

**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 tézisei

Oláh András



Doktori Iskola vezető: Prof. Dr. Bódis József PhD, DSc

Programvezető: Prof. Dr. Kovács L. Gábor PhD, DSc

Témavezető: Dr. Józsa Rita, PhD

Pécsi Tudományegyetem

Egészségtudományi Kar

2008.

1 Bevezető

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 (Takahashi et al. 1979). 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. 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).

A természeti ritmusok sokfélesége közül elsősorban a nap-éj ritmus gyakorol hatást a szervezetre, melyet a szem segítségével érzékelünk. 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 eltávolítása után az úgynevezett szabadon futó ritmus (free running) jön létre, a sejt szintű órák össze-vissza „ketyegnek” (Liu et al. 1997). Az SCN 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. (Oláh et al 2008, Morin et al. 2007).

A ritmusok és a ritmuszavarok vizsgálatának többek közt azért is van nagy jelentősége, mert a mindennapi életben a munkavállalók több mint egyharmadára gyakorolnak hatást a munkahellyel összefüggő munkarendváltozással kapcsolatos ritmuszavarok, amelyek gyakran különböző betegségekhez vezetnek.

A hétköznapi életben az egyik legismertebb ritmuszavar a melatonin-ritmus zavara jet-lag során és a váltóműszakban dolgozóknál. 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. Váltóműszakban dolgozóknál leggyakoribb, hogy alvás- és közérzetzavar jelentkezik (Donald et al. 1999), melyek hátterében többnyire nem szervi okok, hanem a külső tényezők és életmódváltozások következtében ritmus deszinkronizáció áll. A váltóműszak rövid- ill. hosszútávon más-más psychosomaticus elváltozások megjelenéséhez is vezethet. Számos közlemény vizsgálatai dokumentálják a gyomor-bél traktus-, a szív-keréngési rendszer betegségeinek (Andres Knutsson 1999) és a daganatos megbetegedéseknek (Scott Davis et al. 2001) nagyobb gyakoriságát, valamint a koraszülések nagyobb kockázatát (Marazzi et al. 2003) 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.

Nem csak az egészségügyben, de a gazdasági élet számos területén egyre nagyobb az igény arra, hogy a ritmuszavarok korai felismerésével megelőzhető legyen számos betegség. Vizsgálataink ehhez a kutatási vonalhoz csatlakozva arra keresik a választ, hogy a váltóműszakban jellemző megváltozott megvilágítási rendek és a krónikus stressz miként vezet ritmuszavarokhoz, melyek azok a ritmusparaméterek, melyeknek hosszútávú követése lehetőséget ad a ritmuszavarok korai felismeréséhez még a szervi elváltozásokat megelőzően. Elsőként olyan állatkísérleti modellt dolgoztunk ki, mely lehetővé tette a hosszútávú követést, és amely alapját képezheti a különböző ritmusparaméterek komplex vizsgálatának.

2 Célkitűzések

- A ritmus paraméterek hosszú távú követését lehetővé tevő állatkísérleti modell kidolgozása.
- A maghó és a corticosteron, mint ritmus-marker vizsgálata.
- A corticosteron, a prolactin, az endothelin-1 és a melatonin circadián- és infradián ritmusparamétereinek vizsgálata.
- A krónikus enyhe stressz és a különböző megvilágítási rendek endocrin rendszerre gyakorolt hatásainak vizsgálata.
- A tobozmirigy és a duodenum melatonin szintek ritmusparamétereinek vizsgálata éheztetést követően.

- A Föld elektromágneses terének a biológiai ritmusokra gyakorolt hatásának vizsgálata.

3 Vizsgálati anyag és módszer

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 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). Minden kísérlet megkezdése előtt elvégeztük a ritmus-markerként alkalmazott testhő és vér-corticosteron méréseket (4 óránkénti mintavétel/24 óra) annak ellenőrzésére, hogy a fordított megvilágítási rendhez történő adaptáció megtörtént-e. Az adaptáció igazolása után a kísérleteket 7-14 napig végeztük.

A vérmintákat gyors éter-altatásban szívpunkcióval nyertük (2 ml/állat). Ezután a vért 20 percen át 4°C-on centrifugáltuk (4000 rpm), majd a plazmát leválasztottuk. A kivéreztetés után cervicalis dislocatio-t követően eltávolítottuk az agyat, az agyalapi mirigyet, a tobozmirigyet, valamint néhány esetben a duodenumot is. A mintákat -70 °C-on tároltuk. A corticosteron, melatonin, prolactin, testosteron koncentrációt radioimmunoassay-val (RIA) határoztuk meg plazmából. Az Endothelin-1 meghatározása ELISA módszerrel történt. Az adatokat cosinor módszerrel és paraméter tesztekkel analizáltuk.

Vizsgálataink során modelleztük az ápolói munkakörrel kapcsolatos leggyakoribb műszakrendeket is, arra keresve a választ, hogy a krónikus enyhe stressz (CMS protokoll) önmagában alkalmazva és ismétlődő változó megvilágítási rendekkel kombinálva miként befolyásolja a ritmusparamétereket adott hormonok esetén.

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. 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.

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). Mielőtt a két különböző megvilágítású helyiségbe 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.

4.1.2 A testhőmérséklet ritmusának vizsgálata a kidolgozott állatkísérleti modellben

A maghőmérséklet circadian ritmusának tesztelésére a 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 egyaránt.

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: $37,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ vs. $36,8\text{ }^{\circ}\text{C}$, $F=3,189$, $P=0,096$; DL: $37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ vs. $37,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, $F=5,547$, $P=0,038$). 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. Mindkét megvilágítási rend (LD és DL) esetén a nőstényeknél kissé magasabb a ritmus-középérték (M , MESOR). Az adatok azt is megmutatják, hogy fáziseltolódás (θ) 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° . A nőstény állatok testhőmérséklete magasabb, mint a hím állatoké (LD: $P=0,060$). A maghőmérséklet átlagértékeinek ábrázolásakor jellegzetes sinus görbe ritmus látható, a legmagasabb értékek az aktivitás periódusában, a sötét szakaszban vannak.

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. 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.

A teljes napos mintavételezés adatai megmutatták, hogy a corticosteron szintek minden vizsgált időpontban magasabbak a nőstényekben, mint a hímekben. A nemek közti különbség mindegyik csoport átlagértékeiben is kimutatható (világos periódus: 530 ± 64 nmol/l (nőstény) vs. 235 ± 27 nmol/l (hím), $t=4,226$, $P<0,001$; sötét szakasz: 826 ± 87 nmol/l (nőstény) vs. 474 ± 51 nmol/l (hím), $t=3,541$, $P<0,001$). Paraméter tesztel 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 modellenél kidolgozott protokoll szerint. 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.

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

A hím (M) és a nőstény (F) állatokban (M: $n=52$, F: $n=51$) mért prolactin szintek vizsgálata során 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: $158,4 \pm 38,4$ ng/ml(nőstény) vs. $48,3 \pm 4,1$ ng/ml (hím), $t=2,852$, $P=0,006$; DL12:12: $124,4 \pm 17,3$ ng/ml (nőstény) vs. $50,8 \pm 4,4$ 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 háttérében 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 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 $\log_{10}$ -transzformációval 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 szignifikáns különbséget igazolt a 24-órás amplitúdók esetén is ($F=4,440$, $P=0,040$).

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 ($n=34$). 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. A hypophysisben mért csúcsok egybeesést mutatnak a plazma csúcsokkal a sötét periódusban a világos szakaszban kismértékű, de nem szignifikáns fáziskésés mutatható ki. A hypophysisben az ET-1 ultradián ritmus nem szignifikáns, ennek ellenére a koncentrációváltozása lineáris korrelációt mutat a plazmából mért endothelin-1 szintekkel ($r=0,376$; $P=0,084$).

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

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 (Bubenik et al. 1980). 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 korábbi irodalmi adatokból ismert circadian ritmusát (Poeggeler et al. 1992). A $\log_{10}$ -transzformáció során nyert értékek sokkal jobban megközelítik a jellegzetes circadian mintázatot a sötét periódusban jelentkező csúccsal (HALO 20). 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.

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 és az, hogy a legmagasabb értékek a HALO16-20 között vannak ($P<0,001$).

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 referenciaértéknek. 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 kiskoban a duodenum és a hypothalamus ($P=0,100$) akrofázisok összehasonlításában. A duodenum melatonin akrofázisa ($P=0,015$), valamint kismértékben ugyan, de a hypothalamus melatonin-akrofázis ($P=0,021$) is megelőzi a tobozmirigy melatonin akrofázisát.

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

Ez a kísérlet (2005. április 8. – április 14. M: n=84, F: n=84) arra kereste a választ, hogy a táplálék 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.

A kísérlet megkezdése előtt a vizsgálati anyag és módszer részben ismertetettek szerint 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.

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 **vérből** 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. 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.

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 amplitúdó (és alacsonyabb MESOR) jellemző.

Az általunk kidolgozott állatkísérleti modell lehetővé tette az extracircadian variációk tanulmányozását is. A 7-napos követéssel az összetett komponensű cosinor vizsgálat a 24- és 12-órás komponensek jelenlétét mutatta ki, melyek a variációk 66-78%-ért felelősek. A circaseptan komponens megléte csak a tobozmirigyben igazolódott ($P<0,001$).

4.1.8 Mágneses vihar hatása a melatonin ritmusára

Ezek az eredmények abból a kísérleti sorozatból származnak, melynek egy része egy közepes erősségű mágneses vihar második kitörési maximumának idejére esett (M: $n=52$, F: $n=51$). A kísérlet ezen 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>).

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).

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. A corticosteron koncentrációk MESOR és amplitúdó értékei nagyobb variabilitást mutatnak a viharos napokon.

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) és testosteron: 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 ($P < 0,001$). A testosteron szint a CMS kezelt állatokban szignifikáns csökkenés mutatkozott a kontrollokhoz képest.

Ritmuskomponensek: Corticosteron, testosteron és serotonin került meghatározásra a 4 hetes CMS expozíciót követően. 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-stresszelték 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 tesztel 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. 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. A tesztoszteron 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.

5 Új eredmények és gyakorlati hasznosítás

1. Új állatkísérleti protokollt fejlesztettünk ki, amely lehetővé teszi a hosszabb időtartamú ritmusvizsgálatokat. 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, így 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 bemutatunk. Úgy tűnik, hogy a megvilágítási rendek többszöri megváltoztatása önmagában nagyobb megterhelést (ritmuszavart) okoz, legalábbis a corticosteron időstruktúrájában, mint a CMS.

6 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 háttérének 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 családnak a szeretetteljes támogatásért.