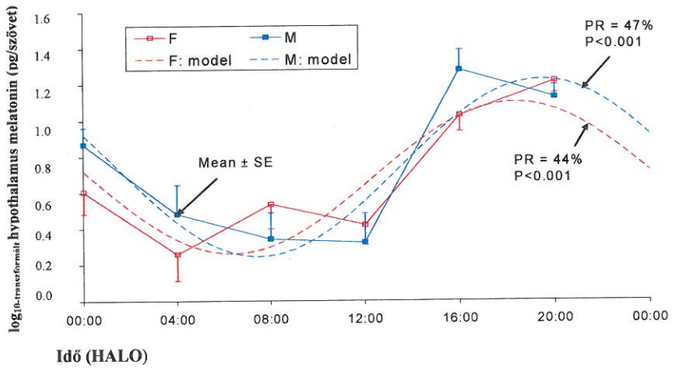
A 16. ábrán látható, hogy a plazma melatonin koncentráció egy kisebb emelkedést mutat a világos periódusban a nőstény állatok esetén, de mindkét nemben itt is a sötét szakaszban (HALO16-20 között) találhatók a legmagasabb értékek.



16. ábra A plazma melatonin koncentráció napi változásának log_{10}-transzformáció utáni (relatív) adatai a korrigált cosinor görbékhez (szaggatott vonalak) viszonyítva. (F=nőstény, M=hím)

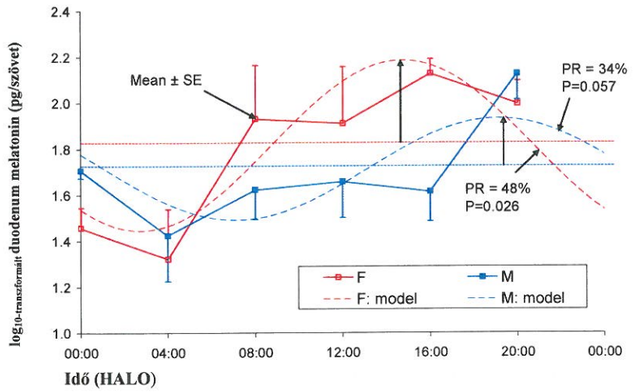
A hypothalamus melatonin tartalma igen csekély a plazmához viszonyítva, amely a tobozmirigyben mért koncentrációnak is alig 1/10-e. Ennek ellenére a cosinor programmal igazolható volt a 24-órás ritmuskomponens (17. ábra) és az, hogy a legmagasabb értékek a HALO16-20 között vannak ($P<0,001$). A melatonin circadian ritmus szerinti total variancia százalékos aránya (PR) az eredeti adatok alapján a

plazma esetében 23% a nőstényeknél és 41% a hímeknél. A hypothalamus esetében 42% a hímeknél és 47% a nőstényeknél, a tobozmirigy esetében 66%, illetve 76%. Minden görbe csúcsa a sötét szakaszban volt, azaz több mint 12 órával a fény bekapcsolása után.



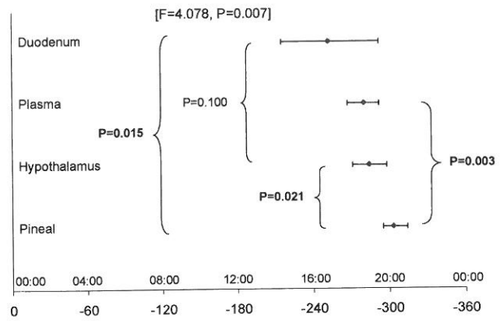
17. ábra A melatonin koncentráció napi változásai a hypothalamusban. A log_{10}-transzformáció utáni (relatív) adatok viszonya a korrigált cosinor görbékhez (szaggatott vonalak) viszonyítva. (F=nőstény, M=hím)

A duodenumban, hasonlóan a többi mintához, alacsony szintek találhatóak a világos szakaszban (nappali órákban) és magas értékek a sötét szakaszban (éjszakai órákban). Az adatokat cosinor módszerrel és ANOVA módszerrel is elemeztük. A circadian–fázis-dependens hatás ANOVA módszerrel sziginifikancia határértéket adott (F=2,279, P=0,078). Log_{10}-transzformáció után (a megoszlás normalizálására), az egyes időpontokhoz tartozó átlagértékek statisztikailag szignifikáns különbségét igazolni lehetett (F=3,924, P=0,009). A circadian ritmust a cosinor módszer minden esetben igazolta (PR=26%, P=0,016), melynek csúcs(peak)-értéke kb. 16,8 órával a megvilágítás kezdete után jelentkezik: a circadian variáció hasonló a két nemben, hímeknél PR=34% (P=0,057), nőstényeknél PR=48% (P=0,026), a legmagasabb értékek nőstények esetén HALO16, hímek esetén HALO20 időpontban vannak (18. ábra). A ritmus százalék (PR) megmutatja a variancia arányát a 24-órás cosinor modellre számítva. Melatonin esetében a zero-amplitúdó (nincs-ritmus) feltevésre kalkulálva a P értékek összesítve a plazmára vonatkozóan PR=44% (P<0,001), tobozmirigy melatoninra PR=73% (P<0,001), hypothalamusra vonatkozóan PR=44% (P<0,001) [67; 68].



18. ábra A melatonin koncentráció napi változásai a duodenum szövetben. A $\log_{10}$-transzformáció utáni (relatív) adatok viszonya a korrigált cosinor görbékhez (szaggatott vonalak) viszonyítva. (F=nőstény, M=hím)

A 19. ábra sematikusan összefoglalja az akrofázisok összehasonlítását. Az irodalomban elfogadott mód, hogy az akrofázisokat negatív fokokban fejezik ki úgy, hogy a 24-órás teljes ciklust tekintik 360 °-nak és a megvilágítás kezdetét veszik referencia-értéknek. A jelen vizsgálat szerint az akrofázis a duodenum esetén – 252°, a plazma esetén - 280 ° és a tobozmirigy esetén -303 °. Paraméter teszt statisztikailag szignifikáns különbséget igazolt a plazma és a tobozmirigy (P=0,003), a hypothalamus és a tobozmirigy (P=0,021), valamint kisfokban a duodenum és a hypothalamus (P=0,100) akrofázisok összehasonlításában, melyet a 19. ábra sematikusan mutat be. A duodenum melatonin akrofázisa (P=0,015), valamint kismértékben ugyan, de a hypothalamus melatonin-akrofázis (P=0,021) is megelőzi a tobozmirigy melatonin akrofázisát.



19. ábra A melatonin akrofázisainak összehasonlítása a duodenumban, a hypothalamusban és a tobozmirigyben. (360°=24 óra)

A jelen vizsgálat eredményei összhangban vannak néhány, korábban más szerzők által közölt patkány- és madárfajokból nyert minták adatainak meta-analíziséből származó eredményekkel [69]. Hasonló tendenciák figyelhetőek meg galamb esetén [70] és csirkében is LD 15:9 megvilágítási rend alkalmazásával [66; 69], viszont fürj esetén 3-óránkénti mintavétellel sem található eltérés a tobozmirigyben és az azon kívül termelődő melatonin ritmusának akrofázisai között [71]. Az akrofázisok közötti fázis-eltolódás a hypothalamus és a tobozmirigy melatonin szintekben még kifejezettebb SHR (spontán hypertenzív) patkányok esetén, mint az általunk vizsgált Wistar patkányokban [72; 73].

A vérben mért melatonin nagy része a tobozmirigyből származik. Ismert az is, hogy melatonin szabadul fel a béltraktusból L-triptofán adásakor [74] és etetés hatására is [65]. A saját vizsgálataink eredményei azt támasztják alá, hogy a vérben keringő melatonin származhat a béltraktusból is. Másrészt ezek az eredmények azt is alátámasztják, hogy a bélszövetekben mért melatonin koncentráció nemcsak a vérből felvett és/vagy raktározott hormonmennyiség, hanem főként helyileg termelődő hormon, melynek termelése és/vagy kibocsátása nagy valószínűséggel más szabályozó rendszerek befolyása alatt áll, mint a tobozmirigy melatoniné. A jelen vizsgálat tudomásunk szerint az első olyan munka, mely 24-órás követéssel és ritmusanalízissel szolgáltatott bizonyítékot arra, hogy a patkány duodenum melatoninhoz képest a corpus pineale melatonin circadian ritmusa fáziskésést mutat. Ez is arra utal, hogy a perifériás eredetű melatonin képzése és ritmusa nagy

valószínűséggel nem kizárólag a corpus pineale melatonin-kibocsátásának függvénye, továbbá feltehető, hogy más szabályozási mechanizmusok vezérlik a centrális és perifériás szervek melatonin ritmusát.

4.1.7 Éheztetés hatása a melatonin circadian ritmusára

Pár napos (3-5) éheztetés során csökken a patkányok energiaforgalma, csökken a napi átlagos testhőmérséklet és aktivitás. Egerekben éheztetés során 1-2 órás ultradián ritmusok is megfigyelhetők voltak [75]. Ez a kísérletsor (2005. április 8. – április 14. M: n=84, F: n=84) arra kereste a választ, hogy a táplálék rövid idejű megvonása, mint megváltoztatott külső körülmény, befolyásolja-e a melatonin circadian ritmusát és ha igen, hasonló vagy eltérő hatást fejt ki a centrális és a perifériás szervekre.

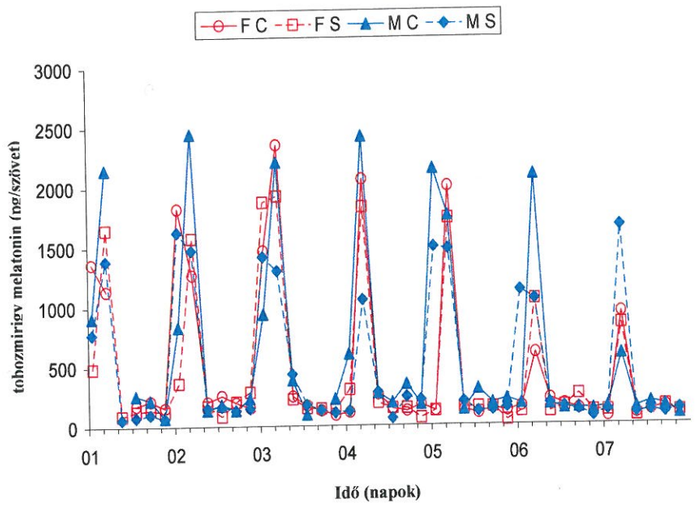
Az LD és DL megvilágítási rendhez 1 hónapig tartó adaptáció előtt ellenőriztük az állatok testhőmérsékletének napi ritmusát 4 óránként 24 órán át. A kísérlet megkezdése előtt ismét testhőmérsékletet mértünk, de most már napi 3 alkalommal, 4 óránként, valamint testsúlyt (csak reggeli értéket). A kísérlet megkezdése előtt a 180°-os fázis-változást igazoltuk a DL szobában tartott állatoknál. Ezt követő napon reggel elvettük a táplálékot és 3 napon át csak szabad vízfogyasztást tettünk lehetővé. A 4. nap reggelén megkezdtük a mintavételeket, minden időpontban, minden állatnál lemértük a testsúlyokat is. A kísérletnek ez a része 2005. április 11.-én kezdődött (9-, 13-, 17 órakor) és további 6 napon át folytatódott. Minden időpontban 1-1 hím illetve 1-1 nőstény állatot dolgoztunk fel a kontroll és az éheztetett csoportból az LD és DL szobákból egyaránt. A 8 állat leölése 1 órán belül lezajlott (3x8 állat/nap). A módszertani résznél leírtak szerint történt az altatás és a mintavétel (vér, tobozmirigy, duodenum). A vérmintákat hűtőcentrifugában 10 percig 4000 rpm-on centrifugáltuk, a plazmából corticosteront és melatonint mértünk. Az előbbit, mint ritmusmarkert a vérmintákból követtük, a melatonin ritmus-paramétereit összehasonlítottuk a plazma, tobozmirigy és a duodenum mintákból (20.-22. ábrák) a kontroll és az éheztetett csoportokban.

A **tobozmirigy** melatonin circadian ritmusa, mely a variációk 66-78%-ért felelős, igazolódott minden csoportban ($P<0,001$) az eredeti adatok és a log_{10}-transzformációval nyert relatív adatok alapján is. A 7-napos (circaseptan) ritmus statisztikai szignifikancia határérték közelében csak nőstény állatokban igazolódott, mind a kontroll ($P=0,039$), mind az éheztetett csoportban ($P=0,044$). Paraméter teszt nem igazolt nemek közötti szignifikáns eltérést az akrofázis értékei között.

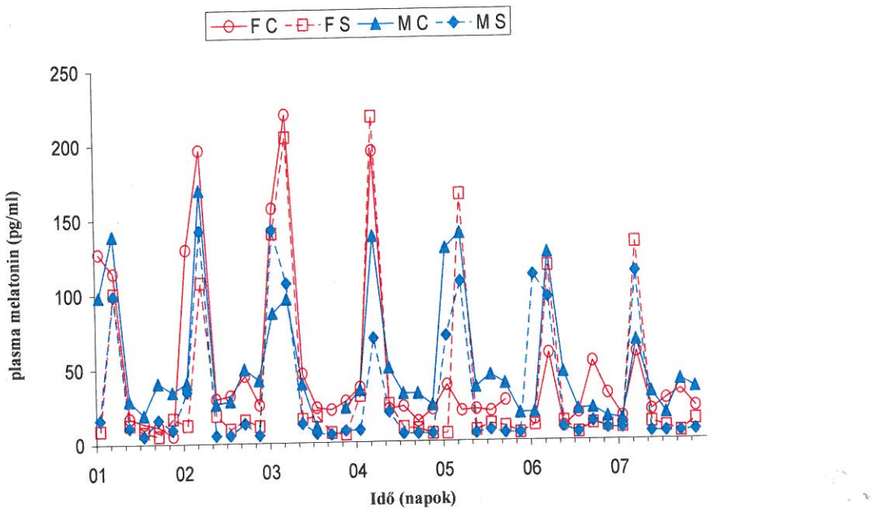
A **vérben** mért melatonin koncentráció napi változását prominens circadian ritmus jellemzi minden csoportban, mely a variációk 53-78%-ért felelős. A 7-napos komponens szintén jelen van, de csak a határérték körüli szignifikanciát mutatja ($P=0,077$). Paraméter teszt ez esetben sem igazolt nemek közötti szignifikáns eltérést az akrofázis értékei között.

A technikai kimutathatósági limitek miatt a duodenum melatonin koncentráció adatai nemek szerint összevontan, csoportszinten kerültek ritmuselemzésre. Így a nemek közötti különbséget nem tudtuk kimutatni ugyan, de az előző két mintában sem igazolódott szignifikáns különbség a ritmusparaméterek összevetésével. Csoportszinten az aktív (sötét) periódusban közel azonos amplitúdó figyelhető meg mindkét csoportban, a világos szakaszban alacsonyabb értékek mutatkoznak, de itt sincs szignifikáns különbség a csoportok között. (22. ábra)

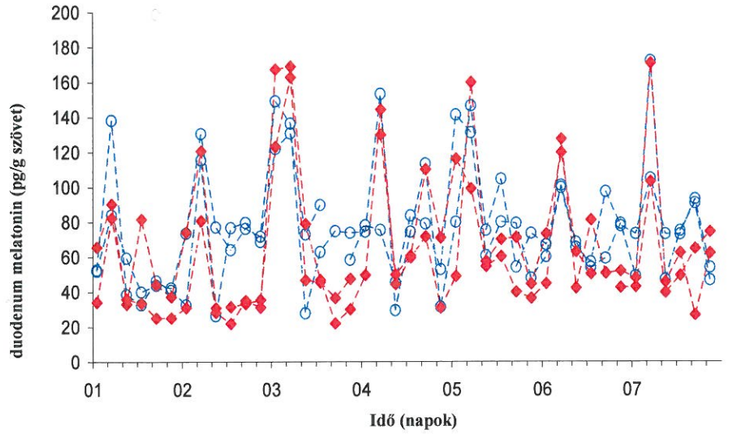
A legjelentősebb különbség az éheztetett és a kontroll csoportok között az, hogy a sötét fázisokban az éheztetett állatoknál nagyobb circadian amplitúdó jellemző a plazma- és kismértékben a duodenum melatonin szintekben, míg a tobozmirigy esetében a kontrollhoz képest kisebb amplitudó (és alacsonyabb MESOR) jellemző. (20.-22. ábrák)



20. ábra A tobozmirigy melatonin koncentrációk napi változásainak 7 napon át történő követése kontroll és éheztetett állatokban cosinor programmal. (FC=kontroll nőstény, FS=éheztetett nőstény, MC=kontroll hím, MS=éheztetett hím állatok) A tobozmirigy melatonin szintek circadian amplitúdója a sötét szakaszban kisebb az éheztetett állatokban a kontrollhoz képest.

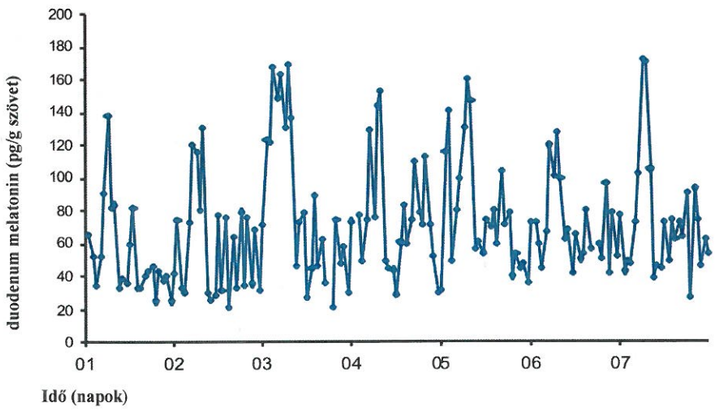


21. ábra A plazma melatonin koncentrációk napi változásainak 7 napon át történő követése cosinor programmal kontroll és éheztetett állatokban. (FC=kontroll nőstény, FS=éheztetett nőstény, MC=kontroll hím, MS=éheztetett hím állatok)

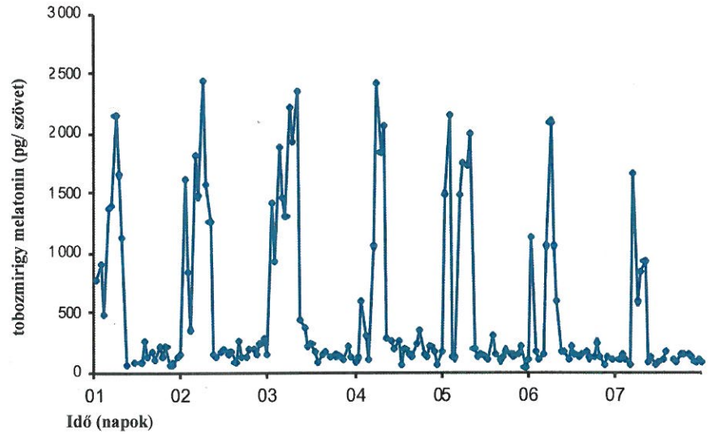


22. ábra A duodenum melatonin koncentrációk napi változásainak 7 napon át történő követése kontroll és az éheztetett csoportok átlagértékei alapján cosinor programmal. (kék szaggatott vonal=kontroll csoport, piros szaggatott vonal=éheztetett csoport)

Az általunk kidolgozott állatkísérleti modell lehetővé tette az extracircadian variációk tanulmányozását is (23.-24. ábrák). A 7-napos követéssel az összetett komponensű cosinor vizsgálat a 24- és 12-órás komponensek jelenlétét kimutatta, melyek a variációk 66-78%-ért felelősek. A circaseptan komponens megléte csak a tobozmirigyben igazolódott ($P<0,001$), amint azt a 24. ábra jól mutatja, viszont nem igazolódott a duodenumban (23. ábra).



23. ábra A melatonin koncentráció napi változásainak 7 napos követése kontroll patkányok duodenum szöveteiben (összetett cosinor modell).



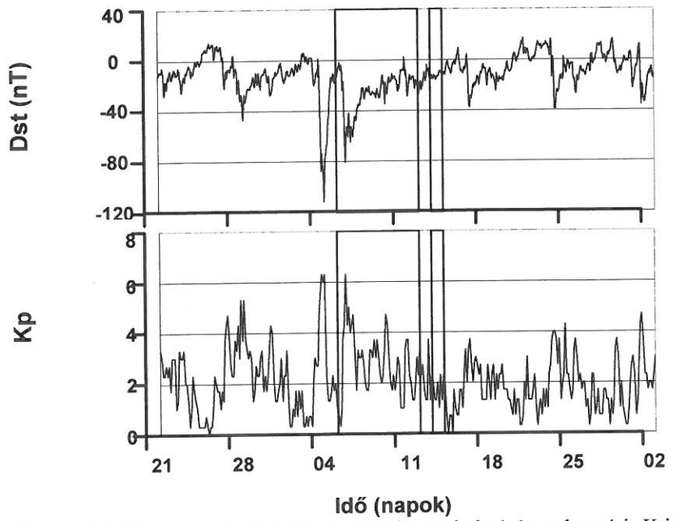
24. ábra A melatonin extracircadian (circaseptan) ritmusa kontroll patkányok tobozmirigyében.

4.1.8 Mágneses vihar hatása a melatonin ritmusára

Erős naptevékenység idején, az ún. mágneses viharok idején ionoszféra viharok jönnek létre. Ionoszféra viharok és földmágneses rendellenességek megfigyelésére, vagyis terjedési előrejelzésekre használhatók a WWV jeladók által sugárzott, vagy különböző forrásból beszerezhető "A" és "K" indexek. Az utóbbi kettővel jellemezhető a Föld mágneses mezejének aktivitása. A "K"-index egy kvázi logaritmikus szám. Magnetométerrel végzett 3 óránkénti, 3 órás (0-3, 3-6, 6-9 stb. órák közötti) mérések értékei, összehasonlítva a mérési hely mágneses erőterében észlelt legnagyobb változás vízszintes komponensével, adja ki az aktuális mérőszámot. (A legnagyobb pozitív és legnagyobb negatív irányú kilengést együttesen figyelembe véve.) "K" indexek értéke 0 és 9 között lehet. A hivatalos, az egész bolygóra vonatkoztatott "Kp" (Kplanetari) indexet a földgolyó számos helyén található mérőállomások által szolgáltatott egyedi "K" értékek súlyozott figyelembevételével számolják ki. Mivel a mindenkori utolsó "K" index tartalmazza a legfrissebb (maximum 3 órás), a pillanatnyi naptevékenységre utaló adatokat, ennek változása, a változás tendenciája és sebessége a legfontosabb információ számunkra, melyből meghatározható a jelenlegi és a közeljövőben várható terjedés. A különböző mérőállomások adatait összegyűjtik és átszámolják azokat az ún. "planetary K" indexekké (Föld-átlag értékek). Fontos a "K" index ismerete. Komoly

változásra akkor kell gondolnunk, ha értéke eléri, vagy meghaladja a 4-es, 5-ös szintet. Rosszabb a prognózis, ha emelkedő tendenciát mutat. Az "A" index azt mutatja meg, hogy mi történt 24 órában a Föld mágneses mezejében. (http://www.dxlc.com/solar/indices.html, http://www.sec.noaa.gov/SWN/).

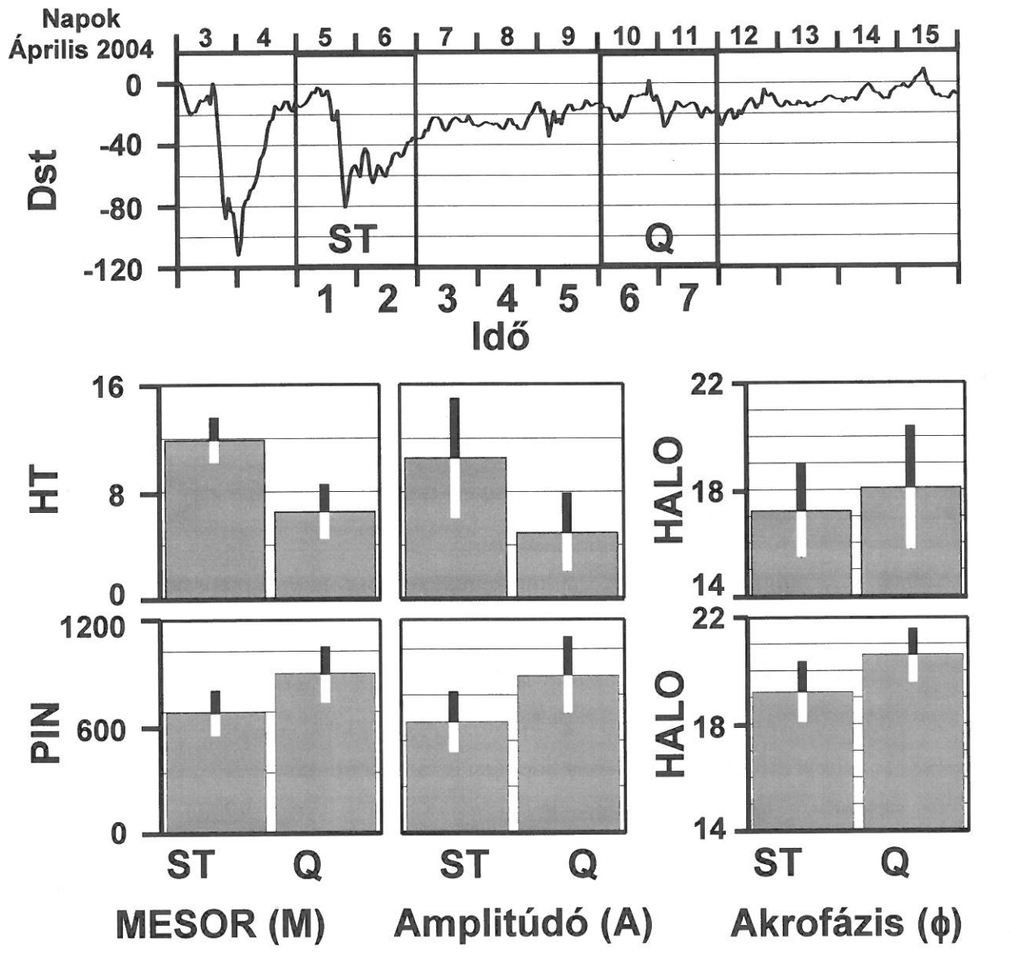
A most bemutatandó eredmények abból a kísérleti sorozatból származnak, melynek egy része egy közepes erősségű mágneses vihar második kitörési maximumának idejére esett (M: n=52, F: n=51). (25. ábra) A kísérlet egy része az utólagos adatlekérés szerint véletlenszerűen esett a mágneses vihar alatti periódusra. A Kp index: 6,3 (2004. április 3-áról április 4-ére virradó éjszaka), a Geomagnetic Equatorial DsT index (az elektromágneses tér változásainak mérőegysége) -112 nT április 4-én 00.30-kor, mely lecsökkent -81 nT értékre április 5-én 19.30-kor (http://www.sec.noaa.gov/SWN).



25. ábra A Dst (Geomagnetic Equatorial Disturbance index) és a planetáris K index (Kp) adatai 2004. március 21. és május 2. között Pécsett.

A 26. ábra felső grafikonján a Dst (geomagnetic equatorial disturbance index) változása látható. Az oszlopdiagrammok a hypothalamusban (HT) és a tobozmirigyben (PIN) detektált melatonin koncentrációk átlagértékei alapján számított MESOR, amplitúdó és az akrofázis értékeket mutatják HALO idő szerint (a fény bekapcsolásától számított idő) ST (stromy) napokon, melyek a közepes erősségű mágneses vihar 2. extrenumára estek, jelölve a csendes napokat is Q (quiet).

A mágneses vihar a tobozmirigy, a hypothalamus és a mellékvese működésére is kihatott. Tudomásunk szerint ez az első olyan vizsgálat, mely objektív adatokat szolgáltat az endocrin rendszer zavaraira, melyet a mágneses viharok idéznek elő. A tobozmirigyben alacsonyabb MESOR és amplitúdó, a hypothalamusban magasabb MESOR értékek és amplitúdó mutathatók ki a melatonin koncentrációk circadian ritmusában kisfokú akrofázis (Φ) eltolódás mellett a mágneses viharral azonos periódusban az előtte és utána lévő ún. „csendes" napokhoz képest. $P<0,05$ minden összehasonlítás esetén, kivéve a hypothalamus akrofázisai (Φ).



26. ábra Melatonin termelődés patkány hypothalamusban (HT) és a tobozmirigyben (PIN) mágneses vihar alatt (ST) és csendes napokon (Q).

Geomagnetikus viszonyok	Minta (napok)	M	A	Φ	(A, Φ)	(M,A, Φ)
		Tobozmirigy melatonin (pg/szövet)				
ST	1-2*	796,8	722,2	-288		
Q	6-7	1052,9	1024,0	-309		
P		**0,021**	*0,051*	*0,054*	**0,020**	**0,006**
		Hypothalamus melatonin (pg/szövet)				
ST	1-2*	11,87	10,52	-258		
Q	6-7	6,48	4,92	-271		
P		**0,005**	**0,033**	0,521	0,129	**0,016**
		Corticosteron† (log_{10}%)				
ST	1	1,83	0,41	-209		
	2	2,02	0,25	-183		
	3	1,78	0,17	-231		
P		**<0,001**	*0,066*	0,130	**0,040**	**0,001**
Q	5	1,91	0,31	-209		
	6	2,02	0,23	-235		
	7	2,01	0,23	-196		
P		0,410	0,754	0,439	0,652	0,643

2. Táblázat Melatonin és corticosteron termelődés patkány hypothalamusban és tobozmirigyben mágneses vihar alatt (ST) és csendes napokon (Q).

Mind a MESOR (M), mind a circadian amplitúdó (A) alacsonyabb volt a tobozmirigy melatonin szintekben és magasabb a hypothalamus melatonin-tartalmában a kimutatott mágneses vihar alatti napokon a csendes napokkal szemben [76]. (A *jelölt adatok (1-2.*) a mágneses viharral egyidejű napok. A corticosteron koncentrációk MESOR és amplitúdó értékei nagyobb variabilitást mutatnak a viharos napokon. +: Az adatok átlag%-ban kifejezve mindkét nem esetén, összesítve és log_{10}-transzformációval átalakítva.) (2. táblázat)

4.1.9 Krónikus enyhe stressz hatásai

Testsúly: A CMS procedúra után nem találtunk szignifikáns különbséget a stresszelt és a kontroll csoportok között (P>0,05).

Cukorfogyasztás: Az 1%-os cukoroldat fogyasztását minden héten egy alkalommal mértük. A 4 hét alatt a kontroll csoportokban ez emelkedő tendenciát, míg a

stresszelt állatokban enyhe csökkenő tendenciát mutatott, de a különbség a két csoport között nem volt szignifikáns. Referenciaként a vízfogyasztást is összehasonlítottuk, itt sem volt szignifikáns különbség (P>0,05). A nemek közötti eltérés minden héten szignifikáns volt (1. hét: P<0,001, 2. hét: P<0,001, 3. hét: P=0,013, 4. hét: P=0,001). A cukorfogyasztás és a megvilágítási rendek közötti kapcsolat a 2. héttől kezdődően mutatkozott ANOVA-val (2 hét: P=0,004, 3 hét és 4 hét: P<0,05).

Corticosteron CS: A plazma CS a CMS kezelt, LD-ben tartott nőstény állatokban kissé csökkent a világos szakaszban és kissé emelkedett a sötét fázisban az LD-ben tartott kontrollhoz képest (P=0,081), hímeknél nem. Nemek közötti különbség a corticosteron esetében: a corticosteron magasabb nőstény, mint hím állatoknál (P<0,001).

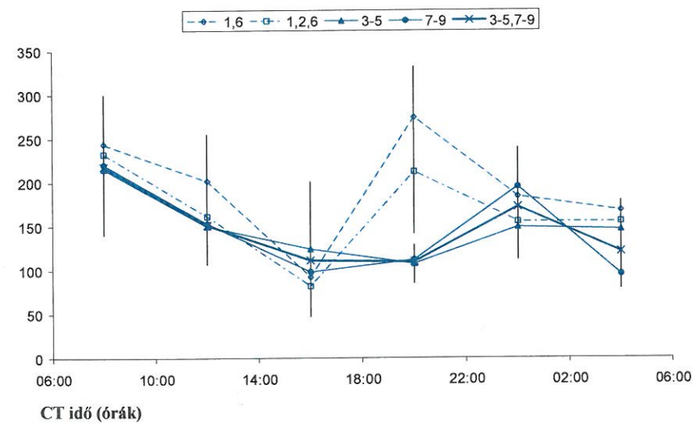
Testosteron: A CMS kezelt állatokban szignifikáns csökkenés mutatkozott a kontrollokhoz képest.

Ritmuskomponensek: Corticosteron, testosteron és serotonin került meghatározásra a 4 hetes CMS expozíciót követően [77]. Circadian ritmust szignifikanciával csak 21 esetben kaptunk. Meglepő módon, a kontroll hímekben a circadian ritmus-komponens helyett (P=0,091) a 12-órás komponens (P=0,026) dominanciája mutatkozott nagyobb részt felelősnek a variációkért. Viszont egyértelmű circadian ritmus-komponens (P=0,001) dominancia jellemezte a testosteron napi szinteket a kontroll hímekben. A serotonin ritmusát a technikai okok miatti kevés mintából nem tudtuk részletesen vizsgálni. Az adatokat csoportokba rendeztük kezelések szerint, a 2-5 csoport a CMS-kezeltek, a 6-9 csoportok a nem stresszelt, de különböző megvilágítási rendek szerint tartott állatok (VF). Ezt követően végeztük el a ritmusanalízist. A csoportátlagok alapján a corticosteron a hímekben statisztikai szignifikancia határértékéhez közeli circadian ritmust mutatott a CMS-stresszeltek

csoportjában (P=0,095), míg a 6-9. csoportokat a statisztikai szignifikancia határértékéhez közeli 12-órás ritmus-komponens jellemezte (P=0,071). Testosteron esetén a CMS-kezelt állatokban igen (P=0,004), a csak fényváltoztatásnak kitett, de nem stresszelt állatokban viszont nem (P>0,20) lehetett a circadian ritmust kimutatni.

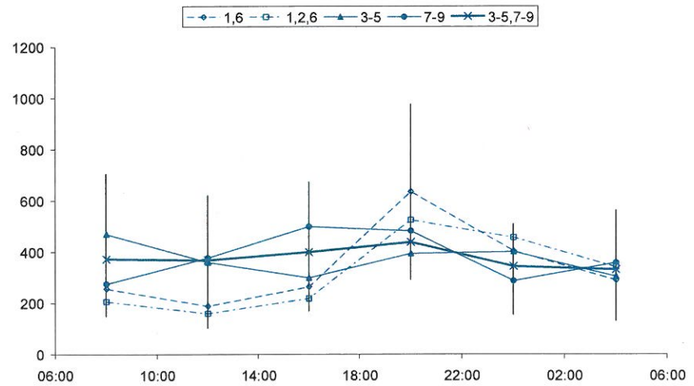
Az állatokat két különböző megterhelésnek tettük ki: az egyik a krónikus enyhe stressz alkalmazása (CMS), a másik a különböző intervallumokban változtatott fényes:sötét periódusok által okozott terhelés. Összehasonlítottuk az LD feltételek között tartott stresszelt és nem stresszelt csoportok (1., 2., 6.) ritmusparamétereinek értékeit, valamint az LD:DL viszonyok többszöri váltakozásában tartott csoportok (3.-5. csoport: CMS+VF és 7.-9. csoportok: csak VF) értékeit. Paraméter teszttel az utóbbi csoportokban csak kis amplitúdó különbség volt a nőstények esetében (P=0,085), hímeknél nem.

A sötét periódusban látható csúcs (peak) érték az LD-ben tartott kontroll állatoknál a legmagasabb, ennél a szintén LD-ben tartott CMS-kezelt állatok értékei alacsonyabbak és szignifikánsan alacsonyabb minden más csoporté. A többi időpontban nincs szignifikáns különbség. (27. ábra)



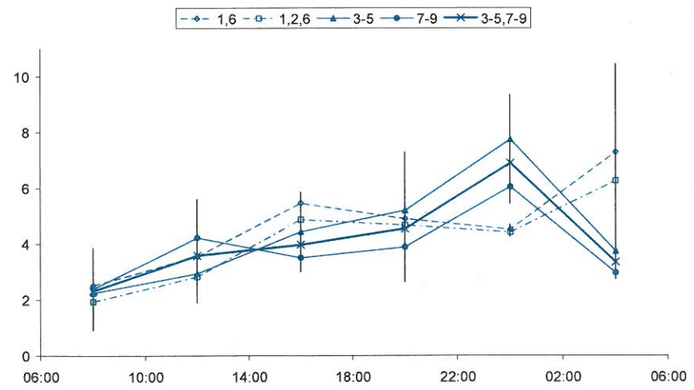
27. ábra A corticosteron koncentrációk (nmol/l) napi változásai hím patkányok különböző csoportjai között.

A 28. ábrán látható, hogy a sötét periódusban meglévő csúcs (peak) érték az LD-ben tartott kontroll állatoknál a legmagasabb, ennél alacsonyabb minden más csoporté. Egyik időpontban sincs szignifikáns különbség. Megfigyelhető, hogy a váltakozó megvilágítási rendekben tartott csoportokban (CMS és/vagy csak VF) igen kisfokú a napi variancia mértéke.



28. ábra A corticosteron koncentrációk (nmol/l) napi változásai a nőstény patkányok különböző csoportjai között.

A testosteron szintet tekintve megfigyelhető, hogy a váltakozó megvilágítási rendekben tartott csoportokban (CMS és csak VF) a sötét periódusban ellentétes tendenciájú a változás az LD-ben tartott állatokhoz viszonyítva [77]. (29. ábra)



29. ábra A testosteron koncentrációk (nmol/l) napi változásai a hím patkányok különböző csoportjai között.

5 Új eredmények és gyakorlati hasznosítás

1. Az általunk kifejlesztett állatkísérleti protokoll a ritmusvizsgálatok hosszabb időtartamú követését teszi lehetővé. Ennek a protokollnak az átvételével azóta több laboratóriumban is folynak vizsgálatok (BIOCOS nemzetközi kutatócsoport).

2. Kimutattuk, hogy a corticosteron és a prolactin ismert circadian ritmusa mellett jelen van a circasemiseptan ritmus is, a nap adott időpontjában mért értékeket a két ritmuskomponens együttesen eredményezi (azonos- vagy ellentétes tendenciával).

3. Kimutattuk, hogy az emberi mintákhoz hasonlóan, patkányban sincs az endothelin-1 esetén circadian ritmus. A ritmus 8-órás komponenssel jellemezhető a plazmában és a hypophysisben is.

4. A vizsgálatainkkal elsőként igazoltuk, hogy a GI traktusban termelődő melatonin ritmusának szabályozása eltér a corpus pinealeban termelt melatonin ritmusától, a ritmus görbék alapján fázis-késés van a corpus pineale ritmusában, valamint azt, hogy táplálékmegvonást követően csökken az amplitúdó nagysága.

5. Ugyancsak elsőként mutattuk ki a neuroendocrin rendszer változásait a Föld mágneses terének megváltozásakor (napkitörés: Kp (geomagnetikus index 6,3, Dst egyenlítői index -112 és -81 nT): a keringésben és hypothalamusban mért melatonin szintek alacsonyabb MESOR és kisebb circadian amplitúdót mutattak, mint a tobozmirigyben a napkitörés alatt mért mintákban. A corticosteron nappali értékek nagyobb labilitást mutattak a kitörést követő 3 naphoz képest.

6. A krónikus enyhe stressz (CMS) és a megvilágítási rendek többszöri megváltoztatásának alkalmazásával végzett kísérletünk egy új modell megteremtésének alapja lehet. További vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy nagyobb állatszámmal statisztikailag is nagyobb bizonyossággal lehessen igazolni azt, amit most, mint tendenciát bemutattunk. Úgy tűnik, hogy a megvilágítási rendek többszöri megváltoztatása önmagában nagyobb megterhelést (ritmuszavart) okoz, legalábbis a corticosteron időstruktúrájában, mint a CMS.

6 Megbeszélés

6.1 Corticosteron ritmusai

A corticosteron kronomja (idő struktúra) alapvető fontosságú markere az adrenocorticalis ritmusoknak. Régóta ismert, hogy a steroidokat jellemezni lehet számos ritmuskomponenssel, melyek közül a legismertebb a circadian ritmus. A corticosteron napi ritmusa ritmusmarkerként klinikai vizsgálatokban is felhasználható, de más ritmuskomponenseket (ultradian, infradian, stb.) a klinikai gyakorlatban nemigen vesznek figyelembe. A legtöbb esetben délelőtti és délutáni mintavétel történik, vagy csak napi egyszeri mintavétel. Ismerve a glycocorticoidok vérszintjének napi változásait, egy adott beteg esetén nagy jelentősége van annak, hogy a nap melyik időpontjában történik a vérvétel, főként akkor, ha ismételten szükséges a vérszintekben történő változások ellenőrzése és ennek diagnosztikai és/vagy terápiás konzekvenciája is van. A különböző ritmusok egy adott vizsgálati anyag esetén egymást gyengítik vagy erősítik. Más szóval, amennyiben egy- vagy több ritmus akrofázisa egybeesik, abban az esetben magasabb értéket kapunk az adott időpontban az ismert circadian ritmus által várható értéknél, ellentétes akrofázisok egybeesésekor alacsonyabb értéket. Gyógyszeres kezeléseknél is döntő fontosságú lehet ezek ismerete, amennyiben a gyógyszerbevitel esetleges esti beadása hatásosabbnak bizonyul, mint pl. reggeli beadáskor. A kezdetben empirikus megfigyelésekre azóta már kialakult a kronobiológia és a kronoterápia tudománya, melyek törvényszerűségei ma már egyre szélesebb körben elfogadottak.

A szervezet különböző ciklicitást mutató működéseit összehasonlítva egy adott változó akrofázisa nem szükségszerűen esik egybe egy másikéval, másképpen fogalmazva egy- vagy több ciklus között is beszélhetünk fáziseltérésekről. Ha pl. arra a mechanizmusra fókuszálunk, amikor a napi változás bekövetkezik az alvásból az ébrenlétbe, az emberekben a cortisol [78; 79; 80], a rágcsálókban a corticosteron [80; 81; 82] fázis-vezetést (phase-advance) mutat az ébredéshez, illetve a napi mozgás- és egyéb aktivitáshoz viszonyítva, a mellékvese már a felébredés előtt funkcionálisan

aktív [79; 83]. Úgy tűnik, a szervezet előkészül minden napra a glycocorticoidok szekréciójának megemelésével. Ez a fajta szekréció emelkedés eltér a napközbeni stimulusra adott azonnali választól [84].

A fázis–vezetés (phase-advance) felvetődik a nukleinsavak világában is, mintha az RNS-képződés napi ritmusa megelőzné a DNS-képződés ritmusát [81; 83; 85] egy sejtciklusban, mintha minden egyes mitózis után az RNS lenne elsődleges az információáramlás folyamatában a DNS szintézishez képest, nem úgy, mint az elterjedt lineáris rendszer esetében [80; 85]. Még szélesebb távlatokban, akár filozófiai szinten is, az élet megjelenésekor a Földön az RNS világ megelőzte a DNS világot [83], azaz az RNS el tud végezni olyan feladatokat, amelyeket egyedül a DNS feladatának hittek (RNS vírusok). Akár a hormonok ritmusa, az élettani folyamatok ritmusa vagy a sejtszintű ciklusok, még a genom változásai is összefüggésbe hozhatók az idővel [72; 86], de ennek elemzése túlmutat a jelen dolgozat témakörén.

Vizsgálataink egyik célja, hogy tovább bővítsük az ismereteket a circadian ritmusok vonatkozásában, de arra fókuszáltunk elsősorban, hogy az extracircadian ritmuskomponenseket is feltárjuk, melyek kevésbé, vagy egyáltalán nem ismertek és azok pontos ritmometriás elemzését elvégezzük. Az extracircadian mintázatok és a circadian ritmus paraméterek meghatározásához speciális ritmus-analizáló software-t, a cosinor programot alkalmaztuk. Az infradian ritmusok vizsgálatát (circaseptan, circasemiseptan) csak hosszú mintagyűjtéssel érhettük el, melyben a 24-órás ciklust úgy fedtünk le az általunk kifejlesztett állatmodell protokoll szerint, hogy csak napközben gyűjtöttünk mintákat. A megvilágítási rendhez történő szinkronizációt igazolta a circadian ritmusok megléte, az ellentétes megvilágítási rendben tartott állatoknál mért corticosteron koncentrációk és a testhő esetében is, a fordított megvilágításban a ritmus fázisa 180°-ban megfordult.

A normál LD kondíciók között tartott állatok napi ritmusgörbéje a klasszikus leírásnak megfelelt [81]. Hasonló mintázatot más változóknál is leírtak, mint pl. a vér eosinophyl granulocyták számának napi ritmusánál 1953-ban [87].

A circadian ritmus akrofázisa az új megvilágításhoz nem azonnal alkalmazkodik, amit a máj glykogen szintjének ritmusa és a plazma corticosteron ritmusa is jól jelez [88]. A mitózis circadian ritmusa sem teljesen fordul meg, az új rend bevezetése után egy héttel sem [89]. Ezért szükséges az állatok adaptációja kb. 1 hónapos időszakban az adott megvilágítási rendekhez. A saját vizsgálatainkban a plazma corticosteron mellett, mint másik ismert ritmusmarkert, a testhőmérsékletet is mértük annak igazolására, hogy a szinkronizáció megtörtént-e.

Az infradian, a circaseptan (7 nap körüli) körüli és a circasemiseptan (3,5 nap körüli) változások mögött feltehetően sokféle, összetettebb mechanizmusok húzódnak. Mindezidáig a circasemiseptan ritmusokat csak az emberi vérnyomás és pulzus frekvencia változásainak tekintetében vizsgálták. Az egyik ilyen vizsgálat érdekessége, hogy követéses vizsgálatban interkontinentális repüléseknél egy a 80-as éveiben járó férfi és egy másik 70-es éveiben járó férfiben circaseptan ritmusát a vérnyomásában nem lehetett kimutatni a repülés után a kontinensváltáskor [90; 91; 92].

A humán glycocorticoid szintek változásai meglehetősen konzisztensek különböző kontinenseken [93], csakúgy, mint a melatonin akrofázisai. A corticosteron circadian ritmusa igazolódott rágcsálóknál és más fajoknál is, megemlítendő, hogy a corticosteronnak a circannuális ritmusa is ismert [88]. A ritmus vizsgálatok alapfeltétele a megvilágítási rend standardizálása. Az infradian ritmusok vizsgálatának célja, hogy a periódushosszról, annak változásáról gyűjtsön adatot. Jelen vizsgálatainkban a circadian periódus hatszori vagy hétszeri megismétlődése, az amplitúdó és a jellemző hullámforma alakulása, változása jellegzetes infradian ritmusgörbét mutatott a corticosteron és a PRL esetén is. Éppen egy ilyen jellegű vizsgálat adta azt a véletlenszerű felfedezést, hogy azokon a napokon, melyek egybeestek egy közepes erősségű mágneses viharral (melyet az egyenlítői Dst index és a Kp:6,3 bolygóközi mágneses index határozott meg) ellentétes tendenciájú ritmusváltozások léptek fel a tobozmirigy vs. hypothalamus melatonin szintekben. Valamint így igazolódott objektív módon az is, hogy ezeken a napokon a corticosteron ritmusa sokkal labilisabb szerkezetű.

6.2 A kidolgozott állatkísérleti modell felhasználásával a melatonin ritmusának vizsgálata központi és perifériás szervekben

Egészséges fajokban, szinte minden gerinces élőlényben, beleértve természetesen az embert is, szabályos circadian ritmus jellemző a melatonin koncentrációk napi változásaira a keringésben és elsősorban a tobozmirigyben. A melatonin szint a napi csúcsát sötét fázisban éri el, ha az időmakroszkopikus megközelítést alkalmazzuk. Időmikroszkópos megközelítéssel (ritmometriával) napi ritmusának paraméterei precízen mérhetőek.

A melatoninnak vannak antiinflammatorikus és antioxidáns tulajdonságai, az immunrendszer, savszekréció és simaizomzat-tónus modulátoraként is ismert [64; 65; 94]. Ennélfogva a gastrointestinalisan képződő melatonin klinikailag is releváns faktor.

Spontán stroke-ra hajlamos hypertensiós Okamoto patkányokon gyűjtött adatok alapján derült fény először a fáziskülönbségre a hypothalamus, az agyalapi-mirigy illetve tobozmirigy melatonin circadian ritmusai között. Saját vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy vajon hasonló vagy eltérő ritmusmintázat illetve fázis-eltolódás van-e a centrális és a perifériás szervekben található melatonin szintek között. A legújabb adatok alapján a béltraktusban a circadian oszcillátor független az SCN-től: a táplálék-bevitel hatására expresszálódnak az óragének, ezért már az irodalomban is táplálék-felvétellel bekapcsolt oszcillátorról (the feeding-entrained oscillator (FEO)) tesznek említést. A táplálékfelvételt megelőzi egy fokozott aktivitás, melyet az SCN-től független oszcillátor, valószínűleg a FEO vezérel. A Per1 transgenikus állatban ezt sikerült is igazolni [95]. Ezek az adatok is megvilágítják a perifériás oszcillátorok jelentőségét és rávilágítanak arra, hogy a bélrendszerben maga a táplálékfelvétel az egyik legerősebb ritmus szabályozó tényező.

Ennek kapcsán két vizsgálatot is végeztünk. Az első vizsgálattal azt igazoltuk, hogy a duodenum melatonin circadian ritmus akrofázisa megelőzi a tobozmirigy melatonin akrofázisát. Más szóval, a két rendszer ritmusa eltér, amely valószínűsíti, hogy a bélben kimutatható melatonin ritmusát nem a centrális pacemaker (SCN és/vagy

tobozmirigy) vezérli. A másik kísérletben kontroll és éheztetett állatok ritmusparamétereit hasonlítottunk össze. Ez utóbbi vizsgálatban azt igazoltuk, hogy az éheztetés során kisfokú, de ellentétes tendenciájú változás történik a tobozmirigy vs. duodenum amplitúdókban az éheztetett állatok esetén. Miután hasonló jellegű irodalmi adatokat nem sikerült találnunk, úgy gondoljuk, hogy ezek az adataink megerősítik azt a feltevést, hogy más szabályozó mechanizmusok irányítják a bélrendszer ritmusaiért felelős oszcillátorokat.

Saját vizsgálatainkban külön elemeztük azt, hogy a minták egyedi variációit milyen %-os arányban befolyásolja a circadian- és az extracircadian ritmus(ok). Ez soha nem 100%, ami arra utal, hogy az adott időpontban mért értékek közötti különbségeket más faktorok is befolyásolják, ezek közül a ritmusoknak betudható változás adja meg a %-os értékeket. Fáziseltolódásokat és/vagy más időstruktúra eltolódásokat előidézhetnek olyan külső tényezők is, mint amelyet igazoltunk is a mágneses vihar kapcsán. A fáziseltolódások mechanizmusára vonatkozó kutatások a hypothalamusban az SCN pályatanával és idegi összeköttetéseivel összefüggő folyamatokat vizsgálják. A legújabb kutatások már az óragének mutációját és/vagy kiesését is vizsgálják, főként knock-out rágcsálókon [95].

A corpus pineale és a bélrendszerben kimutatható melatonin ritmusa között fáziseltolódást saját vizsgálatunk igazolt. Érdekesség, hogy csirke bél- és tobozmirigy mintáinak metaanalízise is hasonló irányba mutat, mint a saját vizsgálataink [65]. Korábbi kutatások is jelezték a patkányok és galambok emésztőrendszerében lévő ilyen jellegű ritmus különbség lehetőségét, azonban a változások mértéke jóval alacsonyabb volt a bélben, mint a tobozmirigyben vagy a keringésben és néha a ritmicitás sem volt kimutatható. A gastrointestinalis melatonin mennyisége a törzsfejlődés során alacsonyabbá vált, mint a tobozmirigyben, ezért az érdeklődés középpontjába került, a tobozmirigyen kívüli más forrásokkal nem is foglalkoztak sokáig. Ez a kérdés később felmerült a tobozmirigy eltávolításával végzett kísérletek kapcsán, így került sor annak bizonyítására, hogy a retina, a csontvelő, az agyalapi mirigy és a hypothalamus, és pl. galamboknál az ún. Harderián mirigy is képes a melatonin képzésre. Az emésztőrendszerből származó melatonin kibocsátás posztprandiális hatás, vagy triptofán adás következménye lehet, származhat a táplálékból és baktérium flórából is. Ezek a tények számításba vehetők

a melatonin átmeneti emelkedéséért, de nem valószínű, hogy jelentősen befolyásolják a plazma-koncentrációt vagy annak melatonin circadian ritmusát. A gastrointestinalis rendszerben a melatoninszint csúcsát következetesen éjszaka mérték, mind a nappal, mind a sötétben aktív állatok esetében. Ezért a melatonin ritmusa a bélben elsődlegesen nem az emésztés fiziológiáján alapul. Miután a gastrointestinalis rendszer egyszerre termelője és felvevője a melatoninnak, a funkcionális kapcsolat a tobozmirigy, a bél és a keringő melatonin között bővebb megvilágítást igényel. A circadian akrofázisok fázishelyzetének alaposabb vizsgálata az adott szervekben ezért is nagyon fontos.

6.3 A kidolgozott állatkísérleti modell felhasználásával a mágneses tér endocrin ritmusokra gyakorolt hatásainak vizsgálata

6.3.1 Mágneses vihar

A Nap aktivitásának hatását a földi jelenségekre "űridőjárásnak" nevezzük. A nagy napkitörések ma már előre jelezhetőek, ezt "űridőjárás-előrejelzésnek" nevezik. A Föld környezetében levő műholdak és a Nap megfigyelése az űrből lehetővé teszi a napkitörések néhány napos előrejelzését. Sokat vitatott kérdés, hogy a Nap működése kihat-e a földi életre. A Nap látható felszínét és az afelett elhelyezkedő kromoszféra feletti tartományt napkoronának hívjuk, ez szabad szemmel a napfogyatkozások alkalmával figyelhető meg. A korona anyaga nagyon híg, de igen forró. A koronában levő töltött részecskék sebessége igen nagyra nő, a Nap északi és déli pólusai közelében eléri a 800-1000 km/s sebességet, az egyenlítői tartományban az átlagos kiáramlási sebesség 300-400 km/s. A folyamatosan kiáramló anyagot napszélnek nevezzük. Az anyagkilövellés időnként igen gyors és heves, e folyamatokat korona anyag-kilövelléseknek nevezzük. A napfoltok jelenléte a lokális mágneses tér zavaraival kapcsolatos, ezért van időbeli kapcsolat a napfoltok és a Nap mágneses pólusváltásai között. A Nap aktivitása sokfajta periodicitást mutat, a legfontosabb a Nap mágneses pólusainak változásával kapcsolatos 11 éves periodicitás.

NASA pályára állított, a Föld magnetoszféráját vizsgáló IMAGE (Imager for Magnetopause to Aurora Global Exploration) űrszondája minden eddiginél részletesebb képet nyújt a bolygónkat burkoló láthatatlan mágneses tér, a magnetoszféra szerkezetéről és a benne mágneses viharok során végbemenő folyamatokról. Ez a mágneses pajzs óvja bolygónkat a napszéltől, amely hasonló védelem hiányában már rég „elfújta" például a Mars légkörét. Erőteljes napkitörések a magnetoszférát energiával töltik fel, s mágneses viharokat keltenek benne, amelyek zavarokat okozhatnak a műholdak, a távközlési és az energiaellátó rendszerek működésében. Hasonlóképpen torzítja el a napszél is a Föld magnetoszféráját. A napszéllel másodpercenként 1 millió tonna atomi és szubatomi részecske hagyja el a napot, melyek 24-36 óra alatt érik el a Földet. A Föld közelébe érve ezeket az elemi részecskéket a Föld (saját) mágneses erőtere csapdába ejti és a sarkok felé irányítja, megvédve a Föld élővilágát, és egyúttal egy misztikus fényjelenség, az Északi Sark felett "Auroral Ovals" Északi fény, míg a Déli Sark felett "Auroal Australis" Déli fény keletkezik. Erős napkitörések alkalmával nagyobb kiterjedésűvé válnak ezek a fények. Volt már rá példa, hogy Magyarországról is látható volt ez a jelenség. A Napból érkező hatalmas mennyiségű energia megváltoztatja a Föld ionoszféráját. Az ionoszféra nagyrészt elektromosan töltött részecskékből, ionokból és elektronokból áll. A Föld közelébe érkező energia "lövedékek" hatással vannak a magnetoszférára, aktív naptevékenység esetén napokra megzavarva a föld mágneses mezejét. Az ilyen energiaviharok a sarkokhoz közeli szélességi körök felett nagy áramokat hoznak létre a magnetoszférában, így saját mágneses erőterek jönnek létre, melyek rendkívül nagy feszültségeket indukálhatnak az ezeken a területeken kiépített elektromos, távközlési vezetékekben, de még a földbe fektetett gáz- és olajcső vezetékekben is. Erős naptevékenység idején, mágneses viharok idején ún. ionoszféra viharok jönnek létre, melyek jelentős befolyással vannak a rádióhullámok terjedésére. A viharnak több hatása várható a Földön (pl. az energiahálózatban kisebb ingadozás, az űrközlésben irányítási problémák). Az ionoszféra viharok és földmágneses rendellenességek kihatnak az élő szervezetekre is (pl. ilyenkor a madaraknál is navigációs problémák fordulhatnak elő). Saját kísérleteinkkel elsőként szolgáltattunk adatokat annak bizonyítására, hogy az endocrin rendszerekben rövid ideig taró, átmeneti ritmuszavart okoz.

6.3.2 A mágneses vihar hatásai

A Zhadin [96] által készített tanulmány már az 1880-as években rávilágított a Föld körüli mágneses mező megváltozásának biomedicinális és szociológiai jelentőségére. A „távoli elektromosság psychosocialis aktivitása" terén V. Danilevsky végzett kutatást a 20. század fordulóján, a későbbiekben V. Vernadsky és A.L. Chizhevsky munkája nyomán ez a kutatás tovább bővült. Azonban a statisztikai megközelítések elégtelenek voltak, a periódusok intervallumainak becslése és a ciklusok egyéb jellemzői is hiányoztak. [97, 98] Burch és mtsai [99] és Weydahl és mtsai [100] már kimutatták humán vizeletben a melatonin csökkenését erős geomagnetikus aktivitással kapcsolatban. Bardassano és mtsai [101] patkányok tobozmirigyében a pynealocytak synapticus összeköttetéseinek számában észleltek csökkenést a geomagnetikus vihar során, összehasonlítva a csendes napokkal. Sliwowska et al. [102] autoradiográfiai meghatározással ^{125}I-melatonin receptort expresszáló neuronokat mutattak ki birka hypothalamusban, mely elsők között igazolta a melatoninkötő helyek meglétét az agyban. A mágneses vihar hatását egy elektronmikroszkópos adat is alátámasztja [103]. Egy másik adat nyulak cardiovascularis rendszerének circadian ritmus paramétereiben mutatott ki fázis-eltolódást [104]. Azonban a mágneses vihar hatása az élő szervezetre, ezen belül az endocrin rendszerekre, nagyrészt ismeretlen maradt.

Az előzőekben vázolt állatmodellen végzett vér és egyéb szövetmintavétel eredményeinek elemzése során vizsgáltuk a mágneses tér hatását az endocrin ritmusokra azzal a "hibával", hogy miután a modellünk lehetővé tette a kizárólag nappali munkaidőben történő mintavétellel a 24 órás circadian spektrum lefedését 7 napon keresztül, a mágneses vihar hatásai az éjszakai időszakban nem kerültek felismerésre. Mivel a 7 nap / 24 órás kísérlet (nappali mintagyűjtés antifázisos megvilágítási renddel) napjai egybeestek majd közvetlenül követték a mérsékelt kettős mágneses vihar második „extremum"-át (Kp 6,3-as értéket ért el április 3-án 18 órakor és április 4-én éjfélkor, a Dst lecsökkent -112 nT-re április 4-én 0 óra 30-kor és -81 nT-re április 5-én 19.30-kor), ez a véletlenszerű egybeesés nem volt előre betervezhető. Az adatok kielemzésekor feltűntek, az akkor még megmagyarázhatatlan eltérések a tobozmirigy és a hypothalamus melatonin koncentrációk napi változásában. A retrospektív módon megszerzett adatok igazolták

a közepes erősségű mágneses vihart. Az adatok ritmusparaméter elemzése cosinor módszerrel történt mely kimutatta a MESOR, a circadian amplitúdó (A) és a circadian akrofázis eltéréseket, melyek a viharral egyidejűleg ellenkező tendenciájú változásokat mutattak a tobozmirigy és a hypothalamus melatonin koncentrációk alapján a ritmuspartaméterekben a csendes napokhoz képest. Ez a vizsgálat az első bizonyíték az irodalomban arra vonatkozóan, hogy in vivo modellben a nem-fény (non-photic) stimulus miként hat a circadian ritmusra és a melatonin szintekre.

6.4 A kidolgozott állatkísérleti modell felhasználásával az extracircadian endothelin-1 termelődés vizsgálata patkány vérplazmában és tobozmirigyben, valamint emberi vérben

Az endothelin-1 napi ritmusára vonatkozóan egymásnak ellentmondó kutatási eredmények láttak napvilágot az elmúlt években. Van, amely circadian ritmust igazolt humánban [105], míg számos további kutatás ezt nem igazolta. Jelen vizsgálatunkban nem tudtuk igazolni a circadian ritmust, összhangban azokkal a korábbi munkákkal, amelyek az emberi vérben keringő ET-1 hasonló, kb. 8-órás ritmusát írják le és egy korábbi kutatásból származó adattal, mely az egér corpus pineale és a bőr endothelialis ET-1 ritmusát is hasonlóképpen jellemezte [106, 107]. A szakirodalom áttekintése során azt tapasztaltuk, hogy nagyon kevés konkrét adat áll rendelkezésre, bár az endothelin-1 jelentőségét régóta kutatják. Az utóbbi időben néhány neuropeptid esetében ultradián kiemelkedést találtak. Egy 12 órás összetevőt találtunk egy friss közlemény [108] adatainak meta-elemzésével.

6.5 A kidolgozott állatkísérleti modell felhasználásával a krónikus enyhe stressz endocrin rendszer ritmusára gyakorolt hatásainak vizsgálata

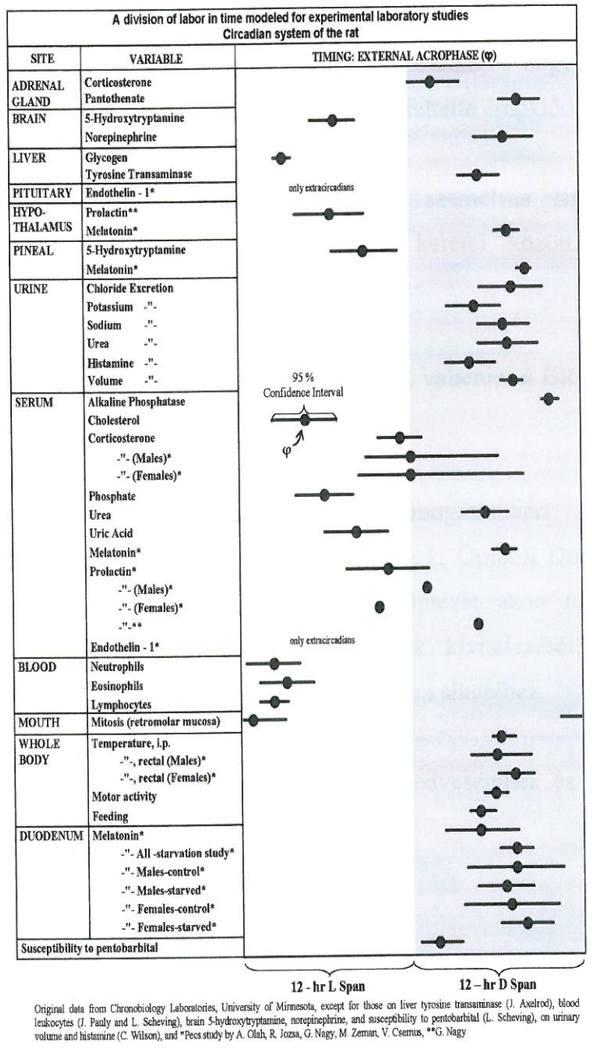
Az állatkísérleti modell felállításával a különböző műszakrendek hatásait az állati szervezetek biológiai ritmusaira igyekeztünk vizsgálni kísérletünkkel. Miután ilyen jellegű irodalmi adat nem található, megállapításainkat nem tudjuk másokéval

összevetni. A kísérleteink alapján, bár kisszámú állatmintákon dolgoztunk, mégis levonható az a következtetés, hogy a megvilágítási rendek gyakori változtatása kisfokú ritmuszavart eredményez, amplitúdó csökkenést mutat a ritmus görbe. A másik következtetés az, hogy a ritmuszavar kialakulásában a gyakori megvilágítási rend váltás (shift) erősebb stimulus, mint a krónikus enyhe stressz.

6.6 Különböző változók kronomja: circadian ritmus-akrofázisok eltérő megjelenése. Circadian fázis-térkép laboratóriumi patkányban

A 30. ábrán látható circadian fázistérkép összegzése annak, amelyet a saját és más laboratóriumok vizsgálatai alapján a ritmus akrofázisok értékeiről ismerünk a különböző változók kapcsán. A térkép alapján jól látható a lényeges különbség az akrofázisok között, melyek vagy a világos, vagy a sötét szakaszra esnek. Anélkül, hogy minden egyes változó esetén részletes elemzést nyújtanánk, a lényeget emelném ki, nevezetesen azt, hogy a fény-sötét periódusok változásai, a napszakok változásai nem azonos módon határozzák meg a ritmusok legmagasabb értékeit. Függ a fajtól, szövettől, mintavétel helyétől, mindez ráirányítja a figyelmet arra, hogy a vizsgálatokkor mindig nagyon pontosan meg kell adni a mintavétel időpontját. Ellenkező esetben könnyen hamis következtetésekre juthat a vizsgáló [109].

Az állatkísérleti modell felállítását követően jelenleg is zajló kutatásainkban a különböző műszakrendek hatásait vizsgáljuk az állati szervezetek biológiai ritmusaira. Következő lépcsőfokként humán területre is szeretnénk vizsgálatainkat kiterjeszteni és a nemzetközi szakirodalomban a váltóműszak hatásai tekintetében még nemzetközi viszonylatban sem feltérképezett területekre kívánjuk kiterjeszteni vizsgálatunkat (pl.: stressz hatásokkal kombinálva, óragének vizsgálatával kiegészítve, táplálkozással összefüggésbe hozva). Reményeink szerint vizsgálataink hozzájárulhatnak az egészségügyi szakdolgozók – és közülük is kiemelten a több műszakban leginkább tevékenykedő, legnagyobb méretű szakdolgozói közösség – testi, lelki egészségének megőrzéséhez és az optimális műszakrendek kidolgozásához.



Original data from Chronobiology Laboratories, University of Minnesota, except for those on liver tyrosine transaminase (J. Axelrod), blood leukocytes (J. Pauly and L. Scheving), brain 5-hydroxytyptamine, norepinephrine, and susceptibility to pentobarbital (L. Scheving), on urinary volume and histamine (C. Wilson), and *Pees study by A. Oláh, R. Jozsa, G. Nagy, M. Zeman, V. Csernus, **G. Nagy

30. ábra Circadian fázis-térkép laboratóriumi patkányban [109]

7 Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönetet mondok témavezetőmnek, dr. Józsa Ritának lelkiismeretes és áldozatos támogatásáért, szakmai irányításáért.

Köszönetet mondok dr. Tahin Tamásnak azért, hogy lehetőséget biztosított kezdő oktatóként a bizonyításra, valamint felkeltette érdeklődésemet a kutatási téma iránt.

Köszönöm prof. dr. Bódis József személyes támogatását és a PTE ETK Egészségtudományi Doktori Iskola keretei között végzett kutatás hátterének biztosítását.

Köszönöm prof. dr. Franz Halbergnek, valamint a BIOCOS csoport tagjainak, hogy részt vehettem a team munkájában.

Köszönetemet fejezem ki támogatásukért munkatársaimnak, lelkes együttműködésükért TDK hallgatóimnak, Ömböli Dórának a technikai segítségért, valamint a PTE ÁOK Anatómiai Intézet azon további munkatársainak, akik munkájukkal segítették a vizsgálatok kivitelezését, illetve mindazoknak, akik tevékenységükkel hozzájárultak munkám sikeréhez.

Végezetül köszönetemet fejezem ki kedvesemnek és családunknak a szeretetteljes támogatásért.

8 Irodalomjegyzék

[1] Takahashi, J.S. and M. Menaker. 1979. Brain mechanisms in avian circadian systems. In: *Biological Rhythms and Their Central Mechanism*, M. Suda, O. Hayaishi and H. Nakagawa (eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, pp. 95-109.

[2] Van den Pol AN: The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. J Comp Neurol 1980 191,661-702

[3] Liu C, Weaver DR, Strogatz SH, Reppert SM Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. Cell. 1997 12;91(6):855-60.

[4] Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, Reppert SM Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock.Neuron.199719(1):91-102

[5] Morin LP: SCN organization reconsidered. J Biol Rhythms 2007, 22(1), 3-13

[6] Gronfier C, Wright KP, Kronauer RE, Czeisler CA: Entrainment of the human circadian pacemaker to longer-than-24-h days, Proc Natl Acad Sci USA 2007, 104/21, 9081-6

[7] Framme J, Dangardt F, Marild S, Osika W, Wahrborg P, Friberg P24-h Systolic blood pressure and heart rate recordings in lean and obese adolescents.Clin Physiol Funct Imaging. 2006 Jul;26(4):235-9.

[8] Abrahamson EE, Moore RY :Lesions of suprachiasmatic nucleus efferents selectively affect rest-activity rhythm.Mol Cell Endocrinol. 2006 Jun 27;252(1-2):46-56

[9] Naska A, Oikonomou E, Trichopoulou A, Psaltopoulou T, Trichopoulos D Siesta in healthy adults and coronary mortality in the general population. Arch Intern Med. 2007 Feb 12;167(3):296-301irodalom.

[10] Bodis J, Koppán M: A női ivari ciklus. Biologiai Órák, Akadémiai Kiadó, Bp. 2006,151-161.

[11] Csernus V, Becher P, Mess B.Wavelength dependency in light-induced changes in rhythmic melatonin secretion from chicken pineal in vitro. Neuroendocrinol Letters 1999 20, 307-312

[12] Csernus V:The avian pineal gland.Chronobiol Int. 2006;23(1-2):329-39.

[13] Pevet P, Agez L, Bothorel B, Saboureau M, Gauer F, Laurent V, Masson-Pevet Melatonin in the multi-oscillatory mammalian circadian world.Chronobiol Int. 2006;23(1-2):39-51. Review

[14] Murakami N, Kawano T, Nakahara K, Nasu T, Shiota K.:Effect of melatonin on circadian rhythm, locomotor activity and body temperature in the intact house sparrow, Japanese quail and owl.Brain Res. 2001 Jan 19;889(1-2):220-4.

[15] Donald C. Sanders, Arvind K. Chaturvedi, Jerry R. Hordinsky; Melatonin: Aeromedical, Toxicopharmacological, and Analytical Aspects; Journal of Analytical Toxicology, Vol 23, May/June 1999. 159-167.

[16] L. Weibel; G. Brandenberger: Disturbances in Hormonal Profiles of Night Workers during Their Usual Sleep and Work Times; Journal of Biological Rhythms, Vol. 13, No. 3; 1998; 202-208.

[17] Juergen Hennig, Peter Kieferdorf, Christoph Moritz, Sonja Huwe, Petra Netter: Changes in cortisol secretion during shiftwork: implications for tolerance to shiftwork?; Ergonomics, 1998. Vol. 41, No 5. 610-621.

[18] Geraint Florida-James, Akthar Wallymahmed, Thomas Reilly: The effects of night-shift work on the mood state among university school of nursing students.; Chronobiology International 1996, 13(1), 59-69.

[19] Mikko I Härmä, Juhani E Ilmarinen: Towards the 24-hour society – new approaches for aging shift workers?; Scand J Work Environ Health 1999; 25 (6. special issue) 610-615.

[20] Anne Spurgeon, J Malcolm Harrington, Cary L Cooper: Health and safety problems associated with long working hours: review of the current position; Occup Environ Med 1997; 54: 367-375.

[21] Andres Knutsson Shiftwork and myocardial infarction: a case-control study Occup Environ Med 1999; 56: 46 50

[22] Scott Davis, Dana K. Mirick, Richard G. Stevens Night Shift Work, Light at Night, and Risk of Breast Cancer Journal of the National Cancer Institute -2001;Vol. 93 No 20

[23] A. Marazzi, C. Ruffieux, G. Cornélissen: Circadian and circaseptan patterns of natality and perinatal mortality of infants with different birth weights; Neuroendocrinol Lett 2003; 24 (Suppl 1): 105-110.

[24] Nira Ben Jonathan, Robert Hnasko Dopamine as a Prolactin (PRL) Inhibitor. Endocrine Reviews 22(6): 724-763.

[25] Hefco V, Olariu A, Hefco A, Nabeshima T. The modulator role of the hypothalamic paraventricular nucleus on immune responsiveness. Brain Behav Immun. 2004 Mar;18(2):158-65.

[26] Gadó K, Nagy G, Hasitz Á, Tóth BE, Rimanóczi É, Domján Gy (2001) Evidence of prolactin immunoreactivity in the bone marrow of untreated multiple myeloma patients. Neuroimmunomodulat, 9, 95-102.

[27] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature. 1988 Mar 31;332(6163):411-5.

[28] Halberg F, Cornélissen G, Spector NH, Sonkowsky RP, Otsuka K, Baciu I, Hriscu M, Schwartzkopff O, Bakken EE.(2003b) Stress/strain/life revisited. Quantification by blood pressure chronomics: benetensive, transtensive or maletensive chrono-vasculo-neuro-immuno-modulation. Biomedicine & Pharmacotherapy 57 (Suppl 1): 136s-163s

[29] Schiffrin EL, Lariviere R, Li JS, Sventek P, Touyz RM Endothelin-1 gene expression and vascular hypertrophy in DOCA-salt hypertension compared to spontaneously hypertensive rats.Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl. 1995 Dec;22(1):S188-90.

[30] Park J., Ha M., Yi Y., Kim Y.(2006) Subjective ftigue and stress hormone levels in urine according to duration of shiftwork. J Occup Health. Nov;48(6):446-50.

[31] Muecke S. 2005. Effects of rotating night shifts: literature review J Adv Nurs. May;50(4):433-9. Review.

[32] West S. 2001 Circadian rhythm, shiftwork and you! Collegian. Oct;8(4):14-21.

[33] Folkard S, Lombardi DA, Spencer MB. (2006) Estimating the circadian rhythm in the risk of occupational injuries and accidents. Chronobiol Int.;23(6):1181-92.

[34] Csernus Valér, Mess Béla Biológiai órák ritmikus biológiai folyamatok az élővilágban (2006.), Akadémiai Kiadó, Budapest.

[35] Helfferich Frigyes, Uhereczky Gabriella, Boldogkői Zsolt, Dr. Palkovits Miklós 2003. Az audiogén stressz felszálló pályájának nyomonkövetése Pseudorabies virus központi idegrendszeri terjedésének felhasználásával, patkányban.

http://www.phd.hu/tavasz2003/tsz_2003/tudomanyosszekciok/tavasziszel2003_helfferichfrigyes.htm

[36] Pikó Bettina. 1999. Munkahelyi stressz a nővérek körében: kik a legveszélyeztetettebbek? In: Szenvedélybetegségek. 7. évf. 4. sz., p. 272-281. p. 280-281, 8

[37] Pikó Bettina. 2001. A nővéri munka magatartás-tudományi vizsgálata: pszichoszomatikus tünetek, munkahelyi stressz, társas támogatás. In: Lege artis medicinae. -. 11. évf. 4. sz., p. 318-325. p. 324-325.

[38] Pikó Bettina, Piczil Márta. Az elégedettség és elégedetlenség szociológiai vizsgálata a nővéri hivatásban. In:Lege artis medicinae. - 1998. 8. évf. 10. sz., p. 728-734. p. 734, 8

[39] Yang, Yong d; Koh, David, Vivian Lee, Francis Chun Yue; Chan, Gregory Dong, Fang; Chia Salivary Cortisol Levels and Work-Related Stress Among Emergency Department Nurses. Journal of Occupational & Environmental Medicine. 43(12):1011-1018, December.

[40] Karasek R, Brisson C, Kawakami N, Houtman I, Bongers P, Amick B. The Job Content Questionnaire (JCQ): an instrument for internationally comparative assessments of psychosocial job characteristics. Journal of Occupational Health Psychology 1998 Oct;3(4):322-55.

[41] Johannes Siegrist: Adverse Health Effects of High-Effort/Low-Reward Conditions Journal of Occupational Health Psychology, Volume 1, Issue 1, January 1996, Pages 27-41

[42] Kerr MS, Laschinger HK, Severin CN, Almost JM, Shamian J. New strategies for monitoring the health of Canadian nurses: results of collaborations with key stakeholders. Can J Nurs Leadersh. 2005;18(1):67-76, 78-81. Review.

[43] Chen H, Schernhammer E, Schwarzschild MA, Ascherio A. A Prospective Study of Night Shift Work, Sleep Duration, and Risk of Parkinson's Disease. Am J Epidemiol. 2006 Apr 15;163(8):726-30. Epub 2006 Feb 22.

[44] Scott Davis, Dana K. Mirick, Richard G. Stevens, Residential magnetic fields and the risk of breast cancer. Natl Cancer Inst, 93:1557-62

[45] Ronald D. Novak és Susan E. Auvil-Novak Investigations of the difficulties and coping strategies for night-shift duty nursing work: An analyis using focus groups. Chronogiology International, 13(6), 457-463 (1996)

[46] Maureen C Hatch, Irene figa-Talamanca, Silvana Salerno 1999 Workplace- stress and menstrual cycle in circle of American and Italian nurse Scand J Work Environ Health 25(2): 144-150

[47] Halberg F. Physiologic considerations underlying rhythmometry, with special reference to emotional illness (1968) Symposium on Biological Cycles and Psychiatry. In: Symposium Bel-Air III. Cycles biologiques et psychiatrie / publié sous la direction du professeur J. de Ajuriaguerra. Geneva: Georg / Paris: Masson et Cle pp. 73-126.

[48] Costa, G, Lievore, F, Casaletti, G., Gaffuri, E, Folkard, S. (1989)Circadian characteristics influencing individual differences in tolerances and adjustment to shift work. Ergonomics, 32,373-85.

[49] Minors DS and Waterhouse JM (1983) Circadian rhythm amplitude -- is it related to rhythm adjustment and/or worker motivation? Ergonomics 26(3), 229-241.

[50] Florida-James G, Wallymahmed A, Reilly T (1996) Effects of nocturnal shiftwork on mood states of student nurses. Chronobiology International 13 (1), 59-69.

[51] Muscat R and Willner P (1992) Suppression of sucrose drinking by chronic mild unpredictable stress: a methodological analysis. Neurosci Biobehav Rev 16, 507–517

[52] Willner P (1997) Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. Psychopharmacology (Berl) 134, 319–329

[53] Grippo AJ, Beltz TG and Johnson AK (2003) Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. Physiology and Behavior 78, 703-710

[54] Ayensu WK, Pucilowski O, Mason GA, Overstreet DH, Rezvani AH, Janowsky DS (1995) Effects of chronic mild stress on serum complement activity, saccharin preference, and corticosterone levels in Flinders lines of rats. Physiol Behav. 57, 165–169

[55] Bielajew C, Konkle AT, Merali Z (2002) the effects of chronic mild stress on male Sprague-Dawley and Long Evans rats: I. Biochemical and physiological analyses. Behav Brain Res. 136(2), 583-92

[56] Murison R and Hansen AL (2001) Reliability of the chronic mild stress paradigm: implications for research and animal welfare. Integr Physiol Behav Sci 36, 266–274.

[57] Fraser S, Cowen P, Franklin M, Franey C, Arendt J. Direct radioimmunoassay

for melatonin in plasma. Clin Chem 1983;29:396–7.

[58] Kacsóh B, Tóth BE, Avery LM, Grosvenor CE In vitro control of prolactin (PRL) and growth hormone secretion of neonatal rat pituitary glands: effects of ovine PRL, salmon calcitonin, endothelin-3, angiotensin II, bromocryptine and somatostatin. Life Sci. 1993;52(3):259-69.

[59] Oláh A, Müller A, Betlehem J, Józsa R. Possible Application of Animal Models for the Long-Term Investigation of Shift Work of Healthcare Professionals. J Perinat Neonatal Nurs. 2008 January/March;22(1):4-5.

[60] Oláh A., Józsa R., Cornélissen G., Zeman M., Nagy Gy., Kaszaki J., Csernus V., Weihong P., Halberg F.: Validation of exclusive daytime murine sampling on antiphasic lighting regimens by circadian rhythmic core temperature behavior. Proceedings of Symposium on Chronobiology in Medicine, 2004, Brno pp. 100-101.

[61] Józsa, R., Oláh, A., Cornélissen, G., Csernus, V., Otsuka, K., Zeman, M., Nagy, G., Kaszaki, J., Stebelova, K., Csokas, N., Pan, W., Herold, M., Bakken, E.E., Halberg, F.: Circadian and extracircadian exploration during daytime hours of circulating corticosterone and other endocrine chronomes. - Biomedicine and Pharmacotherapy 2005, 59, S109-S116

[62] Józsa R, Kaszaki J, Cornelissen G, Oláh A, Nagy G, Csernus V, Zeman M, Pan WH, Halberg F. Extracircadian variation of endothelin-1 in murine plasma and pituitary and human blood. In: Cornelissen G, Kenner R, Fiser B, Siegelova J, eds. Proceedings, Symposium: Chronobiology in Medicine. Dedicated to the 85th Anniversary of Professor Franz Halberg. Brno: Masaryk University; 2004. p. 102-103.

[63] Bubenik GA. Localization of melatonin in the digestive tract of the rat. Effect of maturation, diurnal variation, melatonin treatment and pinealectomy. Hormone Res 1980;12:313–23.

[64] Bubenik GA. Immunohistological localization of melatonin in. the salivary glands of the rat. Adv. in Biosci., 1980, 29, 391-395

[65] Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin: localization, function and clinical relevance. Dig Dis Sci 2002;47:2336–48.

[66] Poeggeler B. Vergleichende Untersuchungen über Melatonin und strukturverwandte Tryptophanmetabolite. Zur Rolle von Melatonin und 5-Methoxytryptamin bei einem Dinoflagellaten, Gonyaulax polyedra, sowie pinealen

und extrapinealen 5-methoxylierten Indolaminen bei Vertebraten. Doctoral thesis, Göttingen 1992.

[67] Stebelova, K., Zeman, M., Cornélissen, G., Bubenik, G., Jozsa, R., Hardeland, R., Poeggeler, B., Huether, G., Olah, A., Nagy, G., Csernus, V., Kazsaki, J., Pan, W., Otsuka, K., Bakken, E.E., Halberg, F.: Chronomics reveal and quantify circadian rhythmic melatonin in duodenum of rats . - Biomedicine and Pharmacotherapy 2005, 59, S209-S212. IF: 1.826

[68] Zeman M, Józsa R, Cornelissen G, Stebelova K, Bubenik G, Oláh A, Poeggeler B, Huether G, hardeland R, Nagy G, Csernus V, Pan W, Otsuka K, Halberg F. Chronomics: Circadian lead of extrapineal vs.pineal melatonin rhythm with an infradian hypothalamic exploration. Biomedicine & Pharmacotherapy 2005; 59 (Suppl 1): S213-S219. IF: 1.826

[69] Poeggeler B, Cornelissen G, Huether G, Hardeland R, Jozsa R, Zeman M, Stebelova K, Olah A, Bubenik G, Pan W, Otsuka K, Schwartzkopff O, Bakken EE, Halberg F.: Chronomics affirm extending scope of lead in phase of duodenal vs. pineal circadian melatonin rhythms. Biomed Pharmacother. 2005 Oct;59 Suppl 1:S219-23.

[70] Vakkuri O, Rintamaki H, Leppaluoto J. Presence of immunoreactive melatonin in different tissues of the pigeon (Columba livia). Gen Comp Endocrinol 1985;58:69–75.

[71] Zeman M, Cornélissen G, Balazova K, Herichova I, Jozsa R, Olah A, et al. Circadian acrophase differences in plasma, pineal, hypothalamic and duodenal melatonin in rats -- qualified in quail. Abstract (Read by Title) 18, Proceedings, 5th International Workshop on Chronoastrobiology and Chronotherapy, Matsubayasi K, editor. Division of Human-Nature Dynamics, Center for Southeast Asian Studies, Nov 6, 2004. pp. 81–4.

[72] Halberg F, Cornélissen G, Conti A, Maestroni G, Maggioni C, Perfetto F, et al. The pineal gland and chronobiologic history: mind and spirit as feedsidewards in time structures for prehabilitation. In: Bartsch C, Bartsch H, Blask DE, Cardinali DP, Hrushesky WJM, Mecke W, editors. The pineal gland and cancer: neuroimmunoendocrine mechanisms in malignancy. Heidelberg: Springer; 2001. pp. 66–116.

[73] Wetterberg L, Sanchez de la Peña S, Halberg F. Circadian rhythm of melatonin release from pineal, hypothalamus and pituitary in hypertensive rats. Prog Clin Biol Res 1990;341B:145–53.

[74] Huether G, Poeggeler B, Reimer A, George A. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evi dence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. Life Sci 1992;51:945–53.

[75] Székely M, Szelényi Z.: Regulation of energy balance by peptides: a review.Curr Protein Pept Sci. 2005 Aug;6(4):327-353. Review

[76] Józsa R, Halberg F, Cornelissen G, Zeman M, .Kaszaki J, Csernus V, katinas GS, Wendt HW, Schwartzkopff, Stebelova K, Dulkova K, Chibisov SM, Engebretson M, Pan W, Bubenik GA, Nagy Gy, Herold M, hardeland R, Hütler G, Pöggeler B, Tarquini R, Perfetto F, Salti R, Oláh A, Csókás N, Delmore P, Otsuka K, Bakken EE, Allen J, Amory-Mazaudin C: Chronomics, neuroendocrine feedsidewards and the recording and consulting of nowcasts –forecasts of geomagnetics. Biomedicine & Pharmacotherapy 2005; 59 (Suppl 1): S24-S30.

[77] Olah A, Jozsa R, Csernus V, Sandor J, Muller A, Zeman M, Hoogerwerf W, Cornélissen G, Halberg F. Stress, geomagnetic disturbance, infradian and circadian sampling for circulating corticosterone and models of human depression? Neurotixicity Research In press

[78] Halberg F, Visscher MB, Flink EB, Berge K, Bock F. Diurnal rhythmic changes in blood eosinophil levels in health and in certain diseases. J Lancet (Minneapolis) 1951;71:312–9.

[79] Halberg F. Some physiological and clinical aspects of 24-h periodicity. J Lancet (Minneapolis) 1953;73:20–32.

[80] Halberg F, Cornélissen G, Katinas GS, Watanabe Y, Otsuka K, Maggioni C, et al. Feedsidewards: intermodulation (strictly) among time structures, chronomes, in and around us, and cosmo-vasculo-neuroimmunity. About 10-yearly changes: what Galileo missed and Schwabe found. In: Conti A, Maestroni GJM, McCann SM, Sternberg EM, Lipton JM, Smith CC, editors. Neuroimmunomodulation (Proc. 4th Int. Cong. International Society for Neuroimmunomodulation, Lugano, Switzerland, September 29–October 2, 1999). Ann NY Acad Sci 2000;917:348–76.

[81] Halberg F, Barnum CP, Silber RH, Bittner JJ. 24-h rhythms at several levels of integration in mice on different lighting regimens. Proc Soc exp Biol (NY) 1958;97:897–900.

[82] Glick D, Ferguson RB, Greenberg LJ, Halberg F. Circadian studies on succinic dehydrogenase pantothenate and biotin of rodent adrenal. Am J Physiol 1961;200:811–4.

[83] Halberg F, Cornélissen G, Katinas G, Syutkina EV, Sothern RB, Zaslavskaya R, et al. Transdisciplinary unifying implications of circadian findings in the 1950s. J Circadian Rhythms 2003; 1:2. 61 pp. [www.JCircadianRhythms.com/content/pdf/1740–3391/1/2.pdf].

[84] Pincus G. A diurnal rhythm in the excretion of urinary ketosteroids by young men. J Clin Endocrinol 1943;3:195–9.

[85] Cornélissen G, Halberg F. Introduction to chronobiology. Medtronic chronobiology seminar 7, April 1994, 52 pp. (Library of Congress Catalog Card #94–060580; http://www.msi.umn.edu/~halberg/).

[86] Wetterberg L. Melatonin involvement in cancer: methodological considerations. In: Bartsch C, Bartsch H, Blask DE, Cardinali DP, Hrushesky WJM, Mecke W, editors. The pineal gland and cancer: neuroimmunoendocrine mechanisms in malignancy. Heidelberg: Springer; 2001. pp. 117–49.

[87] Halberg F, Visscher MB, Bittner JJ. Eosinophil rhythm in mice: range of occurrence; effects of illumination, feeding and adrenalectomy. Am J Physiol 1953;174:109–22.

[88] Haus E, Halberg F. Circannual rhythm in level and timing of serum. corticosterone in standardized inbred mature C-mice. Environ Res 1970;3:81–106.

[89] Halberg F, Bittner JJ, Smith D. Belichtungswechsel und 24-Stundenperiodik. von Mitosen im Hautepithel der Maus. Z itamin-, Hormon-u Fermentforsch 1957;9:69–73.

[90] Halberg F, Hillman D, Halberg E. Circaseptan (about 7-day) cardiovascular adjustment after transmeridian round-trip (west–east–west vs. east–west–east) flights. Chronobiologia 1988;15:247–9.

[91] Hillman D, Halberg E, Halberg F. More on about-weekly (circaseptan) cardiovascular variation after transmeridian (7-h shift of schedule) east–west–east flights. Chronobiologia 1988;15:249–50.

[92] Cornélissen G, Halberg F, Wendt HW, Bingham C, Sothern RB, Haus E, et al. Resonance of about-weekly human heart rate rhythm with solar activity change. Biologia (Bratislava) 1996;51:749–56.

[93] Halberg F, Reinhardt J, Bartter FC, Delea C, Gordon R, Reinberg A, Ghata J, Halhuber M, Hofmann H, Gunther R, Knapp E, Pena JC, Garcia Sainz M. Agreement in endpoints from circadian rhythmometry on healthy humans beings living on different continents. Experientia. 1969 Jan 15;25(1):107-12.

[94] Cardinali DP. Effect of melatonin on 24-hour rhythms of ornitin decarboxylase activity and norepinephrine and acetylcholine synthesis in submaxillary lymph nodes and spleen of young and aged rats. Neuroendocrinology 1998;67:349-62.

[95] Davidson AJ, Poole AS, Yamazaki S, Menaker M.: Is the food-entrainable circadian oscillator in the digestive system? Genes Brain Behav. 2003 2(1), 32-9.

[96] Zhadin MN. Review of Russian literature on biological action of DC and low-frequency AC magnetic fields. Bioelectromagnetics 2001; 22: 27-45.

[97] Breus TK, Rapoport SI. Magnitnie bure: Medico-biologicheskie i geofizicheskie aspekti. Moscow: Sovetskiy Sport Izdatel'stvo; 2003. 192 pp.

[98] Breus TK, Chibisov SM, Baevsky RM, Schebzuhov KV. The chronostructure of heart biorhythms under effects of external environment factors. Moscow: Russian University of People's Friendship, Polygraph Service; 2002. 231 pp.

[99] Burch JB, Reif JB, Yost MG. Geomagnetic disturbances are associated with reduced nocturnal secretion of a melatonin metabolite in humans. Neurosci Lett 1999; 266: 209-212.

[100] Weydahl A, Sothern RB, Cornélissen G, Wetterberg L. Geomagnetic activity influences the melatonin secretion at latitude 70˚N. Biomedicine & Pharmacotherapy 2001; 55: 57-62.

[101] Bardasano JL, Cos S, Picazo ML. Veranderungen der Anzahl synaptischer Bander in der Pinealdruse der Ratte an geomagnetischen Ruhetagen und Gewittertagen. J Hirnforschung 1989; 30: 639-643.

[102] Sliwowska JH, Billings HJ, Goodman RL, Coolen LM, Lehman MN. Biol Reprod 2004;70:1768–75.

[103] Breus TK, Pimenov KYu, Cornélissen G, Halberg F, Syutkina EV, Baevsky RM, Petrov VM, Orth-Gomer K, Åkerstedt T, Otsuka K, Watanabe Y, Chibisov SM. The

biological effects of solar activity. Biomed Pharmacother 2002; 56 (Suppl. 2): 273s-283s.

[104] Chibisov SM, Cornélissen G, Halberg F. Magnetic storm effect on the circulation of rabbits. Biomedicine & Pharmacotherapy 2004; 58 (Suppl 1): S15-S19.

[105] Franceschini R, Gandolfo C, Cataldi A, Del Sette M, Rolandi A, Corsini G, Rolandi E, Barreca T. Twenty-four-hour endothelin-1 secretory pattern in stroke patients. Biomed Pharmacother. 2001 Jun;55(5):272-6.

[106] Manfred Herold, Germanie Cornélissen, Alexander Loeckinger, Dieter Koeberle, Paul Koenig, Franz Halberg. About 8-Hour Variation of Circulating Human Endothelin-1. Peptides, 1998. Vol. 19, 5, pp. 821-825.

[107] Katinas GS, Halberg F, Cornelissen G, Hawkins D, Bueva MV, Korzhevsky DE, Sapozhnikova LR, Rhodus N, Schaffer E. About 8- and approximately 84-h rhythms in endotheliocytes as in endothelin-1 and effect of trauma. Peptides. 2001 Apr;22(4):647-59.

[108] Khalid Elherik, Faisel Khan, Margaret Mclaren, Gwen Kennedy, Jill J.F. Belch. Circadian variation in vascular tone and endothelial cell function in normal males. Clinical Science 2002; 102: 547-552)

[109] Olah A, Jozsa R, Cornélissen G, Csernus V, Zeman M, Nagy G, Pan WH, Hoogerwerf WA, Kazsaki J, Otsuka K, Wang ZR, Sothern RB, Sothern SB, Halberg F (2006) Sampling for chronomics extended circadian phase map of the laboratory rat. Proceedings, International Conference on the Frontiers of Biomedical Science: Chronobiology, Chengdu, China pp. 46-49.

9. Publikációs lista

Nemzetközi:

Folyóirat közlemény:	**12 db** Impact factor ≈ **22,352**
Könyvfejezet/Proceedings:	**10 db**
Idézhető előadás absztrakt:	**8 db**

Magyar:

Folyóirat közlemény:	**4 db**
Könyv:	**2 db**
Könyvfejezet:	**1 db**
Idézhető előadás absztrakt:	**3 db**
Elkészült szakdolgozat témavezetője:	**5 db**

FOLYÓIRAT KÖZLEMÉNY:

1. **Olah A**, Jozsa R, Csernus V, Sandor J, Muller A, Zeman M, Hoogerwerf W, Cornélissen G, Halberg F. **Stress, geomagnetic disturbance, infradian and circadian sampling for circulating corticosterone and models of human depression?** Neurotoxicity Research, in press (Impact factor-2006: 2)
2. **Oláh A**, Müller A, Betlehem J, Józsa R. **Possible Application of Animal Models for the Long-Term Investigation of Shift Work of Healthcare Professionals.** J Perinat Neonatal Nurs. 2008 January/March;22(1):4-5. (Impact factor-2006: 1,153)
3. **Olah A**, Betlehem J, Kriszbacher I, Boncz I, Bodis J.: **Re: the clinical nursing competences and their complexity in Belgian general hospitals.** J Adv Nurs. 2007 May; 58(3): 301-2. (Impact factor-2006: 1,342)
4. Józsa R, Németh J, Tamás A, Hollósy T, Lubics A, Jakab B, **Oláh A**, Lengvári I, Arimura A, Reglődi D. **Short-term fasting differentially alters PACAP and VIP levels in the brains of rats and chickens.** Ann. N.Y. Acad. Sci., 2006. 1070:354-8. (Impact factor: 1,93)
5. Józsa R, Hollósy T, Németh J, Tamás A, Lubics A, Jakab B, **Oláh A**, Arimura A, Reglődi D: **Presence of PACAP and VIP in embryonic**

chicken brain Ann. N.Y. Acad. Sci. 2006. 1070:348-53. (Impact factor: 1,93)

6. Poeggeler B, Cornelissen G, Huether G, Hardeland R, Jozsa R, Zeman M, Stebelova K, **Olah A**, Bubenik G, Pan W, Otsuka K, Schwartzkopff O, Bakken EE, Halberg F.: **Chronomics affirm extending scope of lead in phase of duodenal vs. pineal circadian melatonin rhythms.** Biomed Pharmacother. 2005. 59 Suppl 1:S219-23. (Impact factor: 2.069)
7. Zeman M, Jozsa R, Cornelissen G, Stebelova K, Bubenik G, **Olah A**, Poeggeler B, Huether G, Hardeland R, Nagy G, Czernus V, Pan W, Otsuka K, Halberg F.: **Chronomics: circadian lead of extrapineal vs. pineal melatonin rhythms with an infradian hypothalamic exploration.** Biomed Pharmacother. 2005. 59 Suppl 1:S212-18. (Impact factor: 2.069)
8. Stebelova K, Zeman M, Cornelissen G, Bubenik G, Jozsa R, Hardeland R, Poeggeler B, Huether G, **Olah A**, Nagy G, Csernus V, Kazsaki J, Pan W, Otsuka K, Bakken EE, Halberg F.: **Chronomics reveal and quantify circadian rhythmic melatonin in duodenum of rats.** Biomed Pharmacother. 2005. 59 Suppl 1:S208-11. (Impact factor: 2.069)
9. Jozsa R, **Olah A**, Cornelissen G, Csernus V, Otsuka K, Zeman M, Nagy G, Kaszaki J, Stebelova K, Csokas N, Pan W, Herold M, Bakken EE, Halberg F.: **Circadian and extracircadian exploration during daytime hours of circulating corticosterone and other endocrine chronomes.** Biomed Pharmacother. 2005. 59 Suppl 1:S109-16. (Impact factor: 2.069)
10. Jozsa R, Halberg F, Cornelissen G, Zeman M, Kazsaki J, Csernus V, Katinas GS, Wendt HW, Schwartzkopff O, Stebelova K, Dulkova K, Chibisov SM, Engebretson M, Pan W, Bubenik GA, Nagy G, Herold M, Hardeland R, Huther G, Poggeler B, Tarquini R, Perfetto F, Salti R, **Olah A**, Csokas N, Delmore P, Otsuka K, Bakken EE, Allen J, Amory-Mazaudin C.: **Chronomics, neuroendocrine feedsidewards and the recording and consulting of nowcasts-forecasts of geomagnetics.** Biomed Pharmacother. 2005. 59 Suppl 1:S24-30. (Impact factor: 2.069)
11. Halberg E, Otsuka K, Katinas G, Sonkowsky R, Regal P, Schwartzkopff O, Józsa R, **Oláh A**, Zeman M, Bakken EE, Cornlissen G. :**A chronomic tree of life: ontogenetic and phylogenetic 'memories' of primordial cycles - keys**

to ethics. Biomedicine & Pharmacotherapy 2004; 58 (Suppl 1): S1-S11. (Impact factor: 1.826)

12. Halberg F, Cornelissen G, Regal P, Otsuka K, Wang ZR, Katinas GS, Siegelova J, Homolka P, Prikryl P, Chibisov SM, Holley DC, Wendt HW, Bingham C, Palm SL, Sonkowsky RP, Sothern RB, Pales E, Mikulecky M, Tarquini R, Perfetto F, Salti R, Maggioni C, Józsa R, Konradov AA, Kharlitskaya EV, Revilla M, Wan CM, Herold M, Syutkina EV, Masalov AV, Faraone P, Singh RB, Singh RK, Kumar A, Singh R, Sundaram S, Sarabandi T, Pantaleoni GC, Watanabe Y, Kumagai Y, Gubin D, Uezono K, **Oláh A**, Borer K, Kanabrocki EA, Bathina S, Haus E, Hillman D, Schwartzkopff O, Bakken EE, Zeman M.: **Chronoastrobiology: proposal, nine conferences, heliogeomagnetics, transyears, near-weeks, near-decades, phylogenetic and ontogenetic memories.** Biomed Pharmacother 2004; 58 (Suppl 1): S150-S186. (Impact factor: 1.826)
13. **Oláh A**., Sándor J., Boncz I., Betlehem J., Sebestyén A., Kisbenedekné Gulyás K., Dózsa Cs.: **A kistérségi egyenlőtlenségek az otthoni szakápolás vonatkozásában a dél-dunántúli térségben.** In: Nővér, 2004. 17(5) 17 - 26.
14. Betlehem J., **Oláh A**., Boncz I.: **Önkéntes ápolói nyilvántartás Németországban.** In: Nővér, 2004. 17(4) 25-28.
15. Boncz I., Sándor J., **Oláh A**., Betlehem J. Sebestyén A., Kisbenedekné Gulyás K., Dózsa Csaba: **Az otthoni szakápolás igénybevételének területi egyenetlenségei a dél-dunántúli térségben**. In: Lege Artis Medicinae, 2004. 14(1): 47 – 52.
16. **Oláh A**.: **Az ápolói készségek fejlesztése az egyetemi szintű képzésben.** In: Egészségügyi Menedzsment, 2003, V(4): 74 – 77.

KÖNYVFEJEZET/PROCEEDINGS:

1. **Olah A**, Jozsa R, Cornélissen G, Csernus V, Zeman M, Nagy G, Pan WH, Hoogerwerf WA, Kazsaki J, Otsuka K, Wang ZR, Sothern RB, Sothern SB, Halberg F (2006) **Sampling for chronomics extended circadian phase map of the laboratory rat.** Proceedings, International Conference on the Frontiers of Biomedical Science: Chronobiology, Chengdu, China pp. 46-49.

2. **Oláh A.**, Józsa R., Cornélissen G., Zeman M., Nagy Gy., Kaszaki J., Csernus V., Weihong P., Halberg F.: **Validation of exclusive daytime murine sampling on antiphasic lighting regimens by circadian rhythmic core temperature behavior.** Proceedings of Symposium on Chronobiology in Medicine, 2004, Brno pp. 100-101.
3. Zeman M., Cornélissen G., Balazova K., Józsa R., **Oláh A.**, Nagy Gy., Csernus V., Kaszaki J., Weihong P., Bubenik G., Halberg F.: **Circadian rhythm of melatonin in rat duodenum.** Proceedings of Symposium on Chronobiology in Medicine, 2004, Brno pp. 95-97.
4. Nagy Gy., Józsa R., Cornélissen G., **Oláh A.**, Zeman M., Kaszaki J., Csernus V., Weihong P., Halberg F.: **Circadian and circaseptan changes in circulating prolactin in rats.** Proceedings of Symposium on Chronobiology in Medicine, 2004, Brno pp. 98-99.
5. Józsa R., Kaszaki J., Cornélissen G., **Oláh A.**, Nagy Gy., Csernus V., Zeman M., Weihong P., Halberg F.: **Extracircadian variation of endothelin-1 in murine plasma and pituitary and human blood.** Proceedings of Symposium on Chronobiology in Medicine, 2004, Brno pp. 102-103.
6. Józsa R, Kaszaki J, Cornelissen G, **Oláh A**, Nagy G, Csernus V, Zeman M, Pan WH, Halberg F. **Circadian and infradian changes in circulating corticosterone and prolactin in rats. Abstract** (Read by Title) 20, Proceedings, 5th International Workshop on Chronoastrobiology and Chronotherapy, Matsubayasi K ed., Division of Human-Nature Dynamics, Center for Southeast Asian Studies, 2004. p. 88-93.
7. Zeman M, Cornlissen G, Balazova K, Herichova I, Józsa R, **Oláh A**, Nagy G, Csernus V, Kazsaki J, Pan WH, Bubenik G, Hardeland R, Halberg F. **Circadian acrophase differences in plasma, pineal, hypothalamic and duodenal melatonin in rats -- qualified in quail.** Abstract (Read by Title) 18, Proceedings, 5th International Workshop on Chronoastrobiology and Chronotherapy, Matsubayasi K ed., Division of Human-Nature Dynamics, Center for Southeast Asian Studies, 2004. p. 81-84.
8. **Oláh A. Registration und Fachausbildung in Ungarn.** In: Development of University Edication Nursing, Comenius University, Bratislava 2004. pp. 55-60.

9. Betlehem J., **Oláh A. The Development of the Hungarian Nursing Education in the XX- th Century.** In: Development of University Edication Nursing, Comenius University, Bratislava 2004. pp. 37-41.
10. **Oláh A.**: **Az ápolóképzés fejlődése a statisztikai mutatók tükrében.** In: Ápolóképzés a Pécsi Tudományegyetem Egészségügyi Főiskolai Karán. 15 - 45 p. Szerk.: Prof. Dr. Bódis J., **Oláh A.**: PTE EFK, Pécs, 2003.
11. Betlehem J., **Oláh A.**: **Die Entwicklung der Pflege in Ungarn.** In: Gerontologische Pflege – Pflegeberatung. Herausgeber: V. Kozon, N. Fortner. Österreichische Gesellschaft für vaskuläre Pflege, Wien, 244 p. 2003.

KÖNYV:

1. Bódis J., **Oláh A**. (szerk.): **Ápolóképzés a Pécsi Tudományegyetem Egészségügyi Főiskolai Karán.** PTE EFK, Pécs, 56 p., 2003.
2. Betlehem J., **Oláh A.** (szerk.): **Ápolói Kihívások a XXI. század elején.** Magyar Ápolástudományi Társaság, Pécs, 60 p., 2003.

HAZAI ELŐADÁSKIVONAT:

1. **Oláh A.**: **Ápolói készségek fejlesztése az egyetemi szintű képzésben.** II. ápolásmenedzsment országos konferencia, Szeged, 2002. május 9 – 10. p. 25.
2. **Oláh A.**: **Alternatív kísérlet az intenzív betegellátó szakápoló képzés részprogramjának diplomás ápoló képzésbe való integrálására.** Pécsi Tudományegyetem Egészségügyi Főiskolai Kar VIII. Tudományos Diákköri Konferencia, Szombathely, 2002. április 26-27. p. 44.
3. **Oláh A.**: **Alternatív kísérlet az intenzív betegellátó szakápoló képzés kurrikulumának a diplomás ápoló képzés kurrikulumába való beillesztésére.** Diplomás Ápolók III. Országos Konferenciája, 2001. p. 42-43.

NEMZETKÖZI ELŐADÁS KIVONAT:

1. Józsa R, **Oláh A**, Csernus V, Nagy Gy, Kaszaki J, Cornelissen G, Halberg F **Biological rhythms on antiphasic lighting regimes.** *MITT*, Budapest, 2006.

2. Boncz I, Sebestyen A, Betlehem J, **Olah A**, Dozsa C, Gulacsi L. **Introduction of health economics into decision making on public health interventions.** Eur J Health Econ, 2006, 7(S1): 20.
3. Halberg F, Cornelissen G, Jozsa R, Zeman M, Stebelova K, **Olah A**, Csokas N, Weihong P, Chobisov S, Breus T, Rostoker G, Engebretson M, Mazaudier C, Grafe A, Otsuka K, Bakken EE, Allen JH: **Circadian-circaseptan changes in plasma and pineal melatonin of rats during magnetically quiet and stormy conditions.** III.International Conference, Civilization Diseases in the Spirit of VI Verdansky, 2005. Moscow pp. 30-33
4. Jozsa R, **Oláh A**, Csokás N, Reglődi D, Cornelissen G, Nemeth J, Hollosy T, Bakken EE, Halberg F: **Chronomics of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in head and heart of chick embryos.** III.International Conference, Civilization Diseases in the Spirit of VI Verdansky, 2005. Moscow pp. 115-117.
5. Jozsa R, **Oláh A**, Csokás N, Cornelissen G, Csernus V, Zeman M, Stebelova K, Herold M, Weihong P, Bakken EE, Halberg F: **Circadian-circaseptan profile of circulating corticosterone in fed and starved rats.** III.International Conference, Civilization Diseases in the Spirit of VI Verdansky, 2005. Moscow pp. 113-114.
6. Jozsa R, Nemeth J, Tamas A, Hollosy T, Lubics A, Peter Sz, **Olah A**, Lengvari I, Reglodi D. **Short-term fasting differentially affects PACAP and VIP levels in rats and chicken**. "7th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides" Rouen, France 2005.
7. M. Zeman, K. Stebelova, G. Cornélissen, R. Jozsa, **A. Olah**, N. Csokas, W. Pan, F. J. Siegelova, B. Fiser, J. Dusek, Halberg: **Extension of chossat phenomena to rat plasma melatonin: increase in circadian amplitude during starvation.** Noninvasive methods in cardiology, 2005, Brno
8. Józsa R, **Oláh A.** Csernus V, Nagy Gy, Kaszaki J, Cornelissen G, Halberg F: **Extracircadians and circadians of corticosterone, prolactin and endothelin-1 in the rat on antiphasic lighting regimes.** *WHMA*, 2005, Budapest