

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Studijní program – Experimentální chirurgie

RNDr Lenka Řezáčová, PhD

Způsoby a důsledky některých neurochirurgických zákroků
v animálním modelu a v humánní klinice.

Pinealektomie a intracerebroventrikulární aplikace.

disertační práce

Methods and consequences of some neurosurgical interventions
in animal model and in human clinic.

Pinelectomy and intracerebroventricular application.

Školitel: Doc. MUDr. Michal Tichý, CSc.

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 16.02.2022

RNDr Lenka Řezáčová, PhD

Identifikační záznam:

ŘEZÁČOVÁ, Lenka *Způsoby a důsledky některých neurochirurgických zákroků v animálním modelu a v humánní klinice. **Pinealektomie a intracerebroventrikulární aplikace.** [Methods and consequences of some neurosurgical interventions in animal model and in human clinic. Pinelectomy and intracerebroventricular application.]* Praha 2022. 102s, 18 listů příl. Disertační práce (PhD.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, 2022, Školitel Tichý, Michal.

Abstrakt:

Klinické chirurgické techniky pinealektomie a intracerebroventrikulární (i.c.v.) kanylace jsou stále v indikovaných případech v klinice používány. Ve výzkumu je snaha klasické chirurgické techniky nahrazovat jinými způsoby. Tyto nejrůznější nové modely však často neodrážejí komplexitu funkcí probíhajících v živém organismu jako celku. V práci je ukázáno, že tyto chirurgické techniky by měly být i nadále součástí biomedicínského výzkumu, neboť stále přinášejí potřebné nové informace. V experimentu může sloužit technika pinealektomie jako model resekce či deplece (odstranění přirozené sekrece hormonu), zatímco i.c.v. aplikace účinné látky do mozkových komor naopak jako model adice či substituce.

Experimentální část práce je rozdělena do 4 okruhů: A) pinealektomie – animální modely, B) pinealektomie – v experimentu, C) pinealektomie – v klinické praxi a D) intracerebroventrikulární aplikace – v experimentu. V práci je podrobně popsána chirurgická technika a diskutovány možné důsledky provedené pinealektomie u 6 druhů zvířat (a jejich vzájemného porovnání) a u člověka. Součástí je i provedený experiment s pinealektomií u potkana a klinická studie u pacientů s pineální cystou a následnou pinealektomií. Práce dále obsahuje podrobný popis techniky i.c.v. aplikace, kanylace cév a telemetrického měření funkčních parametrů krevního oběhu u potkana. Přílohou práce jsou 4 impaktované publikace obsahující zvolenou tematiku.

Klíčová slova:

pinealektomie, intracerebroventrikulární (i.c.v.) aplikace, kanylace, chirurgie, melatonin, potkan, myš, morče, králík, prase, pes

Abstract:

Clinical surgical techniques of pinealectomy and intracerebroventricular (i.c.v.) cannulation are still used in the clinic in indicated cases. In research, there is an effort to replace these classical surgical techniques by other means. However, these various new models often do not reflect the complexity of the functions taking place in the living organism as a whole. The thesis shows that these surgical techniques should be also a part of biomedical research in the future, as they still bring new important information. In the experiment, the pinealectomy can serve as a model of resection or depletion (removal of natural hormone secretion), while i.c.v. application of the active substance to the ventricles on the contrary as a model of addition or substitution.

The practical part of the thesis is divided into 4 areas: A) pinealectomy – an animal models, B) pinealectomy - in the experiment, C) pinealectomy - in the clinical practice and D) intracerebroventricular application - in the experiment. The work describes in detail the surgical techniques and discuss possible consequences of pinealectomy in 6 animal species (and their comparison) and in humans. It also includes an experiment with pinealectomy in a rat and a clinical study in patients with pineal cyst and subsequent pinealectomy. The work also contains a detailed description of the i.c.v. application, cannulation of vessels and telemetric measurement of functional parameters of blood circulation in the rat. The appendix contains 4 impacted publications containing the selected topic.

Keywords:

pinealectomy, intracerebroventricular (i.c.v.) application, cannulation, melatonin, rat, mouse, guinea pig, rabbit, pig, dog

Poděkování

Prvnímu školiteli této disertační práce **Prof. MUDr. Vladimíru Benešovi, DrSc.** děkuji za možnost osobně se podílet na klinickém výzkumu, komunikovat s vybranými pacienty a také se zúčastnit některých chirurgických zákroků prováděných na neurochirurgii v ÚVN. Děkuji mu také za odborné i životní rady a zkušenosti.

Školitel **Doc. MUDr. Michal Tichý, CSc.** se mě laskavě ujal a přijal mě pod svá odborná křídla. Děkuji mu za vstřícnost, pomoc a cenné odborné rady a připomínky k obhajovanému tématu disertační práce.

Chci poděkovat **MUDr. Josefu Zichovi, DrSc.** a **RNDr. Ivaně Vaněčkové, DSc.**, za nezanedbatelnou dlouholetou podporu, trpělivost a pomoc a při vzniku a zpracování této disertační práce.

Děkuji kolektivu v laboratoři Endokrinologického ústavu, klinické laboratoři ÚVN a oddělení Biologických rytmů AV ČR, v.v.i. za podporu a neocenitelnou pomoc při stanovování biochemických parametrů.

Děkuji **Prof. MUDr. RNDr. Luboslavu Stárkovi, DrSc.** za vnuknutí myšlenky dalšího studia tohoto oboru.

Poděkování patří mé rodině a dlouholetému příteli **RNDr. Karlu Hanušovi, CSc.**, který mě po celou dobu studia podporoval.

Ráda bych vyjádřila hlubokou pokoru ke všem lidským i zvířecím obětem, které byly položeny na oltář vědy.

Obsah:

Seznam použitých zkratk	10
Teoretická část	12
Glandula pinealis	12
Anatomie	12
Ontogeneze, fylogeneze	13
Fyziologie	13
Melatonin	14
Patologie	15
Neurochirurgický výkon	16
Patofyziologie	17
Pinealektomie v experimentu	18
Chirurgická technika v literatuře	18
Význam animálního modelu pinealektomie	19
Intracerebroventrikulární aplikace	20
Komorový systém mozku	20
Chirurgické techniky	21
Význam animálního modelu i.c.v. aplikace	21
Experimentální část	22
Cíle, hypotézy závěry	22
Experimenty	25
A Pinealektomie - animální modely	25
Králík	
Potkan, Myš, Morče	
Ovce	
Prase	
Pes	
B Pinealektomie – v experimentu	46
C Pinealektomie – v klinické praxi	57
D I.c.v. aplikace – v experimentu	64
a) Intracerebroventrikulární aplikace	
b) Měření krevního tlaku a dalších parametrů oběhového systému	
ba) Nepřímé - Tonometrie	
bb) Přímé	
bba) Kanylace cév	
bbb) Telemetrie	
Souhrnný závěr	93
Seznam publikací	95
Seznam literatury	96

Seznam použitých zkratk:

b.w.	body weight
BP, TK	blood presure, krevní tlak
CNS	centrální nervová soustava
gl. pinealis	glandula pinealis
HR	heard rate (srdeční pulz)
i.c.v.	intracerebroventrikulární (do mozkové komory)
i.p.	intrapéritoneální (do peritoneální dutiny)
i.v.	intravenózní (do cévy)
MAP	mean arterial presure (střední arteriální tlak)
MR	magnetická rezonance
OGTT	orální glukózový toleranční test
p.o.	per os (per orální, do úst)
SCIT	supracerebelární-infratentoriální (přístup)

Poznání fyziologie a patofyziologie jednotlivých soustav dříve záviselo pouze na „přirozeně“ se vyskytujících anomáliích, z jejichž negativního vlivu na organismus se dalo usuzovat na reálný význam systému v plně funkčním stavu. S postupujícím poznáním a zlepšujícími se dovednostmi bylo možno tyto anomálie navodit cíleným zákrokem například biochemickým (blokace funkce...) či chirurgickým (excize, resekce...). Tyto uměle navozené anomálie s dalším postupem poznání nemusely způsobovat jen hypo- nebo afunkci, ale mohly naopak simulovat či aktivovat hyperfunkci (implantace např. podkožní pelety či osmotické pumpy ze kterých se uvolňuje aktivní látka...). Tento „křížový“ přístup umožňuje ještě hlubší vhled do jednotlivých oblastí výzkumu. Oba tyto přístupy mohou využívat chirurgické techniky. Proto i dnes (navzdory velkému rozvoji molekulárních a genetických znalostí a technik) má chirurgický model své stále opodstatnění zejména pro komplexitu důsledků, které nejlépe odrážejí klinickou chirurgickou praxi a vliv na organismus jako celek.

Sledovanými parametry jsou nejčastěji konkrétní fyziologické hodnoty a funkce (ať už jednotlivého systému nebo celého organismu) a případně i komplex projevů behaviorálních, které by nikdy neměly být opomenuty.

Chirurgické techniky popisované v této práci mohou v experimentu sloužit jako model resekce či deplece – pinealektomie (odstranění přirozené sekrece hormonu), nebo naopak jako model adice či substituce – i.c.v. aplikace účinné látky do mozkových komor.

Teoretická část

Všechny biologické procesy v organismu jsou u vyšších obratlovců řízeny trojným regulačním nadsystémem skládajícím se z hormonální, nervové a imunitní složky. Tyto tři systémy jsou zvláště u savců v CNS úzce spjaty a jejich funkce je vzájemně integrována. Úzkému vztahu mezi nervovou a humorální soustavou odpovídá i jejich topograficky blízké umístění a vzájemná propojenost nervovými trakty i specializovaným cévním spojením. S periferií nervovou a hormonální je tento centrálně umístěný systém spojen zejména vegetativním nervovým systémem a cévním řečištěm. Homeostáza systému je funkčně regulována bohatou škálou zpětných vazeb, které zajišťují neustálé jemné doladování funkce v odpovědi na vnitřní i vnější podněty působící na organismus. Homeostáza může být narušena různou patologií kterékoli složky, což může mít dalekosáhlé důsledky pro celý organismus.

Hlavní centrum těchto regulací je umístěno v diencefalu a přilehlých mozkových žlázách – hypofýze a epifýze, které jsou s talamickými jádry propojeny nervově i cévně. Tyto funkčně spjaté struktury můžeme nazývat hypothalamo-hypofyzární a epithalamo-pineální komplex. Funkce epithalamo-pineálního komplexu je modifikována signály ze zrakových, čichových, sluchových i hmatových exteroceptorů a nejrůznějších interoreceptorů. Epithalamo-pineální systém má významný vliv jak na mozkové funkce, tak i na neuroendokrinní osu. Mimoto pineální žláza podstatně ovlivňuje sekreci trofických adenohipofyzárních hormonů. (Reiter, 1973)

Glandula pinealis

Anatomie

Pineální žláza nebo šišinka (glandula pinealis, epiphysis cerebri, dříve též corpus pineale) nebo též epifýza* je malá mozková žláza přibližně kulovitěho tvaru (u člověka průměr 5 - 10 mm, u potkana 1 - 2 mm, u velkých zvířat několik centimetrů), výchlipka stropu mezimozku, součást epitalamu. Nachází se nad stropem třetí mozkové komory. Třetí komora se mezi commissura hamenularum a commissura posterior vyklenuje do corpus pineale (recessus pinealis). Žláza je připojena krátkou stopkou na commissura habenalarum, ale kaudálně zasahuje až mezi mesencefalické colliculi superiores. Pineální žláza leží na povrchu mozku, u člověka je ale překryta hemisférami. Tvoří ji nemyelinizovaná nervová vlákna, neuroglie a vlastní pinealocyty. Pineální žláza nemá hematoencefalickou bariéru (Mamourian and Towfighi, 1986). Na povrchu je kryta

*) nevhodné označení - duplicita obecného termínu s obecným pojmenováním koncových částí dlouhých kostí

tenkostěnným vazivovým pouzdrům (capsula). Je opředena sítí krevních kapilár. Cévní zásobení je z větví a. chorioidea posterior a z větví společných pro plexus chorioideus a gl. pinealis. Venózní krev odchází do v. thalamostriata a do hlubokého žilního systému. U člověka s přibývajícím věkem difúzně kalcifikuje a objevují se kulovitá tělíska tvořená hydroxyapatitem a uhličitanem vápenatým, zvaná mozkový písek (acervulus cerebri). (Borovanský et al., 1973), (Erlich and Apuzzo, 1985).

Ontogeneze, fylogeneze

V ontogenezi člověka se gl. pinealis vyvíjí v druhém měsíci gravidity z tkáně diencefala, ze které vzniká i sítnice v oku a zrakové nervy. U nižších obratlovců se tkáň pineální žlázy funkčně podobá sítnici a u mnoha druhů (např. u kruhoustých, u některých žab a ještěrek) funguje dokonce jako fotosenzorický orgán – tzv. temenní oko (Concha and Wilson, 2001). V pineální žláze žab byly nalezeny fotosenzitivní buňky podobné čípkům v sítnici (Kitay and Altschule, 1954). Vývojově nejvýše postavený obratlovec s rudimentárním temenním okem je novozélandská ještěrka haterie (*Sphenodon punctatus*) (Tosini et al., 2001) a také *Sphenodon guntheri* z ostrůvků Cookovy úžiny. Je zajímavé, že haterie má kromě tohoto parietálního temenního oka také normálně vyvinutou gl. pinealis. Čihák (Čihák, 2004) se domnívá, že gl. pinealis vyšších obratlovců vznikla pravděpodobně splynutím obou struktur.

Fyziologie

V roce 1898 popsal německý pediatr Otto Heubner u chlapce s nádorem gl. pinealis předčasnou pubertu LeBaron, 1972 (Kitay, 1954), za tehdejších znalostí nebylo možno příčinnou souvislost obou nálezů kauzálně objasnit. V době objevu melatoninu – koncem 50. let 20. stol. – nebyl endokrinní význam funkce šišinky plně známý (Illnerova and Vanecek, 1985). Tato situace, vzhledem ke komplexnímu působení melatoninu na celý organizmus, trvá vlastně dodnes. Zprvu byl melatonin nazván „spánkový hormon“, protože se soudilo, že u živočichů i člověka ovládá pouze nástup nočního nebo denního spánku. V průběhu 2. pol. 20. stol. však bylo zjištěno, že tento hormon ovládá nejen periodické děje organizmu, ale že se podílí i na regulaci dalších neperiodických funkcí, jako je osifikace, ukládání tuku (Hervieu, 2003) ovlivňuje též psychiku (Strunecká and Patočka, 2005) a kognitivní schopnosti. S gonadotropními hormony hypofýzy se společně podílí na iniciaci dospívání a na fertilitě. Působí také jako antioxidant. (Nishida, 2005) Chrání endotelové buňky před účinkem hypoxie (Matejovska et al., 2008). Má imunomodulační

účinky a zpomaluje stárnutí (Carrillo-Vico et al., 2004). Podle ojedinělých prací má vliv i na bioelektrickou aktivitu mozku (prokonvulzivní ale i antikonvulzivní účinek) (Kittnar et al., 2020). V některých studiích bylo zkoumáno jeho možné použití při léčbě poruch metabolismu lipidového a zejména cholesterolového a sacharidového (Andersson and Sandler, 2001), (Klepac et al., 2006), (Nishida, 2005), (Sudnikovich et al., 2007), (Yavuz et al., 2003). Byl studován vliv melatoninu na příjem potravy v korelaci například s C-peptidem (Starka et al., 2008). Melatonin je také schopen ovlivňovat krevní tlak (Paulis and Simko, 2007; Simko et al., 2013), (Simko et al., 2013).

Melatonin

Melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamin tedy N-[2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl]acetamid, sumární vzorec $C_{13}H_{16}N_2O_2$, molární hmotnost 232.278 g/mol) je hlavní hormon pineální žlázy. Po dlouhou dobu se soudilo, že jediný. Vedle melatoninu a jeho prekurzoru serotoninu byly v pineální žláze nalezeny i další neurotransmitery a biologicky aktivní látky - dopamin, noradrenalin, kyselina glutamová, kyselina γ -aminomáselná, různé jiné neuropeptidy i alkaloidy (Ebadi et al., 1993). Nověji bylo zjištěno, že kromě melatoninu vytváří gl. pinealis ještě další peptid - epithalamin, který má - stejně jako syntetický tetrapeptid Epithalon - podobný účinek na cílové tkáně jako melatonin (Anisimov, 2003), (Khavinson et al., 2001a), (Khavinson et al., 2001b). Melatonin izoloval v roce 1958 A. Lerner z hovězích epifýz. Melatonin je vysoce rozpustný ve vodě i v tucích, v krvi je 70% vázáno na albumin. Cirkulující melatonin se dostává ke všem tělesným tkáním, protože přestupuje hemato-encefalickou bariérou. (Šonka and Nevšímalová, 2008) Plazmatické hladiny melatoninu mají velkou interindividuální, ale velmi nízkou intraindividuální variabilitu (Strunecká and Patočka, 2005). Vysoká noční hladina melatoninu v krvi se pohybuje řádově v koncentraci 10-10 mol/l (Illnerova et al., 2000). Melatonin působí zejména na dva (MT1 a MT2) ze tří známých receptorů přes G-proteiny (Kittnar et al., 2020). Tyto receptory byly u savců nalezeny přímo v biologických hodinách v suprachiasmatických jádrech, kde navázaný melatonin zpětnovazebně ovlivňuje chod biologických hodin, dále v části hypofýzy (pars tuberalis), kde melatonin moduluje roční cykly například v reprodukční aktivitě, a sporadicky též v různých částech mozku v závislosti na živočišném druhu (Vanecek et al., 1987), (Sumova et al., 1995b), (Sumova et al., 1995a). Mimo mozek byly u savců tyto receptory nalezeny i v oční sítnici, kde se melatonin též tvoří, a dále v cévách, slezině a v ledvinách (Illnerova et al., 2000). Nově byly melatoninové receptory zjištěny také v játrech (Venegas et al., 2013).

U všech živých organismů se melatonin tvoří výhradně v noci. Vysoká tvorba melatoninu je tedy biochemickým signálem noci jedince jak u živočichů s biologickou aktivitou denní (kopynatci, člověk), tak i noční (malí hlodavci, netopýři) (Sumova et al., 2003). Melatoninový signál (jeho vysoká hladina v tělních tekutinách v noci) nepřenáší pouze informaci o denní době, ale též o délce dne, tedy o roční sezóně (Sumova et al., 1995a). U všech dosud studovaných savců se melatonin tvoří po krátkou dobu v průběhu krátkých letních nocí, ale po dlouhou dobu během dlouhých zimních nocí (Sumova et al., 1995a). Denní rytmus syntézy melatoninu je závislý na rytmické aktivitě enzymu arylalkylamin N-acetyltransferázy, která katalyzuje acetylaci serotoninu na N-acetylserotonin, prekursor melatoninu. Aktivita tohoto enzymu v epifyzárních pinealocytech potkana je v noci více než stonásobná, než je tomu ve dne. Tento robustní rytmus je řízen biologickými hodinami, které se nacházejí v mozku v nucleus suprachiasmaticus. (Sumova et al., 1995a) Signál pro syntézu melatoninu, který vychází z biologických hodin, jde po nervových drahách k pinealocytům. Dráha nevede přímo, nýbrž nejprve do paraventriculárních hypotalamických jader, odtud descendentně do krční míchy, kde jsou synapse s buňkami sympatického ganglion cervicale superius. Teprve neurony z tohoto ganglia projikují do glandula pinealis a působí na její buňky noradrenalinovými synapsami. (Šonka and Nevšimalová, 2008) Z nervových zakončení se uvolní noradrenalin, který působící na $\beta 1$ adrenergní receptory pinealocytů. V pinealocytech dojde k aktivaci adenylcyklázy, zvýšení koncentrace cAMP a následně k syntéze serotonin-N-acetyltransferázy. Zároveň je indukována transkripce supresorů, které produkci melatoninu ukončují. (Šonka and Nevšimalová, 2008) Pyridoxin je koenzymem při dekarboxylaci tryptofanu a může u dětí tvorbu melatoninu stimulovat (Šonka and Nevšimalová, 2008). Světlo inhibuje syntézu melatoninu, noradrenalinu a acetylcholinu, zatímco syntézu serotoninu, kortisolu, dopaminu, kyseliny γ -aminomáselné a některých neuropeptidů stimuluje. (Ebadi et al., 1993)

Patologie

Patologické stavy této žlázy u člověka jsou v zásadě trojího typu – postupná a zejména stařecká kalcifikace a cystické a tumorové změny (nejčastěji pinealocytom).

Mimo kalcifikací mohou být tyto expanzivní patologické stavy (v nejzávažnějších případech ohrožující pacientův život – útlak Sylviova kanálku, vývoj hydrocefalu či tlakové ischemické degradace vlastní tkáně mozku) důvodem pro neurochirurgickou intervenci. Dalším méně častým a zpravidla méně závažným typem patologie je apoplexie.

Neurochirurgický výkon

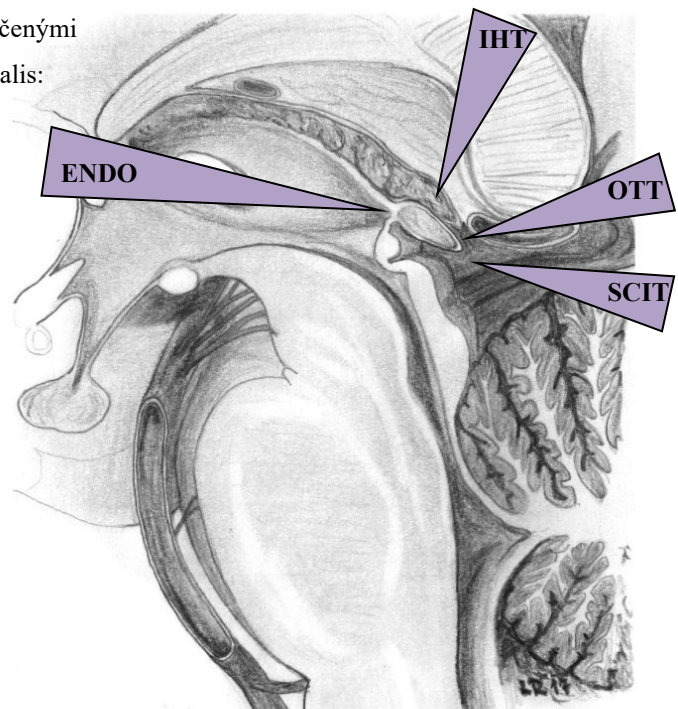
V posledních desetiletích je stále častěji diagnostikován expanzivní proces pineální žlázy. To může být dáno zlepšením citlivosti zobrazovacích technik, ale nelze vyloučit ani reálně stoupající výskyt v populaci z příčin, které neznáme. Za cystu v pineální oblasti je obecně v klinice považována velikost alespoň 5 mm v průměru (Mamourian and Towfighi, 1986), (Sawamura et al., 1995). Prevalence se uvádí kolem 1 až 4 % (Májovský et al., 2019), (Petitcolin et al., 2002), (Mamourian and Towfighi, 1986). Započteme-li nálezy cysty větší než 2 mm z MR studií, blíží se prevalence až k 31% (Nolte et al., 2010), ve studiích autoptických 21 -25% (Hasegawa et al., 1987), (Tapp and Huxley, 1972). Zdá se, že se incidence pineální cysty se posunuje k stále mladšímu věku. Označení expanzivní proces zahrnuje jak tumor, tak cystu nebo přechodný typ. Příznaky expanzivního procesu nejsou často specifické. Objevují se poruchy spánku, kognitivní obtíže, výjimečně i hydrocefalus, subjektivně pak bolesti hlavy, nauzea a závratě. Nejčastěji je však proces asymptomatický a nález je náhodný při CT nebo MR vyšetření. Přítomnost či nepřítomnost symptomů nezávisí na druhu expanzivního procesu (Taraszewska et al., 2008).

Neurochirurgická intervence může být dvojího charakteru – stereotaktická punkce nebo radikální resekce. Tumory jsou zpravidla indikovány k radikálnímu neurochirurgickému zákroku někdy i v kombinaci s radioterapií, cysty jsou předmětem stálé diskuse o volbě nejvhodnějšího terapeutického postupu. Punkce a odsátí obsahu cysty ovšem nese riziko možnosti opětovného naplnění cysty a nutnosti dalšího neurochirurgického zákroku. Radikální chirurgická resekce části, případně celé patologicky změněné žlázy, přináší naději, že pacienta jednou provždy zbavíme obtíží, ale zároveň znamená ztrátu přirozené produkce melatoninu, která je ve většině případů předoperačně stále zachována (alespoň reziduálně). U asymptomatických cyst je na druhé straně nejčastější volbou pouze dlouhodobá observace.

Užívané chirurgické přístupy k pineální žláze jsou schematicky naznačeny na následujícím Obrázku 1. V našem případě jsme se přiklonili k supracerebelárnímu-infratentoriálnímu (SCIT) přístupu jak v klinické praxi, tak u animálního modelu.

Obrázek 1

Sagitální řez mozkem se schematicky naznačenými možnými chirurgickými přístupy ke gl. pinealis: transventrikulární endoskopický (ENDO) interhemisferický-transakózní (IHT) okcipitální-transtentoriální (OTT); supracerebelární-infratentoriální (SCIT)



obr. dle Sobottův Atlas anatomie člověka
díl 1.; str: 302

Putz R. and Pabst R.

Grada 22. vydání; 2007

– překresleno a upraveno

V klinické praxi se i po úplné resekci pacient ponechává bez jakékoli následné melatoninové substituce. Toto náhlé a trvalé odejmutí hormonálního synchronizátoru může potenciálně mít v dlouhodobém horizontu pro pacienty i závažné důsledky, avšak v české klinické praxi se pacienti po pinealektomii již nijak specificky prospektivně nesledují.

Patofyziologie

Jedním z nejvýznamnějších centrálních synchronizátorů je melatoninový signál z gl. pinealis, která je součástí neuroendokrinního systému, ten ale prostřednictvím důsledků své funkce široce přesahuje.

V klinickém výzkumu u člověka jsou zprávy o významu gl. pinealis zejména v souvislosti s funkcemi spánku (insomnie i somnolence, fáze spánku) (Richardson, 2005) a výši příjmu potravy a obezitou (Hervieu, 2003). Uváděny jsou i možné souvislosti s konvulzivními poruchami (Munoz-Hoyos et al., 1998) i s poruchami psychiatrickými (schizofrenie, deprese) (Brown, 1992). Literatura popisuje též ovlivnění hypotalamo-hypofyzárního systému (Hazlerigg, 2001), stresové osy (Wetterberg, 1983), štítné žlázy (Karbownik and Lewinski, 2003) a imunitního systému (Plytycz and Seljelid, 1997). Popsán byl též vliv na gonády a jejich funkce (Olcese, 1995) i na metabolismus vápníku (osteoporóza, skolióza u lidí) (Day et al., 2007) a stárnutí (Cardinali et al., 2008). Více viz Experimentální část C.

Pinealektomie v experimentu

Chirurgická technika v literatuře

V animálním modelu pocházejí první zmínky o technice pinealektomie u potkana pravděpodobně z roku 1947 Borell. Tato práce je dnes však bohužel v originále prakticky nedosažitelná a zmínky o ní jsou až novější práce (Hsieh and Minoru, 1969) (někdy nesprávně citovaných jako Hsieh and Ota 1969). Mezi těmito roky popisují techniku pinealektomie i Kitay a Altschule (Kitay and Altschule, 1954). Tato výše zmíněná technika je s drobnějšími modifikacemi (Hoffman and Reiter, 1965) používána dodnes. Na rozdíl od člověka není u potkana tato operace - extirpace pineální žlázy - chirurgicky tak obtížná. Gl. pinealis leží u potkana blízko k povrchu mozku za mozkovými hemisférami a před mozečkem. Situaci však komplikuje anatomicky těsné uložení pod venózními splavy (sinus sagitalis superior a párový sinus transversalis), které v podstatě kopírují průběh lambdoidního a sagitálního švu. Operační přístup je z okénkové trepanace lebky v okcipitální krajině. Starší postupy provádějí asymetrickou trepanaci pouze v oblasti jedné os parietale a to častěji pravé (na pravou ruku chirurga) (Hsieh and Minoru, 1969), (Waynforth and Flecknell, 1992). Nám se více osvědčil symetrický mediální přístup zasahující obě ossa parietalia a os occipitale s provedením okénkové trepanace cca 5 x 7 mm. U starších zvířat hrozí při přerušení sagitálního splavu velké krvácení, proto je nutné naložit před přerušením splavu na sagitální splav dvojpodvaz (Maganhin et al., 2009) a/nebo na jeden (pravý) transverzální při jeho přerušování. Po otevření dury se gl. pinealis uchopí za stopku a vyjme. Přerušená větev sagitálního splavu se vrátí do přirozené pozice. Lokálně aplikujeme antibiotikum a odstraněnou kost umístíme na původní místo. Okraje kožní rány adaptujeme a chirurgicky scelíme suturou. S výhodou využíváme inhalační regulovatelnou anestezii izofluoranem, alternativou je ketamin-xylazinová i.p. anestezie. Při nekomplikovaném průběhu trvá operace cca 30 – 45 minut.

Ve starších publikacích se uvádí, že u mladších zvířat postačí menší trepanace a pouze řez durou, který je paralelní s průběhem splavu. Splavy se v tomto případě nepodvazují. Vzniklý otvor se roztáhne oční pinzetou a druhou pinzetou se epifýza uchopí za stopku a vyjme jako v předchozím případě (Hoffman and Reiter, 1965). Drobná ranka krvácí minimálně. Zvíře po probuzení nejeví známky bolesti ani alteraci chování. Zotavení po operaci probíhá zpravidla rychle a bez komplikací.

Význam animálního modelu pinealektomie

Při výzkumu důsledků pinealektomie na zvířeti je nejčastěji využíván jako modelový organizmus potkan např. (Canpolat et al., 2001), (Mizrak et al., 2004), dále také myš (Bulian and Pierpaoli, 2000) a králík (Sobajima et al., 2003). Morče (Dyer et al., 1974) a křeček (Banerji et al., 1980) jsou v současnosti i obecně mnohem méně využívané modely. Výzkum na animálních modelech se někdy neomezuje jen na laboratorní hlodavce, ale objevují se i modely méně časté například ovce (Dempsey et al., 1982), (Malpoux et al., 2002) i opice (Wehr, 2001). Kromě savčích modelů se využívají i modely ptačí: kuře (Lafortune et al., 2007), holub (Vakkuri et al., 1985a), (Vakkuri et al., 1985b), špaček a vrabec (Janik et al., 1992), výjimečně i plazi (Mendonca et al., 1996a), (Mendonca et al., 1996b), (Underwood, 1985) častěji obojživelníci (Bagnara and Hadley, 1970), (Jamieson and Roberts, 2000) a též ryby (Nayak and Singh, 1987). Nebyly nalezeny práce s prasaty, psy, a kočkami.

Výzkum mozkových inkretorních žláz, jejich fyziologie a patologie se u laboratorních potkanů začal rozvíjet zejména v 50. (hypofýza) a v 60. a hlavně v 70. letech (gl. pinealis). V 60. letech se totiž výzkum funkce epifyzy prakticky zastavil. Nový směr výzkumu dalo až objevení funkce melatoninu a průkaz jeho biosyntézy v závislosti na světelném režimu (Reiter, 1973).

V animálním modelu (nejčastěji u potkana) se používá pinealektomie (odstranění gl. pinealis) k výzkumu v mnoha oblastech. Hlavní hormon produkovaný pineální žlázou - melatonin - neovládá pouze cirkadiální periodické děje (např. spánek), ale má důležitý vztah k řadě dalších významných biologických pochodů v organizmu. Je evidentní, že její odstranění musí podstatně ovlivnit homeostázu, což bylo během druhé poloviny 20. století mnohokrát potvrzeno. Následující přehled nemá být kompletní literární rešerší, ale má pouze demonstrovat škálu možných patofyziologických důsledků dlouhodobé deplece melatoninu v biologickém systému.

Často byl studován vztah gl. pinealis k cirkadiálnímu rytmu (Asai et al., 2007) a také negativní vliv hypo- nebo a-funkce gl. pinealis na metabolismus vápníku (osteoporóza, skolióza) (Oyama et al., 2006), (Machida et al., 2005), (Machida et al., 1999), rozvoj obezity (Bartness and Wade, 1985), poruchy plodnosti (Prata Lima et al., 2004), (Soares, Jr. et al., 2003), (Liu et al., 2013). Dále byl také studován negativní vliv na imunitní funkce (Carrillo-Vico et al., 2004), (Guerrero and Reiter, 2002), (Molinero et al., 2000) případně rozvoj neuropatie (epilepsie, deprese) (Joshi et al., 1986) a poruchy kognitivních schopností (De et al., 2002). Nelze opominout práce sledující vliv na stárnutí kůže (Esrefoglu et al., 2005) a obecné antioxidantní účinky sekretů gl. pinealis (Reiter et al.,

1995). Objevují se i práce s melatoninem ovlivňující onkogenezi (Cos and Sanchez-Barcelo, 2000a), (Cos and Sanchez-Barcelo, 2000b).

I v současnosti je působení melatoninu studováno na animálních modelech. Popsána byla souvislost negativního vlivu jeho nedostatku na chování v behaviorálních testech i zhoršené výsledky v kognitivních úlohách (Tzoneva et al., 2021), (Tchekalarova et al., 2020). Nedostatek melatoninu působí také zhoršené hojení kostí a ran (Basaloglu et al., 2021), (Palin et al., 2018). Popsán byl i protizánětlivý vliv melatoninu (snížení oxidativního stresu, a snížení produkce prozánětlivých cytokinů) u modelu dny (Ballur et al., 2022). Nedostatek melatoninu také zhoršuje poškození žlučových cest a zhoršuje jaterní fibrózu u cholestatických potkanů (Chen et al., 2019). Publikován byl vliv pinealektomie na zvýšení termogeneze v hnědé tukové tkáni a snížení lipogeneze v bílém tuku i v játrech (Kim et al., 2020). Zkoumány byly také účinky melatoninu na normální funkce pokožky (růst vlasů, ochlupení i zbarvení) (Fischer et al., 2008a) stejně jako jeho působení na nádorové stavy kůže (melanoblastom, keratinoblastom, fibroadenom) (Fischer et al., 2008b) (Slominski et al., 2005).

Přes-to však dosud neexistuje soubor fyziologických a biochemických hodnot a způsob jejich systematického sledování u pinealektomovaných pacientů, který by detekoval a umožnil předcházet případným komplikacím, které po pinealektomii mohou vznikat a následně se rozvíjet. Proto je třeba hlouběji prostudovat fyziologické, biochemické i behaviorální změny na animálním modelu, což může mít zásadní význam i pro prevenci eventuálně včasný zásah proti nežádoucím následkům pinealektomie v humánní medicíně.

Intracerebroventrikulární aplikace

Komorový systém mozku

Intracerebroventrikulární (i.c.v.) systém je tvořen dvěma postranními komorami (ventriculus lateralis dexter et sinister), dále komorou třetí (ventriculus tertius) a čtvrtou (ventriculus quartus). Komora třetí a čtvrtá je spojena relativně tenkým Sylviovým kanálkem (ductus sylvii). Útlak nebo přerušení tohoto kanálku může způsobit rozvoj hydrocefalu. V blízkosti d. sylvii se nachází mimo jiných mozkových struktur též gl. pinealis, jejíž patologie mohou také způsobit hydrocefalické změny. V postranních komorách se v plexus chorioideus a ependymu tvoří mozkomíšní mok (liquor), který dále odtéká komorovým systémem. K resorpci mozkomíšního moku dochází arachnoidálními klky Pacchionských granulací (granulationes arachnoideae), jimiž liquor přestupuje do velkých nitrolebečnických venózních sinusů. (Borovanský et al., 1973) Základní morfoloická

stavba se u potkana a člověka v podstatě neliší. Hodinová produkce liquoru je u potkana 120 – 320 $\mu\text{l/h}$ (Huang et al., 2001).

CNS má tři typy bariér – hematoencefalickou, hematoliquorovou a liquorencefalickou. Hematoencefalická bariéra je nejtěsnější a chrání tak mozek před potenciálními škodlivinami pocházejícími z krve. Pro větší molekuly je v intaktním stavu bez specifického přenašeče prakticky nepropustná (např. bilirubin). Liquorencefalická bariéra je naopak nejvolnější a různé látky o molekulární velikosti bílkovin mohou difundovat oběma směry. Hematoliquorová je o něco volnější než hematoencefalická.

Chirurgické techniky

Vlastní komorový systém mozku je relativně velkým a snadno dosažitelným neurochirurgickým cílem. Nejčastěji prováděné zákroky v humánní medicíně jsou punkce či drenáže postranních komor, nejčastěji v důsledku rozvoje akutního nebo chronického hydrocefalu, méně často již k aplikaci farmak. V experimentální praxi je tomu naopak. Mnohem běžnější jsou zákroky aplikační než zákroky odběrové (liquor) či punkční. Aplikace do i.c.v. prostoru můžeme v zásadě rozdělit na akutní či chronické. Akutní aplikace se provádí nejčastěji formou stereotaktického návrtu lebky, nabodnutí komorové dutiny a aplikaci látky. Ve složitějším provedení se jedná o implantaci vodící kanyly a po zhojení následně zavádíme aplikační kanylu skrz tuto kanylu vodící a následnou aplikaci látky do mozku (možno i opakovaně). Chronická aplikace znamená kontinuální přívod látky do mozkové komory po dobu několika dnů nebo týdnů. Toho můžeme dosáhnout při spojení techniky kanylace i.c.v. prostoru s implantovanou osmotickou minipumpou. Do mozkové komory nebo do vlastní tkáně mozku může být též skrz pevnou vodící kanylu zasunuta mikrodialyzační sonda.

Význam animálního modelu i.c.v. aplikace

Intracerebroventrikulární (i.c.v.) prostor je pro svoje morfologické i fyziologické vlastnosti velmi často používán ve fyziologickém i behaviorálním výzkumu i v preklinickém testování potenciálních terapeutik, neboť umožňuje nejsnadnější průnik látek přímo do tkáně CNS. U nejčastěji využívaného animálního modelu – potkana, je i.c.v. prostor relativně snadno dosažitelný i bez většího poškození okolní mozkové tkáně, bezprostředně k němu přiléhá řada důležitých mozkových center (např. hipokampus). Jeho topologické rozložení je u potkana velmi blízké člověku, srovnatelné jsou i fyziologické charakteristiky. Proto má i.c.v. aplikace v experimentálních technikách velký význam.

Experimentální část:

Experimentální část práce tvoří zejména pokusy, ve kterých jsem sama prováděla chirurgické zákroky. Oddíl je rozdělen do 4 jednotlivých, postupně probíraných okruhů:

- A Pinealektomie – animální modely**
- B Pinealektomie – v experimentu**
- C Pinealektomie – v klinické praxi**
- D Intracerebroventrikulární (i.c.v.) aplikace – v experimentu**

Cíle, hypotézy závěry:

Celkový cíl:

Obhájit trvalý význam a používání chirurgických technik i v současném biomedicínském výzkumu, nejen v klinické praxi.

Celková hypotéza:

Chirurgické zákroky stále přinášejí nové a potřebné informace a zjištění v biomedicínském výzkumu, kterých by nebylo možno dosáhnout bez použití chirurgie.

Celkový závěr:

Podarilo se prokázat, že i v současné době má chirurgická technika své místo nejen v klinické praxi ale i ve výzkumu.

A Pinealektomie - animální modely

Cíl:

Porovnat použitelnost a vhodnost několika vybraných animálních modelů různých živočišných druhů pro pinealektomii:

a) – obtížnost provedení chirurgického zákroku pinealektomie

b) – vhodnost a použitelnost vybraných animálních modelů pro účely této studie

Hypotéza:

Potkan je nejvhodnějším animálním modelem pro výzkum důsledků pinealektomie pro účely této studie na našem pracovišti v porovnání s dalšími testovanými modely (myš, morče, králík, ovce, prase, pes).

Závěr:

Potvrdilo se, že i přes některé nevýhody je po zvážení všech daných kritérií potkan nejvhodnějším z testovaných animálních modelů pro studium důsledků pinealektomie pro účely této studie na našem pracovišti.

B Pinealektomie – v experimentu

Cíl:

Najít patofyziologické důsledky pinealektomie u dlouhodobě přežívajícího potkana. Konkrétně ověřit, zda provedení pinealektomie způsobí snížení hladiny melatoninu a případně ovlivní i jiné biochemické, fyziologické a behaviorální parametry.

Hypotéza:

Pinealektomie u operovaných zvířat způsobí snížení hladin cirkulujícího melatoninu v porovnání s kontrolní a sham operovanou skupinou a ovlivní i jiné fyziologické a případně i behaviorální parametry.

Závěr:

Po 36 týdnech od operace byly u pinealektomované skupiny v noční produkci melatoninu zjištěny nižší hladiny v porovnání s kontrolami. Hodnoty kortikosteronu se u sham operované skupiny lišily od kontrol. Jiné rozdíly mezi skupinami nebyly nalezeny.

C Pinealektomie – v klinické praxi

Cíl:

Zjistit, jaké jsou u pacientů s pineální cystou vybrané fyziologické parametry: melatoninový, kortizolový a glykemický cirkadiální profil. Ověřit jaké fyziologické změny nastávají po pinealektomii.

Hypotéza:

Pinealektomie způsobí snížení hladin melatoninu a ovlivní i další související fyziologické parametry.

Závěr:

Pinealektomie způsobila očekávané značné snížení produkce melatoninu. Reziduální nízké hodnoty po pinealektomii jsou pravděpodobně následkem extrapineální produkce. Denní glukózový profil se před a po operaci u jednotlivých pacientů nelišil. Kortizol byl po operaci zvýšený.

D Intracerebroventrikulární (i.c.v.) aplikace – v experimentu

Cíl:

Ověřit, zda intracerebroventrikulární aplikace látek je experimentální chirurgická technika vhodná pro výzkum centrálního vlivu aplikovaných látek.

Hypotéza:

Dlouhodobé či akutní i.c.v. podávání látky v experimentu způsobí chronické či akutní změny ve fyziologických i behaviorálních odpovědích na konkrétní testované podněty.

Závěr:

Z našich publikovaných prací vyplývá že, jak krátkodobá tak dlouhodobá i.c.v. aplikace testovaných látek je schopná akutně či chronicky ovlivnit v experimentu měřené fyziologické a behaviorální reakce a parametry.

Experimenty:

A Pinealektomie - animální modely

Cíl:

Porovnat použitelnost a vhodnost několika vybraných animálních modelů různých živočišných druhů pro pinealektomii:

a) – obtížnost provedení chirurgického zákroku pinealektomie

b) – vhodnost a použitelnost vybraných animálních modelů pro účely této studie

Hypotéza:

Potkan je nejvhodnějším animálním modelem pro výzkum důsledků pinealektomie pro účely této studie na našem pracovišti v porovnání s dalšími testovanými modely (myš, morče, králík, ovce, prase, pes).

Metodika:

Při studiu této problematiky jsem nejprve testovala chirurgickou obtížnost pinealektomie u různých animálních modelů. Provedla jsem pinealektomii jednotným supracerebelárním-infratentoriálním (SCIT) přístupem na kadáverech. Modelovými druhy byli: **myš, potkan, morče, králík, ovce, prase a pes**. Pinealektomii jsem provedla na několika zvířatech od každého druhu (postupy a provedení viz dále). Hodnotila jsem také celkovou vhodnost a použitelnost výše zmíněných animálních modelů pro účely této studie.

Následně jsem celkově zhodnotila náročnost chirurgického výkonu, fyziologickou podobnost modelu s cílovým organismem (člověkem) a možnost užití testovaného modelu k výzkumu. Stručný popis výhod a nevýhod jednotlivých modelů je shrnut dále v Tabulce 1 a v diskusi.

Chirurgické provedení pinealektomie u jednotlivých testovaných druhů zvířat:

Měla jsem k dispozici čerstvé kadávery všech hodnocených animálních modelů v dospělém věku (nikoli mláďata a nedospělé jedince). Provedla jsem pinealektomii u každého z testovaných modelů. Viz fotodokumentace níže (provedení u myši a morčete bez fotodokumentace).

Za poskytnutý studijní materiál děkuji Fyziologickému ústavu AV ČR, firmě Meditox v Konárovicích a jatkám v Českém brodě.

Králík

Postup pinealektomie u králíka:

Zkrácená fotodokumentace operačního postupu viz dále.

Nejprve provedeme vystříhání operačního pole a jeho povrchovou desinfekci. Takto připravené zvíře je možno zafixovat do stereotaktického rámu, ale velikost modelu umožňuje i postup bez fixace hlavy. Operační pole zarouškujeme. Provedeme řez kůží v přísně mediální linii (je-li řez proveden mediálně, rána prakticky nekrvácí). Pod uvolněné kožní vrstvy vložíme malý okénkový rozvěraček a vytvoříme tak dostatečný prostor pro další postup. Úpony aurikulárních svalů v cílové oblasti nepřekážejí, zůstávají kaudálněji a laterálně. Provedeme řez periostem, který následně z cílové oblasti trepanace odstraníme. U živého modelu případné krvácení z okrajů či z plochých kostí stavíme kauterizačně. Provedeme okénkovou trepanaci v cílové oblasti nejlépe malou okružní pilkou. Návrtky v rozích nejsou potřeba. Při trepanaci dbáme značně zvýšené pozornosti, abychom neporušili mozkovou tkáň. Před dalším postupem šetrně opláchneme kostěné piliny z operačního prostoru. Opatrně odklopíme trepanační „víčko“, abychom nešetrnou manipulací neporušili cévní systém tvrdé pleny mozkové, zejména centrální durální splav (sinus sagittalis superior). Po odhalení mozkových plen oblast kontinuálně svlažujeme sterilním fyziologickým roztokem, abychom zabránili nechtěnému vysychání struktur. Na sagitální splav (sinus sagittalis superior) založíme dva podvazy, tak aby mezi nimi bylo dostatek místa na přerušení venózního splavu. Za pomoci volné části těchto podvazů následně mozkové obaly otevřeme a volné konce podvazů lehce zajistíme k roušce. Mírnou manipulací s kaudálním podvazem odhalíme povrchově uloženou gl. pinealis, kterou následně opatrně odstraníme. U králíka a menších zvířat není zpravidla nutné na pineální stopku zakládat podvaz. V případě drobného viditelného krvácení z oblasti na místo vložíme malý sterilní kousek gelasponové pěny a místo opět překryjeme mozkovými plenami, které jak je to jen možné (u králíka a větších animálních modelů) sešíváme jednotlivými stehy a následně ještě celou spojovanou oblast překryjeme tenkým filmem z gelasponové pěny, která dopomůže k lepšímu uzavření prostorů s mozkomíšním mokem. Na vhodných místech lebky provedeme minimálně 3, ale lépe 4 návrtky skrz lebku. Na gelasponovou vrstvu navrátíme trepanační víčko s předem připravenými fixačními otvory, které odpovídají přilehlým provrtaným místům na lebce. Skrz tyto otvory provlékneme fixační návlek a trepanační víčko přivážeme k lebce. Následně je vhodné u přežívajícího modelu zatmelit kostní řezy buď kostním voskem, nebo histoakrylovým vteřinovým lepidlem na tkáň. Takto bezpečně uzavřený trepanační otvor je nezbytný k prevenci likvorey. Celou oblast ještě následně vydesinfikujeme peroxidem a zpětně překryjeme

kůži, kterou poté spojujeme v jedné vrstvě jednotlivými stehy (kůže u králíka, morčete, potkana a myši je relativně tenká). U zvířat volíme nejraději techniku sutury vytažené do tzv. Bauerova hřebenu (Němeček, 1953), zde se jednotlivé stehy zakládají o něco dále od řezné plochy proto, aby se zvětšila plocha kontaktu obou stran sutury, které mohou srůstat reparací. Při užití techniky šití kůže do hřebenu je však třeba pečlivě dbát na to, aby se vnější kožní části s chlupy nedostaly do kontaktu se spodními vrstvami kůže protilehlé strany. Nedbáme-li na dobrou adaptaci kožních okrajů rány, sutury špatně srůstají, infikují se a může docházet k dehiscenci. Jsou-li dobře zadaptované sutury ještě na povrchu preventivně překryty nějakou antiseptickou mastí (Septonex apod.) nebo jodkolodiem, velmi dobře a rychle srůstají. Výhodou Bauerova hřebenu také je, že není třeba šít „hustě“ (stehy v malých rozestupech), a tím se i zvětšuje relativně intaktní (stehovými kanálky nenarušená) plocha celé sutury.

Pokud při zákroku nedojde k poranění mozkové tkáně nebo k většímu krvácení, králík a menší animální modely tento zákrok zpravidla dobře snášejí a trvale přežívají.

Obrázek 2

MR mozku králíka s naznačenou polohou a přístupem ke gl. pinealis.

Směr přístupu k vlastní pineální žláze (červeně), umístění trepanačního otvoru (modře).

Původní zdroj obrázku, upraveno:

Müllhaupt D., Augsburg H., Schwarz A., Fischer G., Kircher P., Hatt J.M., Ohlerth S.

Magnetic resonance imaging anatomy of the rabbit brain at 3 T; Acta Veterinaria Scandinavica volume 57, Article number: 47 (2015)



Fotodokumentace provedení pinealektomie u kadáveru králíka

Obrázek 3a, b, c

Pohled z boku; pohled shora na hlavu králíka; označení operačního místa.



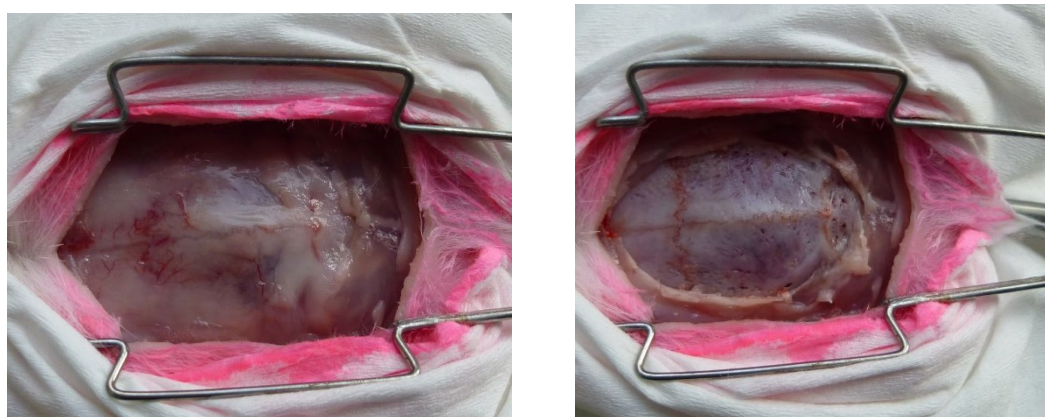
Obrázek 4a, b

Zarouškování operačního pole; provedení řezu kůže.



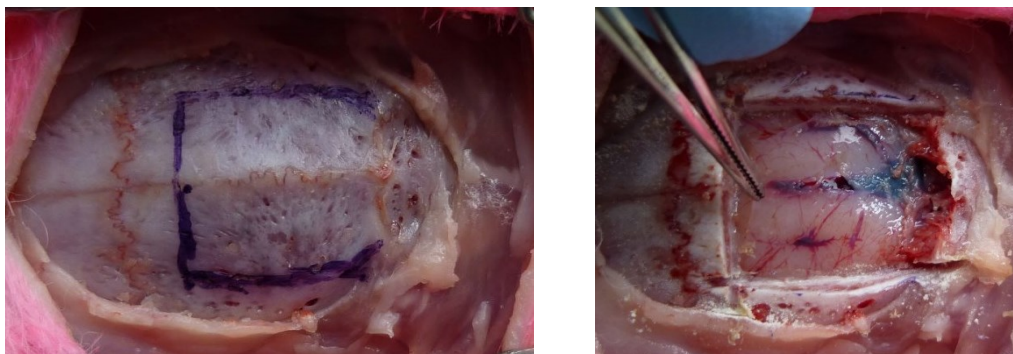
Obrázek 5a, b

Rozevření kůže rozvěračkem; odstranění periostu z oblasti trepanace.



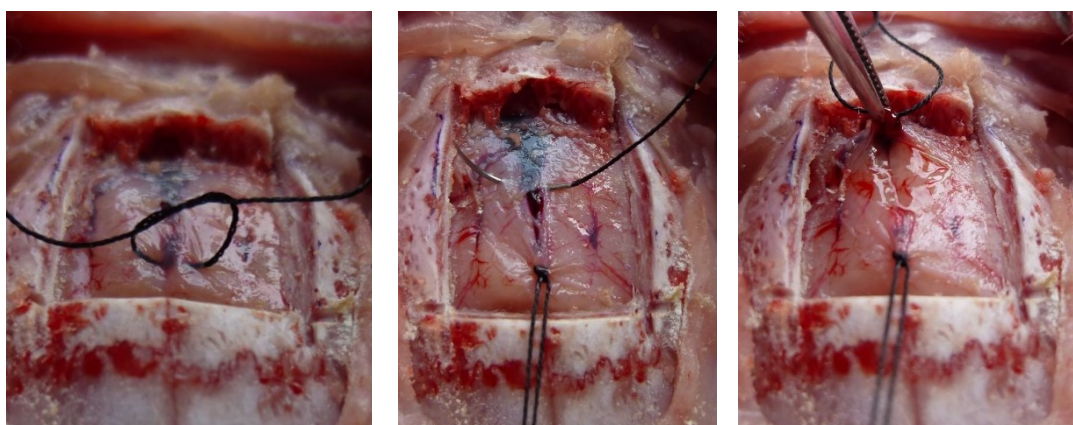
Obrázek 6a, b

Naznačení trepanačního otvoru; provedená trepanace a pohled na tvrdou plenu mozkovou.



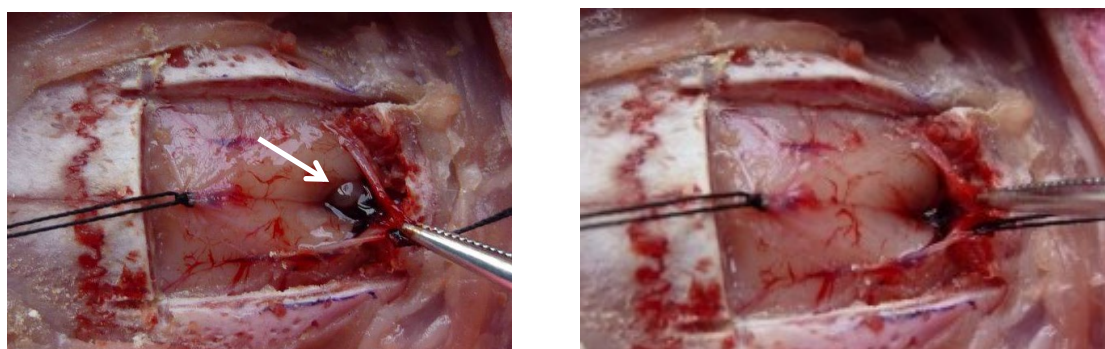
Obrázek 7a, b, c

Provedení podvazu venózního sagitálního splavu (sinus sagittalis superior) nejprve ve frontální; následně v okcipitální oblasti; následné přerušení splavu mezi těmito podvazy a otevření mozkových obalů (pohled na negyriřifikované mozkové hemisféry).



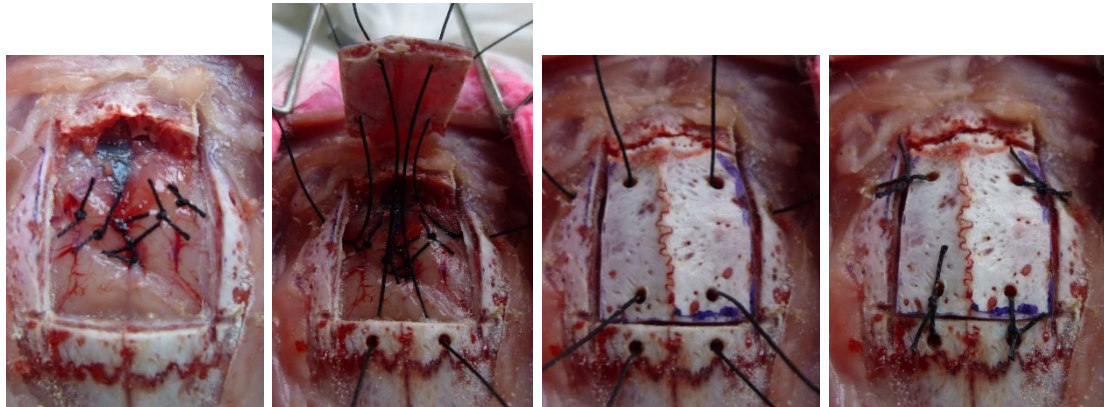
Obrázek 8a, b

Pohled na gl. pinealis (označena bílou šipkou); pohled do stejné oblasti po jejím odstranění.



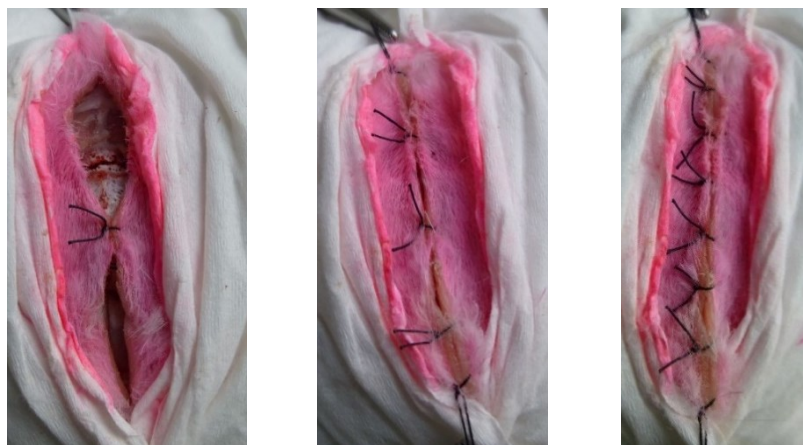
Obrázek 9a, b, c, d

Dura mater uzavřená jednotlivými stehy (provedeno atraumatickým jehlovým návlekm); dále postup uzavírání trepanačního otvoru s vytvořením návrtů v trepanačním víčku a jeho fixace stehy ke kalvě.



Obrázek 10a, b, c

Postup uzavírání operační rány jednoduchými stehy v 1 kožní vrstvě.



Obrázek 11a, b

Vyjmutá pineální žláza; celkový pohled na uzavřenou ránu po provedené pinealektomii.



Potkan, Myš, Morče

Postup pinealektomie u potkana, myši a morčete

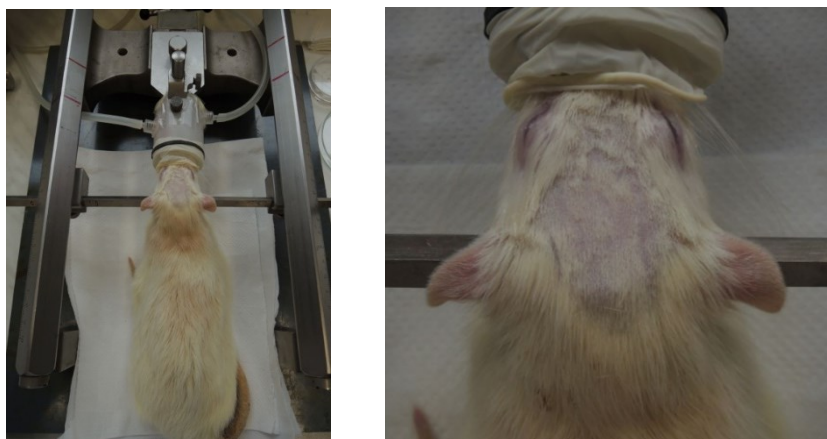
Zkrácená fotodokumentace operačního postupu viz dále.

Provedení pinealektomie se u těchto druhů nijak zásadně neliší. Rozdíl je zejména ve velikosti modelu a tedy jeho anatomických struktur. Celý postup je obdobný jako provedení tohoto zákroku u králíka. U těchto menších modelů však volíme s výhodou postup s upnutím hlavy ve stereotaktickém rámu. Popis stereotaxie viz oddíl D - i.c.v. aplikace. Dalším rozdílem je fixace trepanačního víčka po provedení pinealektomie, která nevyžaduje spojovací návrtky a kostní stehy, ale postačuje přilepení kostěného víčka na tenké vrstvě sterilního gelasponu histoakrylovým lepidlem.

Fotodokumentace provedení pinealektomie u dlouhodobě přežívajícího potkana

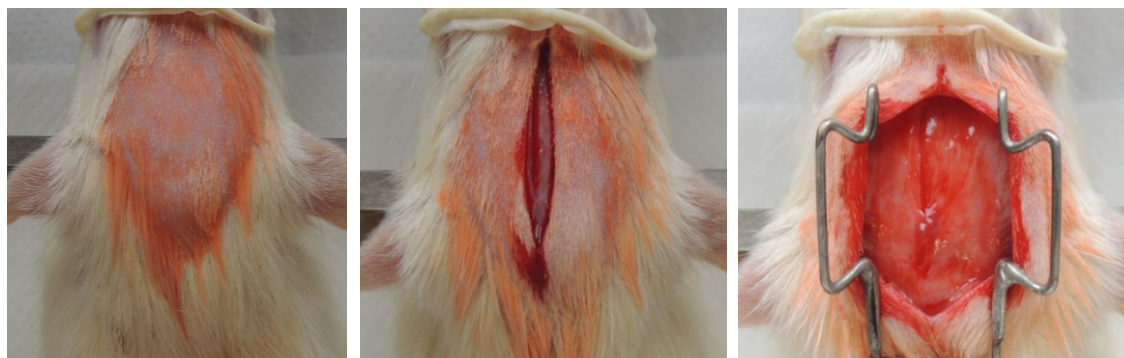
Obrázek 12a, b

Fixace hlavy potkana v inhalační anestezii do rámu stereotaktického aparátu; vystříhané operační pole a oči potřené oční mastí k prevenci osychání a mechanického poranění.



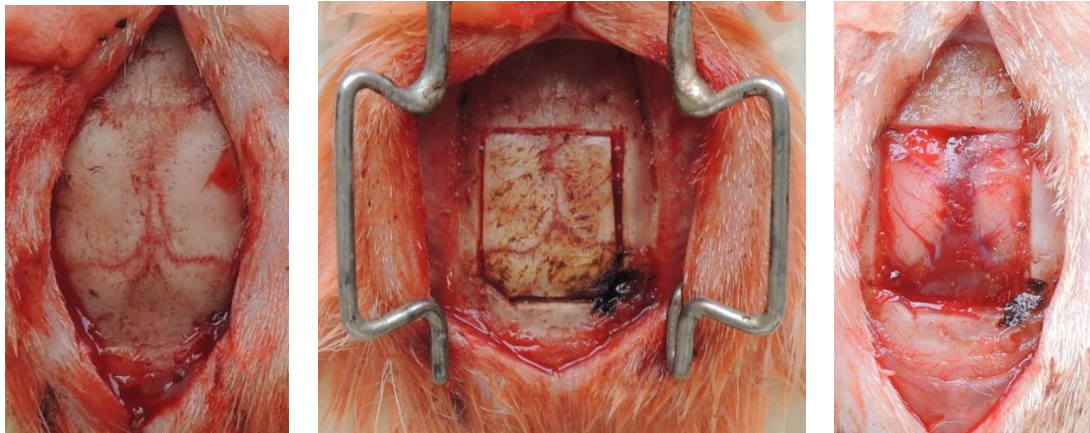
Obrázek 13a, b, c

Desinfekce operačního pole; provedení řezu kůže; umístění kožního rozvěráčku.



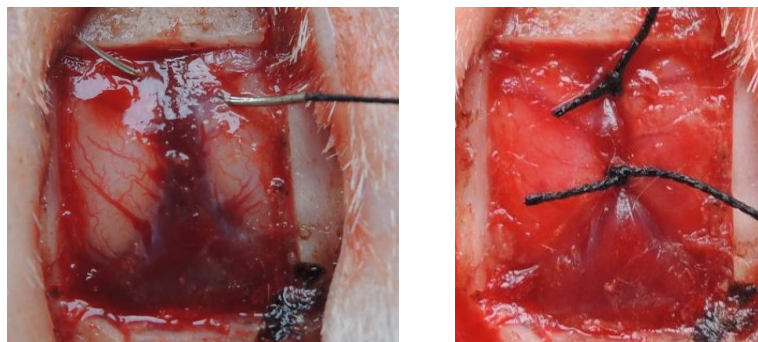
Obrázek 14a, b, c

Odstranění periostu; provedení trepanačních řezů; odstranění kostěného krytu nad cílovou oblastí a pohled na tvrdou plenu mozkovou.



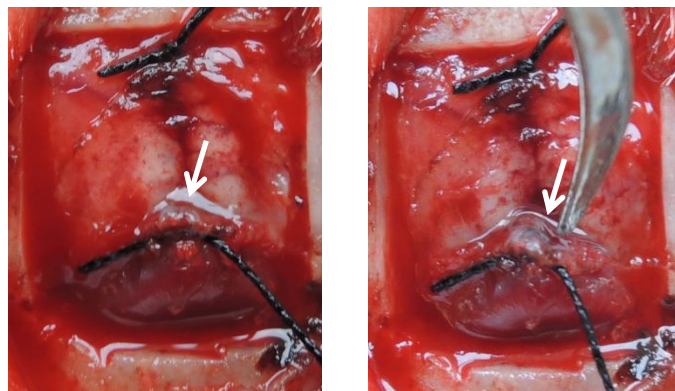
Obrázek 15a, b

Provedení podvazu sagitálního splavu (sinus sagittalis superior) nejprve ve frontální; a následně v okcipitální oblasti – pohled na oba zatažené podvazy.



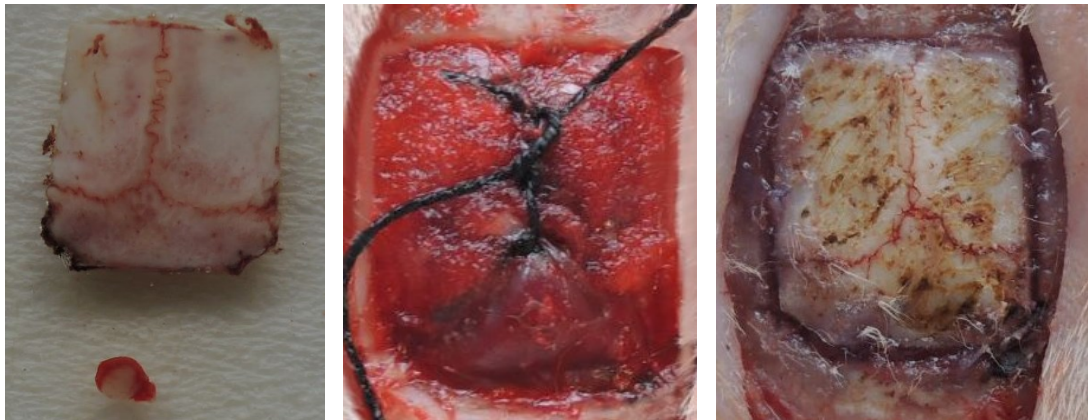
Obrázek 16a, b

Přerušení podvázaného šípového splavu (sinus sagittalis superior) a otevření mozkových obalů (pohled na negyriřikované mozkové hemisféry); pohled na povrchově uloženou pineální žlázu (označena bílou šipkou)



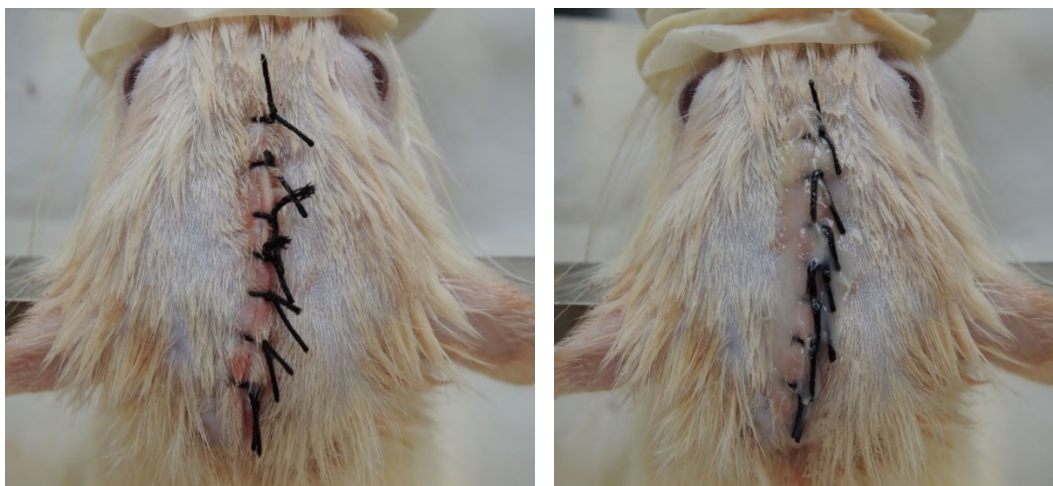
Obrázek 17a, b, c

Odstraněná pineální žláza v porovnání s trepanačním kostěným krytem; scelení tvrdé pleny mozkové spojením konců frontálního a okcipitálního podvazu sagitálního splavu přes tenkou gelasponovou vrstvu; navrácení kostěného trepanačního krytu a jeho fixace histoakrylovým lepidlem.



Obrázek 18a, b

Pohled na operační ránu uzavřenou jednoduchými stehy v 1 kožní vrstvě; překrytí sešité operační rány antiseptickou masťou k prevenci průniku patogenů.



Ovce

Postup pinealektomie u ovce:

Zkrácená fotodokumentace operačního postupu viz dále.

Po fixaci hlavy jsem provedla vystříhání operačního pole a jeho desinfekci a zarouškování, dále mediální řez kůží a fixaci volných kožních okrajů k roušce. Následuje odstranění periostu a provedení okénkové trepanace okružní pilkou. U fotodokumentovaného případu jsem provedla větší trepanační otvor (než je pro vlastní pinealektomii třeba) pro demonstraci rozsahu vyztužené pneumatizované lebky u ovcí a koz. Odhalená dura mater zvláště u kadáveru rychle osychá, proto jsem ji překryla vlhčenou netkanou textilií (u přežívajícího modelu bych ji nepoužila). Následující postup má několik alternativ. Zvolila jsem postup shodný s předchozími modely – tedy přerušení sagitálního splavu (sinus sagittalis superior). Po odstranění pineální žlázy s nutným podvazem její stopky jsem uzavřela jednotlivými stehy tvrdou plenu. Dělené trepanační víčko jsem zpětně přifixovala k lebce kostními stehy provedenými skrz předpřipravené návrtvy. Kostní řezy byly navíc u kadáveru fixovány histoakrylovým lepidlem. Rána byla zpětně překryta kůží, kterou jsem sešila jednotlivými stehy v jedné vrstvě.

Fotodokumentace provedení pinealektomie u kadáveru ovce

Obrázek 19a, b

Celkový pohled na hlavu ovce z boku; a zezadu s vystříhaným operačním polem.



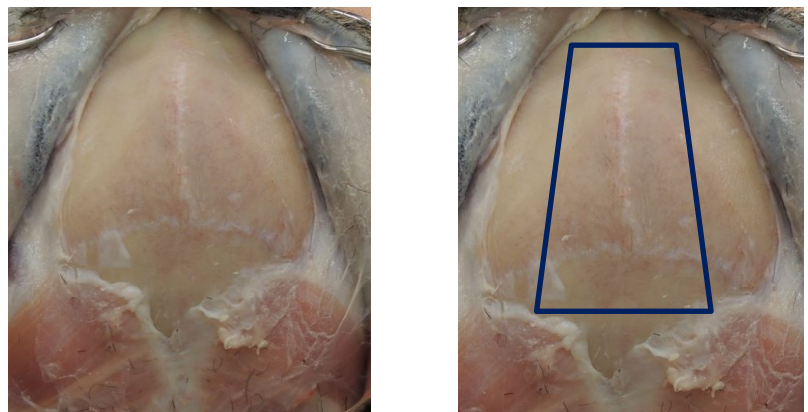
Obrázek 20a, b

Zarouškování operačního pole; řez kůží a pohled na lebku s periostem.



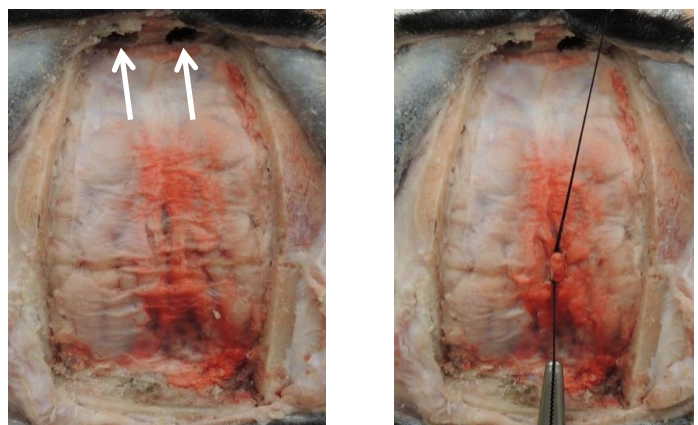
Obrázek 21a, b

Odstranění periostu; naznačení rozsahu trepanace.



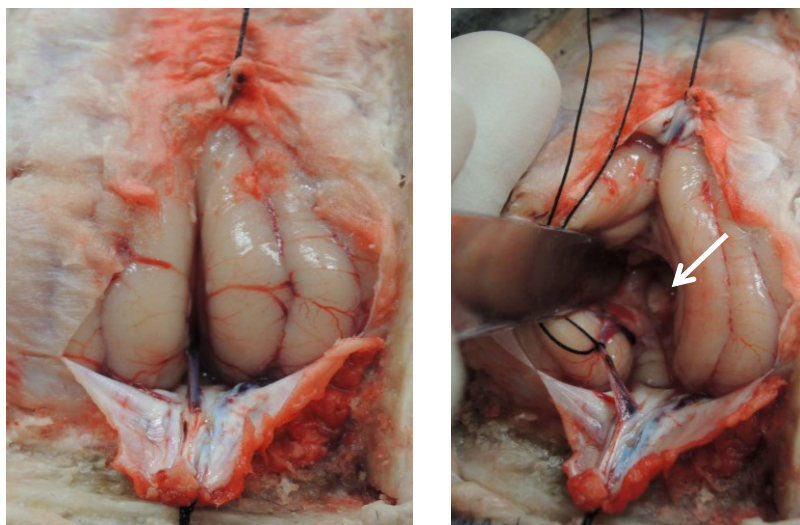
Obrázek 22a, b

Odstranění odtrepanované části lebky (bílé šipky naznačují pneumatizované prostory lebky), (tvrdá plena mozková pokryta vlhčenou netkanou textilií k zábraně osychání); dvojitý podvaz podvázání sagitálního splavu.



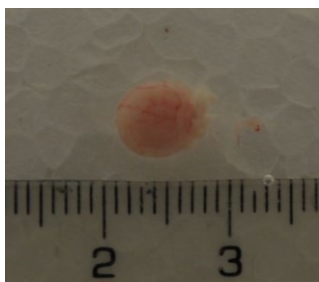
Obrázek 23a, b

Přerušení sagitálního splavu; pohled na mozkové hemisféry a pohled na gl. pinealis in situ v hloubce (označena bílou šipkou).



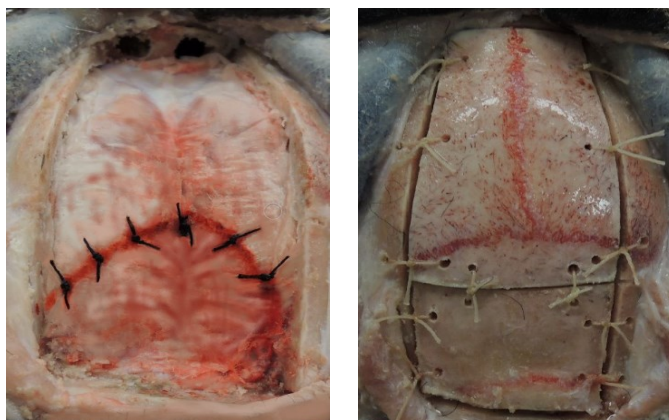
Obrázek 24

Vyjmutá gl. pinealis ovce.



Obrázek 25a, b

Uzavření tvrdé pleny mozkové jednoduchými stehy přes tenkou gelasponovou vrstvu; překrytí trepanačního otvoru původní kostní tkání a fixace k lebce (pomocí trepanačních fixačních návrťů a stehů).



Obrázek 26a, b

Uzavření operační rány jednotlivými stehy v 1 kožní vrstvě; celkový pohled.



Prase

Postup pinealektomie u prasete:

Zkrácená fotodokumentace operačního postupu viz dále.

Hlavu prasete jsem fixovala, naznačila umístění mediálního řezu a zarouškovala. Provedla jsem řez hluboko skrz silnou kůži a ztučnělé podkoží a mohutnou svalovinu dorsální strany krku až ke spinózním výběžkům cervikálních obratlů. Do rány jsem vložila svalový rozvěrák a ruční svalové háky. Provedla jsem trepanační návrtvy v rozích okénkové trepanace v os occipitale, které jsem následně propojila řezy. Další postup výkonu byl obdobný jako u ovce. Ránu jsem po pinealektomii uzavírala ve čtyřech až pěti vrstvách (2-3 svalové, 1 podkožní, 1 kožní).

Obrázek 27

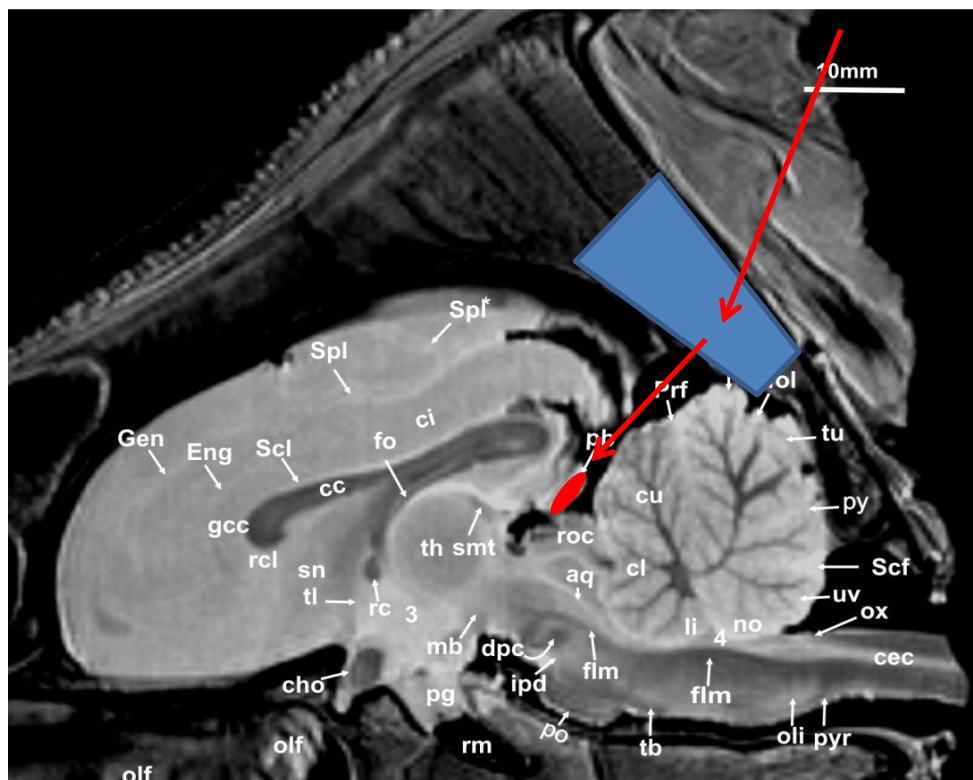
MR mozku prasete s naznačenou polohou a přístupem ke gl. pinealis.

Schematické znázornění operační cesty (červeně) a velikosti a mocnosti trepanačního otvoru v kosti týlní (modře).

Původní zdroj obrázku, upraveno:

Schmidt V.

Comparative anatomy of the pig brain - An integrative magnetic resonance imaging (MRI) study of the porcine brain with special emphasis on the external morphology of the cerebral cortex. VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen; Germany, 1. ed., 2015



Fotodokumentace provedení pinealektomie u kadáveru prasete

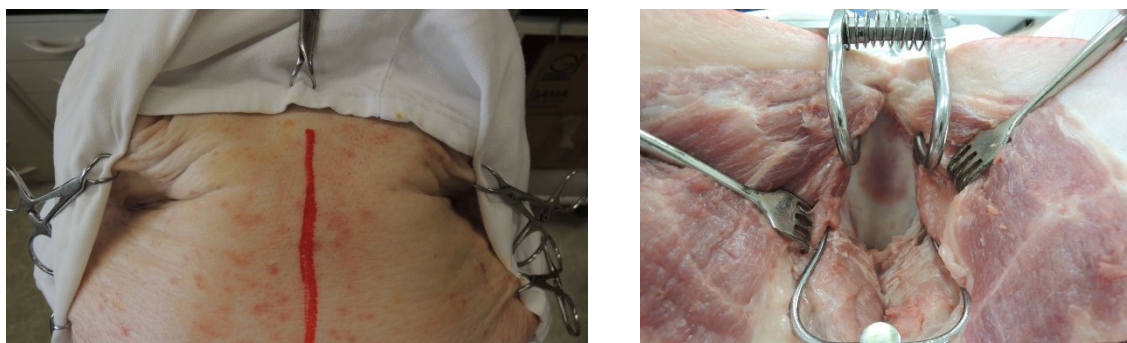
Obrázek 28a, b

Fixace hlavy prasete; zarouškování operačního pole.



Obrázek 29a, b

Naznačení operačního přístupu mediálním řezem; průnik kůží, podkožím a svalovinou ke kosti týlní – dobře patrná je mocnost tukové a svalové vrstvy.



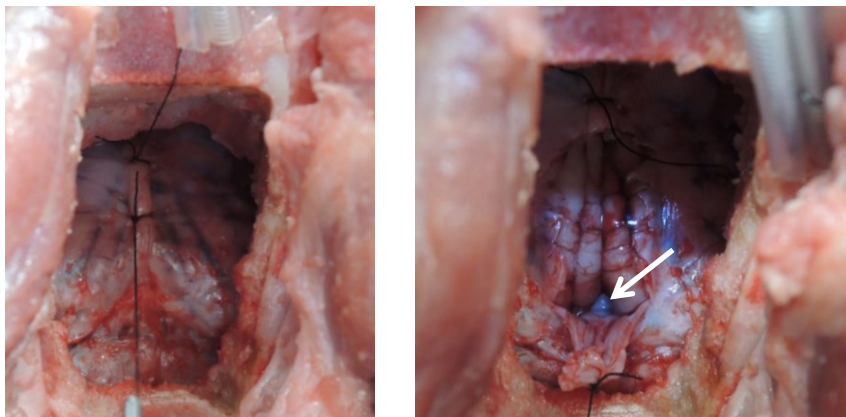
Obrázek 30a, b

Příprava k trepanaci lebky (návrty v rozích a jejich následné propojení řezy); pohled trepanačním otvorem na mozkové obaly a pod nimi se rýsující mozek.



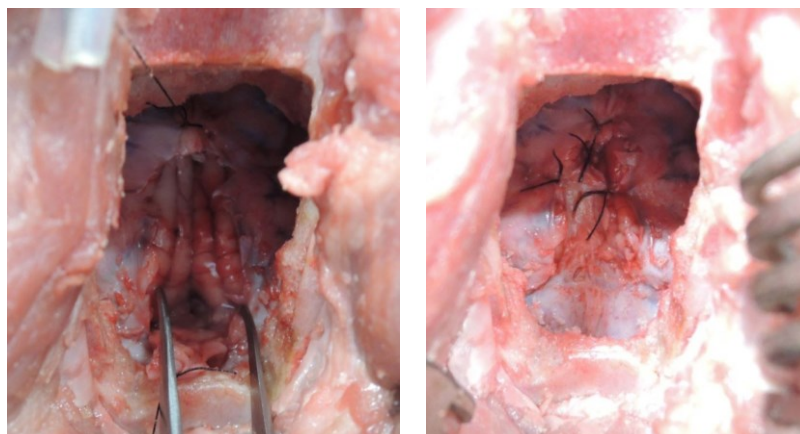
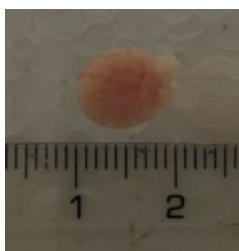
Obrázek 31a, b

Podchycení a podvázání sagitálního splavu a tvrdé pleny mozkové opichem atraumatickým jehlovým návlekm; otevření tvrdé pleny mozkové a pohled do subdurálního prostoru na okcipitální část hemisfér a mozeček (polohu pineální žlázy v hloubce ukazuje bílá šipka).



Obrázek 32a, b, c

Zpřístupnění pineální žlázy uložené v hloubce pod mozkovými hemisférami retrakcí hemisfér; scelení tvrdé pleny mozkové jednotlivými stehy po vynětí pineální žlázy; vyjmutá gl. pinealis.



Obrázek 33

Uzavření operační rány ve 2 - 3 svalových, 1 podkožní a 1 kožní vrstvě.



Pes

Postup pinealektomie u psa:

Zkrácená fotodokumentace operačního postupu viz dále.

Hlava psa byla oholena a následně fixována, desinfikována a zarouškována. Provedla jsem mediální kožní řez a založila rozvěrák. Nedostatečný operační prostor vyžadoval uvolnění větší úponové plochy žvýkacích svalů (m. temporalis) a části m. occipitalis od kostěných hřebenů (crista temporalis). Okružní pilkou jsem následně provedla okénkovou trepanaci. Po podvázání a přerušení šípového splavu (sinus sagittalis superior) jsem po podvázání stopky odstranila gl. pinealis. Dura mater byla scelena jednotlivými stehy. Trepanační víčko bylo fixováno kostními stehy provedenými skrz předpřipravené návrty. Uvolněné plošné úpony temenních svalů byly vzájemně lehce propojeny pokračujícím stehem nad trepanačním víčkem a přichyceny i ke kostním stehům. Kožní rána byla uzavřena v jedné vrstvě pokračujícím stehem do Bauerova hřebenu.

Fotodokumentace provedení pinealektomie u kadáveru psa

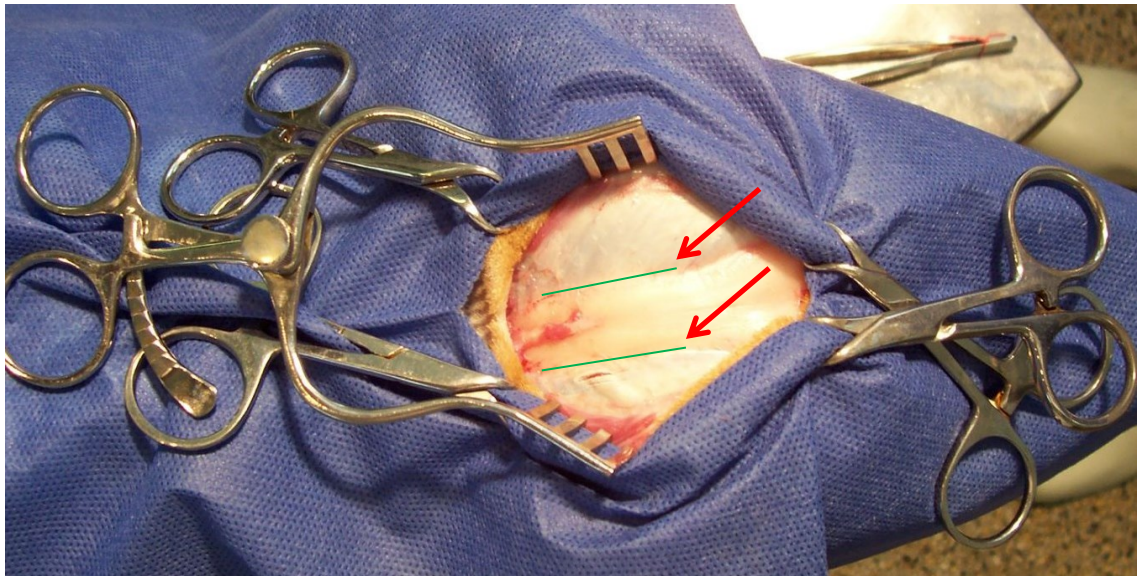
Obrázek 34a, b

Fixace hlavy psa; vystříhání operačního pole.



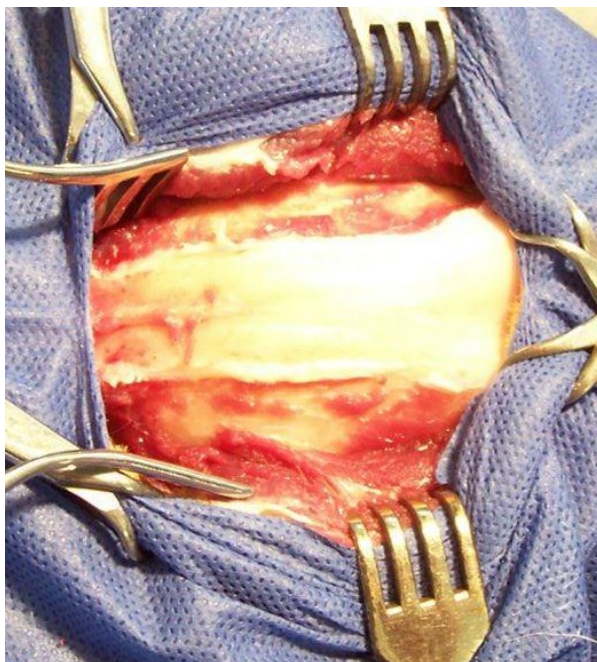
Obrázek 35

Zarouškování operačního pole a následné provedení řezu kůže a odhalení kraniálního periostu a svalů (m. temporalis dex. at sin.) upínajících se vysoko na lebku (naznačeno zelenou linkou a červenou šipkou).



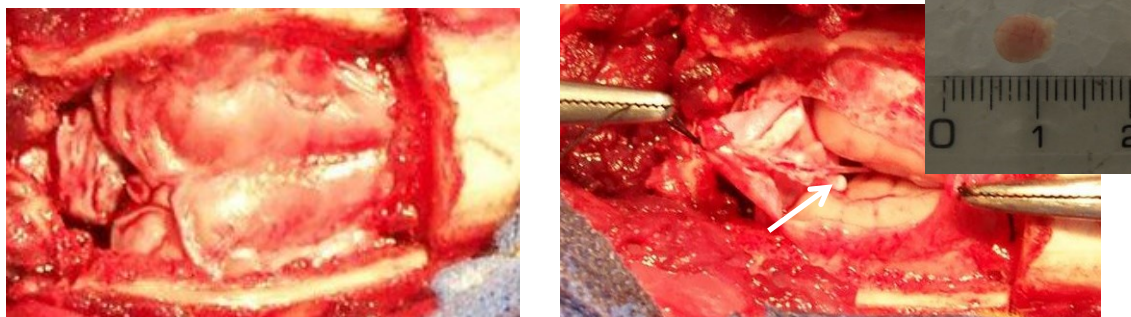
Obrázek 36a, b

Uvolnění části úponové plochy a retrakce žvýkacích svalů od kostěných valů; okénková trepanace provedená jednotlivými spojenými řezy.



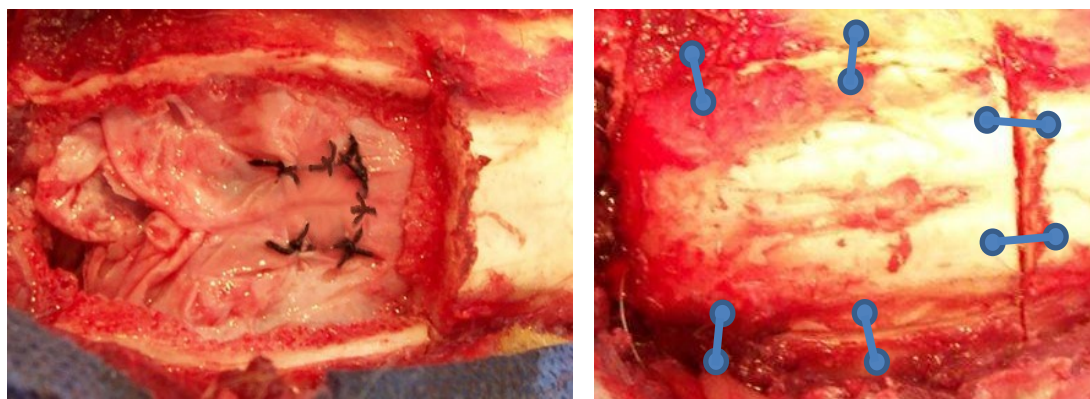
Obrázek 37a, b, c

Pohled na tvrdou plenu mozkovou; podvaz sagitálního splavu (sinus sagittalis superior) opichem atraumatickým jehlovým návlekm a následné otevření dura mater, pohled do subdurálního prostoru na okcipitální část hemisfér (polohu pineální žlázy v hloubce pod mozkovými hemisférami naznačuje bílá šipka); vyjmutá gl. pinealis.



Obrázek 38a, b

Scelení tvrdé pleny mozkové jednotlivými stehy provedenými atraumatickým jehlovým návlekm po vynětí pineální žlázy; překrytí trepanačního otvoru kostěným krytem, naznačení polohy fixačních návrtů a jejich propojení.



Obrázek 39a, b

Konečné uzavření operační rány v 1 svalové a 1 kožní vrstvě pokračujícím stehem.



Výsledky pinealektomie – animální model:

V tomto oddíle ve společné následující tabulce shrnuji poznatky z bodu:

a) – obtížnost provedení chirurgického zákroku pinealektomie

b) – vhodnost a použitelnost vybraných animálních modelů pro účely této studie

Tabulka 1

Vhodnost a použitelnost vybraných animálních modelů.

Tabulka shrnuje jednotlivé hodnocené parametry pro jednotlivé animální modely a celkový součet bodů pro každý druh.

animální model	obtížnost chirurgického provedení	fyziologická podobnost modelu	provozní možnost užití modelu	součet hodnot
myš	3	2	1	6
potkan	2	2	1	5
morče	2	2	3	7
králík	1	2	3	6
bezrohá ovce	2	3	3	8
prase	3	1	3	7
pes	3	2	3	8

použitá hodnotící škála:

1 – lehké, snadné provedení; vysoká podobnost; reálná možnost

2 – středně obtížné provedení; přijatelná podobnost; potenciální možnost

3 – těžké, obtížné provedení; nízká podobnost; nereálná možnost

Z předchozí tabulky vyplývá, že nejlépe hodnoceným potenciálním animálním modelem je potkan.

Diskuse:

Volba vhodného animálního modelu pro pokusy zaměřené na důsledky pinealektomie není úplně jednoduchá. Ideální animální model nahrazující člověka by měl mít co možno nejpodobnější fyziologii, životní rytmus i simulovat vlivy okolního prostředí. To však v experimentu většinou není možné. I přesto je užití animálního modelu výhodné. Umožňuje experimentátorovi cíleně ovlivňovat pouze určité parametry, například v laboratoři zcela minimalizovat vliv prostředí, což právě v klinické praxi možné není. To také umožňuje získat konzistentnější výsledky testovaných parametrů.

diskuse z hlediska: - obtížnost provedení chirurgického zákroku pinealektomie (bod a)

Z hlediska chirurgické náročnosti výkonu je možnost volby mezi potkanem či králíkem – oba tyto modely (stejně jako myš a morče) nemají gyrifikované mozkové hemisféry a pineální žlázu mají uloženou povrchově a tedy i relativně chirurgicky snadno dosažitelnou. Chirurgický výkon je však značně komplikovaný velmi malou velikostí dotčených anatomických struktur a blízkostí centrálního venózního splavu, který je třeba při pinealektomii přerušit. Tento zásah však potkani relativně dobře přežívají (úmrtnost po zákroku nebyla vyšší než 10 %). U přežívajícího modelu by však přerušení sagitálního splavu (sinus sagittalis superior) mohlo mít vážné funkční důsledky ve změnách prokrvení mozku. To také naznačují získané výsledky z následující studie, kde u sham operované skupiny (přerušení splavu (sinus sagittalis superior) bez provedení pinealektomie) byly i po 36 týdnech od operace naměřeny vyšší hodnoty kortikosteronu a melatoninu než u skupiny kontrolní bez operace. (Viz následující oddíl B – Pinealektomie – v experimentu.) U ostatních modelů ovce, prase a pes, je anatomická velikost struktur sice větší, avšak provedení klasickým SCIT přístupem je značně komplikované.

U bezrohé ovce je provedení pinealektomie relativně snadnější než u psa a prasete i přes pneumatizovanou silnou lebku. Problémem u ovcí a koz je však stále celková anestezie, při které často dochází k uvolnění tonu bachorového svěrače. Ovce je navíc fyziologií metabolismu člověku značně vzdálená.

U dospělého prasete je provedení pinealektomie nejvíce komplikováno zaúhlením a nasazením hlavy na velmi krátký a značně masivní krk. Mohutná okcipitální pneumatizovaná kost a masivní tuková a svalová vrstva v šíjové krajině značně omezují chirurgické preparační možnosti. U prasete je potřebná velikost provedeného řezu v mediální linii 25 – 35 cm a minimálně 35 cm dorsoventrálně do hloubky, dále je nutné překonat značně silnou (4 – 6 cm tlustou) okcipitální kost a nakonec je třeba proniknout tímto otvorem až k značně hluboko uložené gl. pinealis a provést podvaz a následnou resekci žlázy.

U psa se ukázaly největším problémem široce a vysoko na lebku se upínající mohutné žvýkací svaly a dále i částečně osifikovaná tvrdá plena mozková zasahující hluboko do supracerebelárního prostoru.

diskuse z hlediska: vhodnost a použitelnosti vybraných animálních modelů (bod b)

Volba experimentálního modelu není tak jednoznačná.

Pes je obecně historicky tradičním a starým chirurgickým modelem (Markowitz, 1959), (Lopuchin, 1976). Má mnoho chirurgických i fyziologických výhod (fyziologicky se relativně podobá člověku, má relativně snadno dosažitelný povrchový cévní systém, je celkem dobře chovatelsky zvládnutelný a podobně), ale současná legislativa, etický kodex a mimo jiné i jeho pořizovací a chovatelské náklady prakticky znemožňují užití tohoto modelu k jakýmkoli chirurgickým experimentům.

Prase člověku nejvíce fyziologicky odpovídá. Je ovšem značně velkým a chovatelsky poněkud nevhodným (vysoké nároky na chovný prostor, potravu, obtížná manipulace a obtížná dostupnost povrchového cévního systému a jiné) a netradičním modelem (na praseti jako chirurgicko-patofyziologickém modelu není mnoho publikací a tedy i možnost porovnání s literaturou je omezená).

Ovce je také relativně starý chirurgický i fyziologický model - nejčastěji používaný jako relativně malý zástupce skupiny přežvýkavců. Neklade přílišné chovatelské nároky ani na ustajovací prostor ani na potravu. Z hlediska fyziologického ale člověku odpovídá nejméně.

Králík je relativně vhodný animální model. Má obdobnou fyziologii jako potkan, ale je mnohem větší a klade tak i větší chovatelské nároky (prostor, strava), je legislativně a eticky méně dostupným modelem oproti potkanovi a odborných publikací s tímto animálním je také mnohem méně.

Potkan je z výše zmíněných modelů nejvhodnější. Chovatelská náročnost je přiměřená. Z hlediska fyziologie má ovšem převrácený biorytmus (noční aktivita), dále je nibbler (uždíbovač – žádné pravidelné krmení, žere příležitostně, prakticky neustále), dosažitelnost jeho cévního systému je ale dobrá. Potkan je důležitý a stále tradiční a dalo by se říci až standardní, v literatuře značně rozšířený a citovaný animální model.

Závěr:

Z hlediska chirurgické náročnosti výkonu je praktická možnost volby animálního modelu mezi králíkem a o něco málo „složitějším“ potkanem. Po zvážení všech možností a reálných nákladů a potřeb se volba v tomto kritériu přiklání nejvíce k potkanovi či myši i přes některé relativní nevýhody použití těchto modelů.

Po celkovém porovnání všech výhod i nevýhod je na základě všech uvažovaných kritérií potkan stále nejvhodnějším animálním modelem pro tuto studii.

B Pinealektomie - v experimentu:

Cíl:

Najít patofyziologické důsledky pinealektomie u dlouhodobě přežívajícího potkana. Konkrétně ověřit, zda provedení pinealektomie způsobí snížení hladiny melatoninu a případně ovlivní i jiné biochemické, fyziologické a behaviorální parametry.

Hypotéza:

Pinealektomie u operovaných zvířat způsobí snížení hladin cirkulujícího melatoninu v porovnání s kontrolní a sham operovanou skupinou a ovlivní i jiné fyziologické a případně i behaviorální parametry.

Metodika:

- Užitá laboratorní zvířata a chovné podmínky:

Potkani, kmen Wistar, linie AVČR, samci, 3 měsíce, celkový počet 30, 3 skupiny:

KO – kontroly (n = 8)

SH – sham operace (sham operated - podvaz sagitálního splavu) (n = 5)

PN – pinealektomie (n = 10)

(7 zvířat bylo z dalších pokusů vyřazeno – vážné postoperační následky nebo úhyn).

Chovné podmínky: voda a potrava (Altromin standard) ad libitum (pouze při testech OGTT 8 hod hladovění před testem), světelný režim 12/12, teplota v chovech 23°C.

- Časový harmonogram, stručný postup a jednotlivé použité testy:

Průběžné vážení všech zvířat 1x týdně po celou dobu pokusu.

1. týden

Zvířata umístěna do nových chovných prostor.

Habituální (navykací) doba 7 dnů.

Po habituaci jsou všechna zvířata individuálně označena.

Předrozdělení do budoucích skupin KO n = 8, SH n = 7 / PN n = 15.

2. týden

Na konci 2. týdne je proveden orální glukózový toleranční test (OGTT 1), před OGTT zvířata hladovějí maximálně 8 hodin.

Per orální (p.o.) podání glukózy gastrickou sondou v množství 2 g / kg b.w. (body weight) v maximálním aplikovaném objemu 10 ml / kg b.w.). Odběry krve z ocasní vény a stanovení hladiny krevní glukózy v mmol / l za pomoci glukometru. Časové body měření: 0 před aplikací, 30, 60, 90 a 120 minut po aplikaci.

3. týden

Pinealektomie / sham operace.

V inhalační (isofluoranové) anestezii byla pokusným zvířatům provedena pinealektomie (odstranění gl. pinealis dle výše popsaného postupu – viz oddíl A). Do následujících pokusů použita jen 100% pinealektomovaná zvířata bez chirurgických komplikací. Sham operovaným zvířatům byl proveden stejný zákrok jako u skupiny pinealektomie - tedy dvojitý podvaz sagitálního splavu ale bez následné pinealektomie. Preventivní podání nízkých dávek ATB (pendepon) po dobu 3 týdnů po zákroku.

3. – 30. týden

Stárnutí zvířat - téměř 7 měsíců ponechání zvířat v klidu v chovu bez testů.

31. týden

OGTT 2 – postup stejný jako při OGTT 1.

32. týden

Transport zvířat do nového chovného prostředí.

33. – 38. týden

Ponechání zvířat v klidu a možnost postupné habituace na nové chovné prostředí.

39. a 40. týden

Opakované odběry krve.

Krev odebírána ve dvouhodinových denních profilech pro stanovení hodnot melatoninu a kortikosteronu v krvi. Noční odběry byly prováděny za tmy a maximálního klidu při slabém červeném světle odběrem z ocasní vény.

40. týden

Ukončení experimentu.

Po ukončení tohoto 40ti týdenního experimentu byla zvířata využita spolupracujícím pracovištěm k následným imunologickým testům, výsledky zde nejsou zahrnuty.

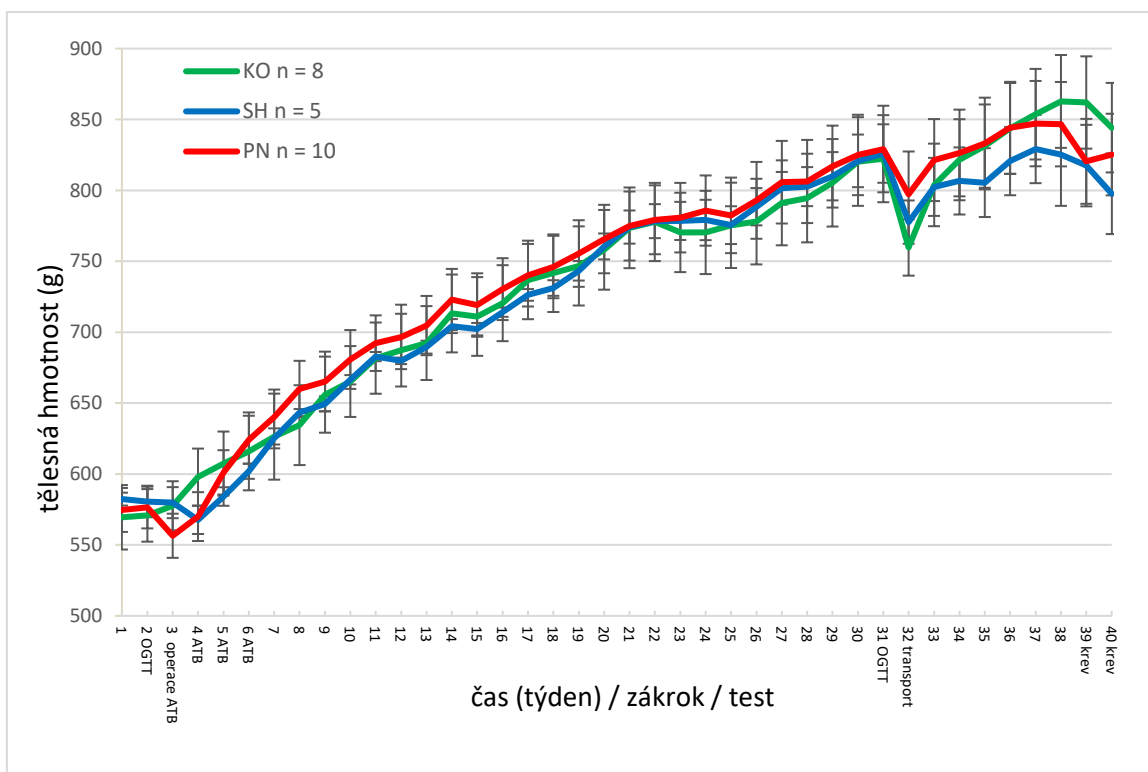
Statistika:

Grafy jsou z programu Excel 2016. Data jsou prezentována jako průměry ± SEM (standardní chyba průměru). Výsledky byly dále hodnoceny v programu SigmaPlot verze 13.0. Použité statistické metody byly Two Way Repeated ANOVA (one factor repetition) a post-hoc Bonferroni T-test. Ve dvoucestné analýze rozptylu byla faktorem 1 vždy skupina a faktorem 2 čas. Výsledky ještě nebyly publikovány. Publikace je v přípravě.

Výsledky:

Tělesnou hmotnost v průběhu experimentu (1. až 40. týden) ukazuje následující Graf 1.

Graf 1 Tělesná hmotnost (g) v jednotlivých skupinách zvířat v průběhu experimentu.

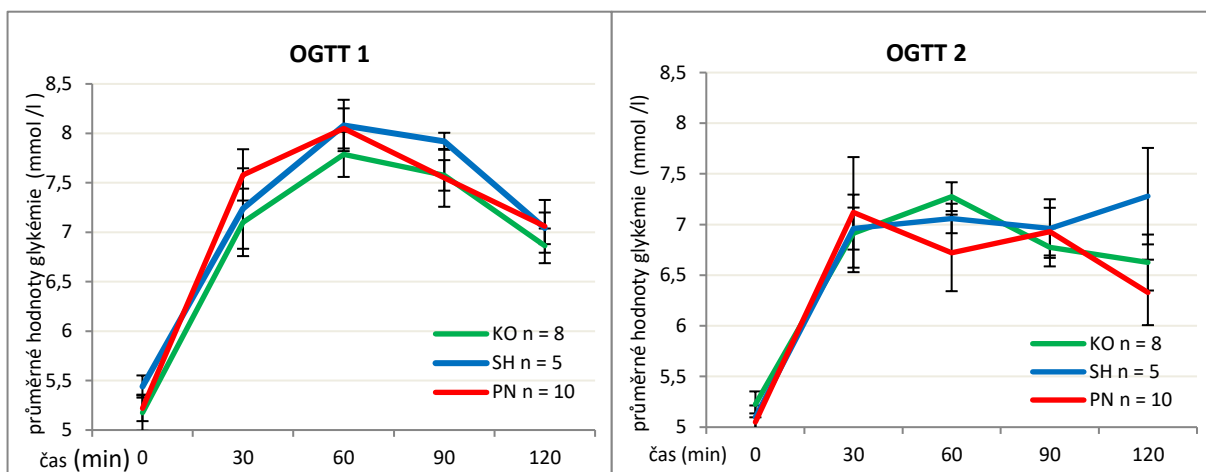


Experimentální skupiny: PN (pinealektomie, n = 10), SH (sham operace, n = 5), KO (kontroly, n = 8). Na ose Y jsou kromě času zaznamenány také provedené zákroky (operace, ATB = podání antibiotik, transport, odběr krve) a testy (orální glukózový toleranční test OGTT1 a 2).

Tělesná hmotnost zvířat se v průběhu pokusu stabilně zvyšovala ve všech skupinách oproti týdnů 1 ($P < 0,001$) s výjimkou prvních 4 týdnů. Nebyl pozorován žádný rozdíl v tělesné hmotnosti mezi jednotlivými pokusnými skupinami.

Orální glukózový toleranční test - OGTT 1 (2. týden) a OGTT 2 (31. týden)

Orální glukózový toleranční test ukazuje rychlost metabolismu glukózy. Na Grafu 2a, 2b jsou zachyceny změny plasmatické hladiny glukózy během OGTT 1 a OGTT 2.

Graf 2a, 2b OGTT 1 a OGTT 2.

Experimentální skupiny: PN (pinealektomie, n = 10), SH (sham operace, n = 5), KO (kontroly, n = 8). Hladina glukózy v krvi potkanů po p.o. aplikaci glukózy (2 g / kg b.w.) v čase, byla měřena glukometrem.

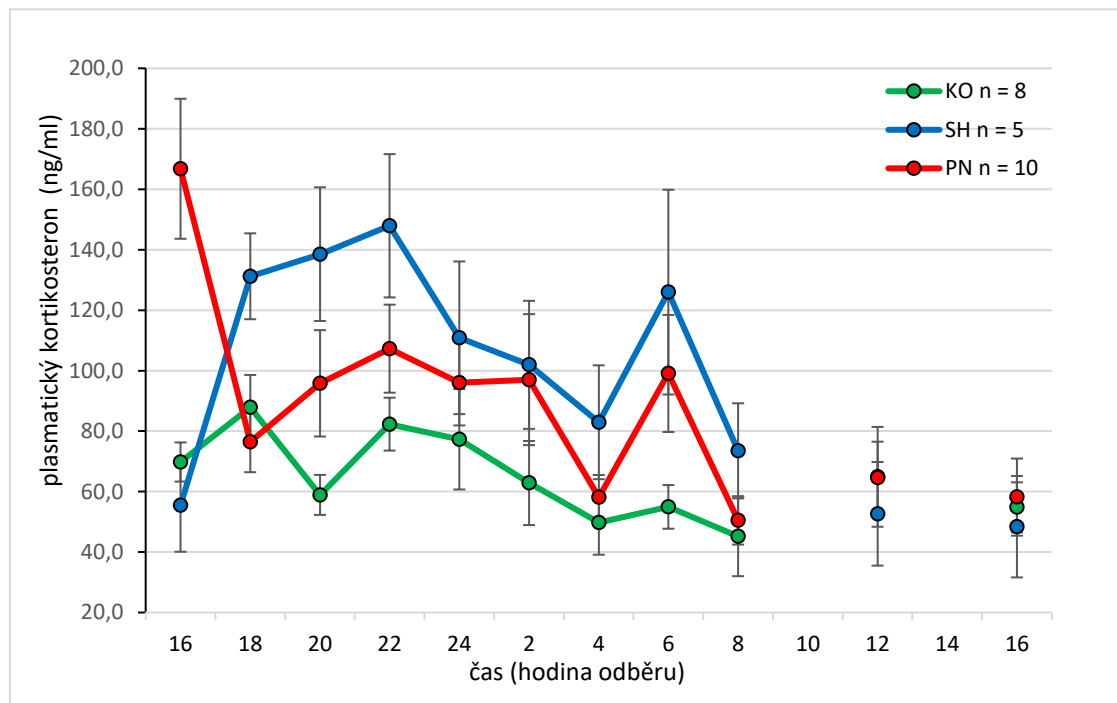
V testu OGTT 1 stejně jako v testu OGTT 2 nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi skupinami. U skupiny KO (kontroly) se výsledky mezi testy OGTT 1 a OGTT 2 statisticky neliší. U skupiny SH (sham operované) se výsledky OGTT 1 a OGTT 2 testů vzájemně liší významně ($P = 0,024$). U skupiny PN (pinealektomie) se testy OGTT 1 a OGTT 2 vzájemně liší na hranici významnosti ($P = 0,045$).

Výsledky ukazují, že pokusné zásahy neovlivnily podstatně průběh glykémie během orálního glukózového tolerančního testu.

Při porovnání výsledků OGTT 1 a OGTT 2 jsme však zaznamenali rozdíly u skupiny sham operované a pinealektomované, zatímco u skupiny kontrolní se výsledky nelišily.

Plasmatický kortikosteron – denní profil (39. – 40. týden)

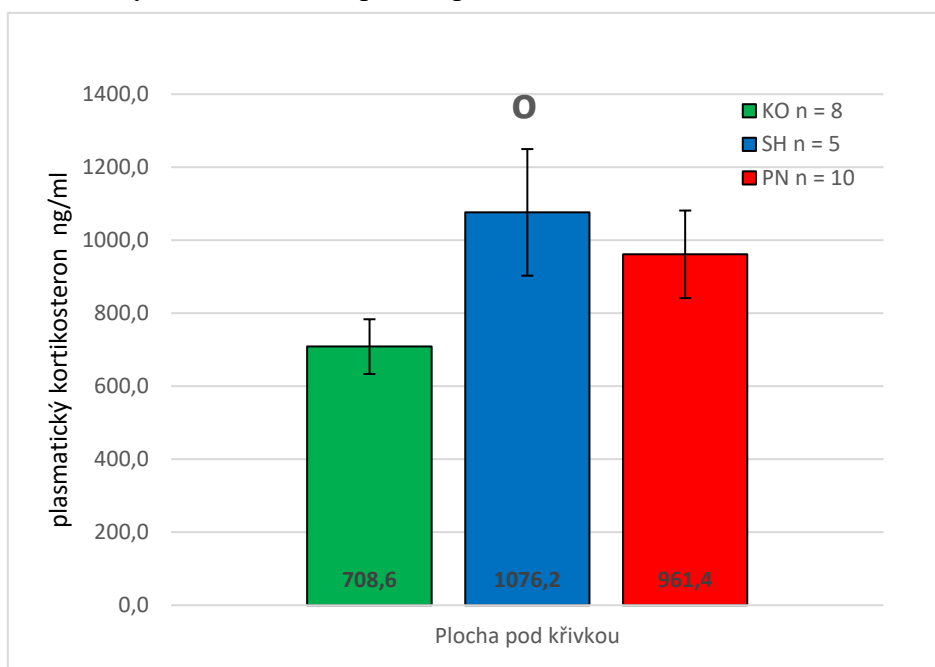
Kortikosteron je u potkana hlavní glukokortikoidní hormon a podílí se na stresové reakci.

Graf 3 Denní profil plasmatického kortikosteronu u jednotlivých skupin.

Experimentální skupiny: PN (pinealektomie, n = 10), SH (sham operace, n = 5), KO (kontroly, n = 8). Hladiny kortikosteronu byly stanoveny v čase ve dvouhodinovém denním profilu. (Krev nebyla odebrána v 10 a 14 hodin, aby byla snížena zátěž pro zvířata.)

V průběhu pokusu se skupiny mezi sebou liší jen hraničně ($P = 0,067$). Hodnoty se v čase mění vysoce signifikantně ($P < 0,001$). Byla nalezena i vysoce významná interakce faktoru čas a skupina ($P < 0,001$). U kontrolní skupiny se plasmatická hladina kortikosteronu v průběhu dne i noci nijak zásadně nemění na rozdíl od obou operovaných skupin. Výrazné a rychlé změny hladin u pinealektomované a sham skupiny naznačují vyšší citlivost a reaktivitu zvířat i na drobné podněty jako je například příchod experimentátora do ustajovacího prostoru.

Rozdíl mezi pokusnými skupinami přesněji ukazuje Graf 4, který hodnotí koncentraci kortikosteronu jako plochu pod křivkou.

Graf 4 Plasmatický kortikosteron – plocha pod křivkou.

Experimentální skupiny: PN (pinealektomie, n = 10), SH (sham operace, n = 5), KO (kontroly, n = 8).

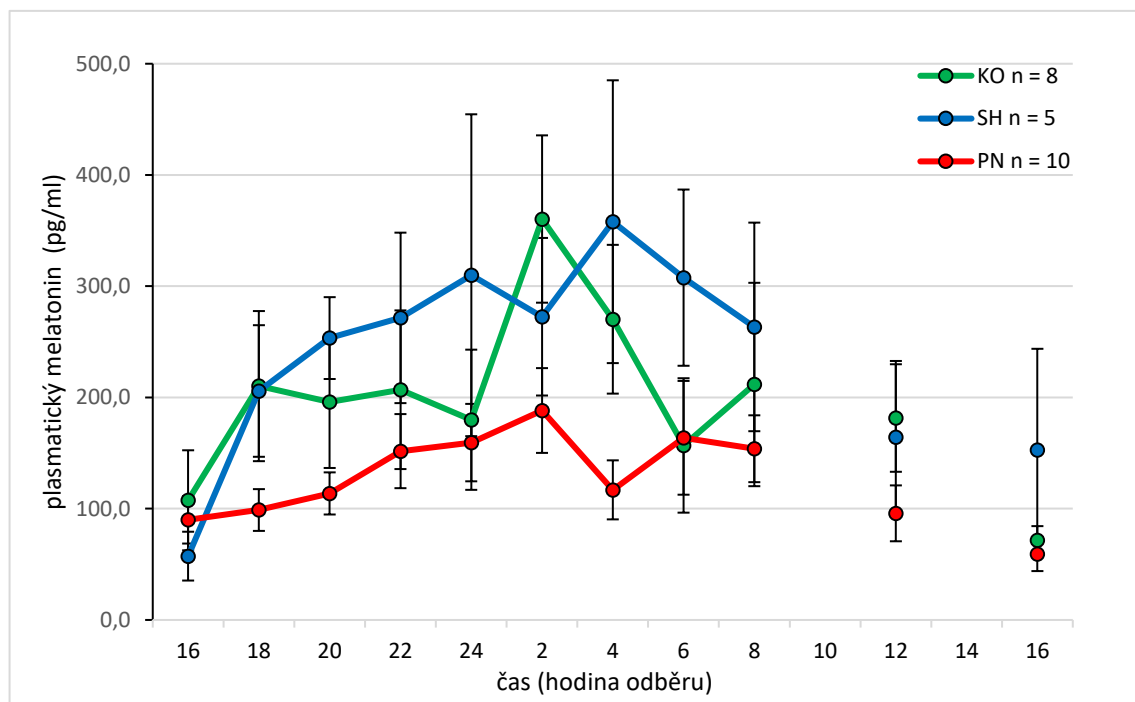
Skupina PN (pinealektomie) se od skupiny KO (kontroly) liší hraničně (T- test: KO vs PN $P = 0,09$).

Skupina SH (sham operovaná) se liší od KO (kontroly) (T- test: KO vs SH ($P < 0,05$) v grafu označeno **○**).

Výsledky naznačují mírné zvýšení plasmatických hladin kortikosteronu u sham operovaných zvířat ($P < 0,05$) a hraniční zvýšení ($P = 0,09$) u pinealektomovaných potkanů oproti skupině kontrolní.

Plasmatický melatonin – denní profil (39. – 40. týden)

Melatonin je produkován zejména v temné fázi dne a to i u zvířat s noční aktivitou jako jsou potkani.

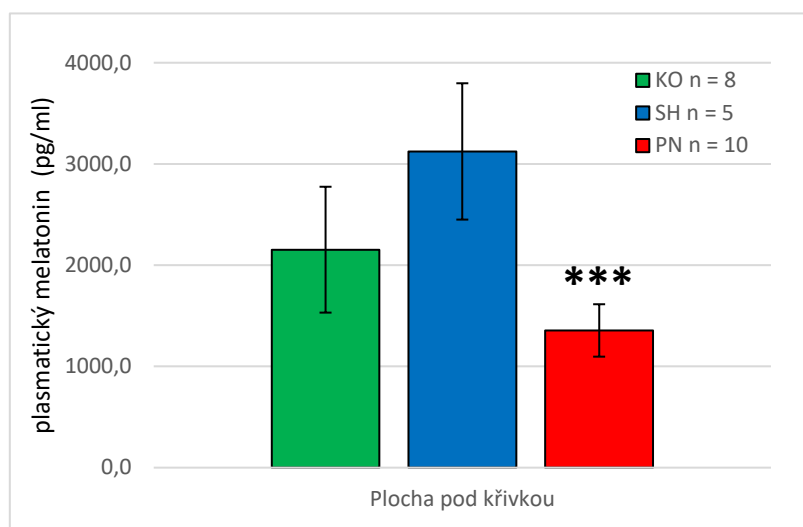
Graf 5 Denní profil plasmatického melatoninu u jednotlivých skupin.

Experimentální skupiny: PN (pinealektomie, n = 10), SH (sham operace, n = 5), KO (kontroly, n = 8).

Hladiny melatoninu byly stanoveny v čase ve dvouhodinovém denním profilu. (Krev nebyla odebrána v 10 a 14 hodin, aby byla snížena zátěž pro zvířata.)

V temné, aktivní části dne potkanů přirozeně dochází ke zvýšení syntézy a následně ke zvýšení plasmatických hladin melatoninu. Ve světlé části dne jsou plasmatické hladiny přirozeně mnohem nižší. Z grafu je jasně patrné, že hladiny melatoninu se v čase mění vysoce signifikantně ($P < 0,001$) v porovnání s 16 hodinou, kdy jsou hladiny minimální. Průměrné hodnoty jednotlivých skupin se v čase mění jen s hraniční významností ($P = 0,0059$).

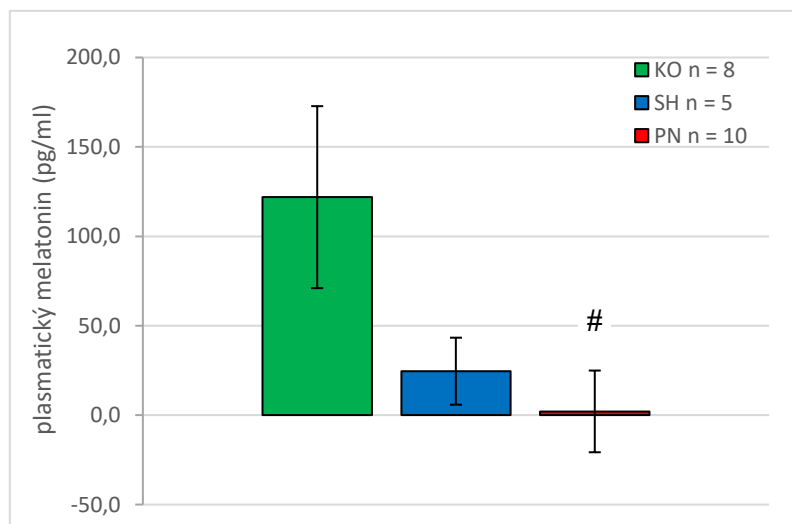
Rozdíly mezi skupinami ukazuje nejlépe následující graf. Snažili jsme se analyzovat rozdíly mezi denní a noční produkcí melatoninu u jednotlivých skupin (Graf 7 a Graf 8).

Graf 6 Průměrná plocha pod křivkou melatoninového profilu u jednotlivých skupin.

Experimentální skupiny: PN (pinealektomie, n = 10), SH (sham operace, n = 5), KO (kontroly, n = 8).

Z výsledků vyplývá, že sham operace neovlivnila průměrnou koncentraci melatoninu.

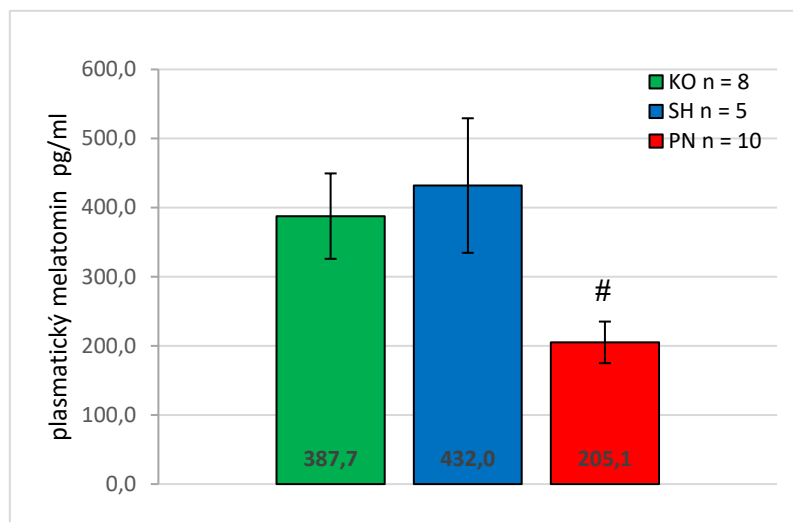
Operované skupiny PN (pinealektomie) a skupina SH (sham operace) se vzájemně vysoce významně liší: T – test SH vs PN ($P < 0,001$). U pinealektomovaných zvířat došlo k výraznému snížení této hodnoty.

Graf 7 Noční vzestup melatoninu v jednotlivých skupinách.

Experimentální skupiny: PN (pinealektomie, n = 10), SH (sham operace, n = 5), KO (kontroly, n = 8). (Od součtu hodnot naměřených ve 2 a 4 hodiny odečten součet hodnot 22 a 24 hodin, to celé děleno dvěma).

Skupina s pinealektomií (PN) postrádá noční vrchol melatoninu a nedosáhla hodnot skupiny kontrolní (KO) T-test: ($P < 0,05$).

Graf 8 Rozdíly maximálních a minimálních hodnot plasmatického melatoninu během 24 h profilu.



Rozdíl maximální a minimální hodnoty naměřeného melatoninu u skupiny s pinealektomií (PN) byl významně nižší než hodnoty obou zbývajících skupin KO i SH ($P < 0,02$).

Tyto výsledky ukazují, že plasmatická hladina melatoninu stoupá kolem půlnoci jen u kontrolních zvířat, zatímco pinealektomie tento noční vzestup odstraní a snižuje tak hladinu melatoninu během celého časového profilu.

Diskuse:

Pinealektomie je chirurgický zákrok zasahující do centrálního nervového systému. Tento systém je velmi citlivý, takže i nepatrné poškození mozkové tkáně může mít vážné důsledky. Hrozí poškození okolních struktur, krvácení i postoperační edém mozku nebo postoperační funkční změny (paroxyzmy). To byla pravděpodobně příčina úhynu některých operovaných zvířat po provedené pinealektomii nebo jen sham operaci (podvaz sagitálního splavu). Pokud zvířata přežila týden od operace, další komplikace v souvislosti s provedeným chirurgickým zákrokem nenastaly. Tkáně a kosti se údajně hojí hůře u pinealektomovaných zvířat (Basaloglu et al., 2021), (Palin et al., 2018). Já jsem ale žádný makroskopicky výrazný rozdíl v hojení operační rány u skupiny s pinealektomií v porovnání s sham operovanými zvířaty nepozorovala. Neprováděla jsem ale žádný konkrétní test zaměřený na porovnání rychlosti hojení. Nepřítomnost rozdílu může být dána i krátkou dobou melatoninové absence u pinealektomované skupiny.

Tento komplexní experiment v původním plánu zahrnoval i opakované behaviorální testy zaměřené na prostorovou paměť a orientaci - test v Morrisově vodním bludišti a na rotující

aréně. Tyto kognitivní testy bohužel nebyly použitelné. Ukázalo se, že zvolený albinotický kmen zvířat (Wistar) ve věku 36 týdnů velmi špatně vidí na dálku a zvířata se již nebyla schopna v prostředí zrakově orientovat. Proto byly tyto testy z programu zcela vynechány. U starých pinealektomovaných potkanů (cca od 30. týdne experimentu), však byla pozorována vyšší averze a agresivita vůči ostatním zvířatům i experimentátorům. Tito jedinci museli být chováni jednotlivě. To odpovídá i publikacím popisujícím negativní vliv pinealektomie u potkana na chování v behaviorálních testech i zhoršené výsledky v kognitivních úlohách (Tchekalarova et al., 2020), (Tzoneva et al., 2021).

Tělesná hmotnost

Hmotnost jednotlivých skupin se v průběhu experimentu mezi skupinami nelišila. Podobná data publikovali i Kim et al. (Kim et al., 2020). Jak je z Grafu 1 patrné, provedené zákroky a testy hmotnost neovlivnily, ale manipulace se zvířaty, jako je transport do nového chovného prostředí, může způsobit výrazné výkyvy hmotnosti. Nejintenzivnějším stresorem je pravděpodobně právě přesun do nového prostředí s jinými pachy, ošetřovateli i způsobem manipulace, i když dieta se v průběhu celého experimentu nelišila.

OGTT

Na Grafu 2a je vidět, že před chirurgickým zákrokem (OGTT 1) je utilizace glukózy normální a skupiny se vzájemně neliší. Na Grafu 2b (OGTT 2) 29. týden po chirurgickém zákroku také není rozdíl mezi skupinami signifikantní. Z pohledu na oba grafy je však patrná tendence k oplošťování křivky. Podobná data publikovali i Kim et al. (Kim et al., 2020). Jednotlivé pokusné skupiny se mezi sebou nelišily.

Plasmatický kortikosteron

Na rozdíl od člověka není u potkana dominantním typem glukokortikoidů kortizol, ale jeho analog kortikosteron. Má stejné systemické účinky. Hladina kortizolu je u potkana i za normálního stavu nízká. Plasmatický kortikosteron dlouhodobě stoupá po pokusných chirurgických zásazích v operovaných skupinách ve srovnání se stejně starými kontrolami.

Plasmatický melatonin

Hladina produkovaného melatoninu se postupně s věkem snižuje, jak víme z humánní medicíny i z výzkumu. Vzhledem k průměrné délce života potkana (2 – 3 roky) byli potkani v tomto experimentu v době měření melatoninových hodnot přibližně v polovině délky života. I přes malý počet hodnot a jejich vysoký rozptyl lze pozorovat rozdíly mezi jednotlivými skupinami. Nejdůležitější jsou rozdíly v hodnotách naměřených během nočního maxima. Pinealektomovaná skupina postrádá významný noční maximální vrchol. Překvapivé jsou výsledky sham operované skupiny. Jejich hladiny plasmatického melatoninu jsou mnohem vyšší než ve skupině kontrolní. Jediné pravděpodobné vysvětlení

tohoto rozdílu je fakt, že podvaz durálního splavu (sinus sagittalis) zásadně mění prokrvení mozkových oblastí a tento zákrok mohl stimulovat gl. pinealis k dlouhodobě vyšší produkci melatoninu. Možná změna prokrvení mozkových oblastí by mohla souviset i s plasmatickou hladinou kortikosteronu, jehož sekrece je také centrálně řízena (kortiko-hypothalamo-hypofyzo-adrenální osou).

Srovnání těchto výsledků s literaturou je obtížné, neboť prakticky žádná z recentních prací se nezabývá studiem obdobných fyziologických parametrů, na které jsme se v našem pokusu zaměřili. V některých recentních publikacích je popsána hladina melatoninu, ovšem nikoli v krvi, ale přímo z homogenátu gl. pinealis, což v našem experimentu nebylo možné.

Závěr:

Po 36 týdnech od operace byly u pinealektomované skupiny v noční produkci melatoninu zjištěny nižší hladiny v porovnání s kontrolami. Hodnoty kortikosteronu se u sham operované skupiny lišily od kontrol. Jiné rozdíly mezi skupinami nebyly nalezeny.

C Pinealektomie - v klinické praxi:

Cíl:

Zjistit, jaké jsou u pacientů s pineální cystou vybrané fyziologické parametry: melatoninový, kortizolový a glykemický cirkadiální profil. Ověřit jaké fyziologické změny nastávají po pinealektomii.

Hypotéza:

Pinealektomie způsobí snížení hladin melatoninu a ovlivní i další související fyziologické parametry.

Metodika:

Na Neurochirurgické klinice v ÚVN jsme v průběhu let 2012 a 2013 vyšetřili a následně vybrali 7 pacientů s jasnou MR diagnózou pineální cysty. Pacienti, kteří měli výrazné obtíže a byli následně indikováni k resekci, tvořili skupinu operovaných, ostatní asymptomatictí pacienti tvořili kontrolní skupinu.

Čtyři pacienti podstoupili chirurgickou totální ablaci gl. pinealis, ostatní 3 nebyli pro pinealektomii indikováni. Ve všech zde uvedených případech (7) byl na MR vyšetření jednoznačný nález pineální cista (zřetelně ohraničený útvar s homogenním obsahem) nikoli pinealocytom. U operovaných pacientů to také jednoznačně potvrzují i histologické nálezy z excidované tkáně (u všech vzorků proliferační mitotický index menší než 2 a uniformní buňky).

Ve skupině operovaných byly 3 ženy (22, 23 a 59 let) a 1 muž (33 let). Operovaní před zákrokem udávali nejčastěji bolesti hlavy jen obtížně tišitelné běžnými analgetiky (3x), závratě (2x), neschopnost soustředění (1x). Kontrolní skupinu tvořily 2 ženy (21 a 40 let) a jeden muž (36let). Kontrolní skupina neoperovaných - subjektivně bez závažnějších obtíží. Uváděny byly jen občasné bolesti hlavy (2x) a vyšší únavnost (2x). Hydrocefalus nebyl diagnostikován v žádném z uvedených případů. Stejně tak obtíže se spánkem či usínáním nebyly udávány ani u jedné skupiny pacientů.

Indikovaným čtyřem pacientům byla provedena totální pinealektomie (Prof MUDr Vladimír Beneš, DrSc). Výkon v celkové anestezii s intubací v poloze pacienta v sedě. Standardní neurochirurgická premedikace s preoperačním podáním ATB (Vulmizolin - cefalosporin 3. generace). Chirurgický postup: osteoplastická okénková trepanace v okcipitální části, klasická mikrochirurgická technika, běžný SCIT (supracerebelární infratentoriální) přístup. Dura mater byla chirurgicky uzavřena, kost navrácena a upevněna

stehy. Kožní rána uzavřena obvyklým způsobem. Následná péče byla standardní neurochirurgická pooperační, běžná na tomto pracovišti. Operace i hojení rány proběhly u všech pacientů bez komplikací a per primam.

U všech pacientů byl při hospitalizaci proveden 24 hodinový profil (každé dvě hodiny vzorek krve) pro stanovení zvolených biochemických parametrů (melatonin, kortizol, glukóza). Noční odběry probíhaly jen při osvětlení drobnou kapesní svítilnou s červeným filtrem umístěnou v kapse pláště sestry při zavřených a zakrytých očích pacienta.

U operovaných pacientů byly tyto profilové odběry zopakovány před propuštěním do domácí péče. Dále bylo všem pacientům předloženo několik dotazníků. Dotazníky byly zaměřené na: denní periodicitu, sezonalitu, osobnostní charakteristiku, plodnost a závislost a závažné či chronické choroby.

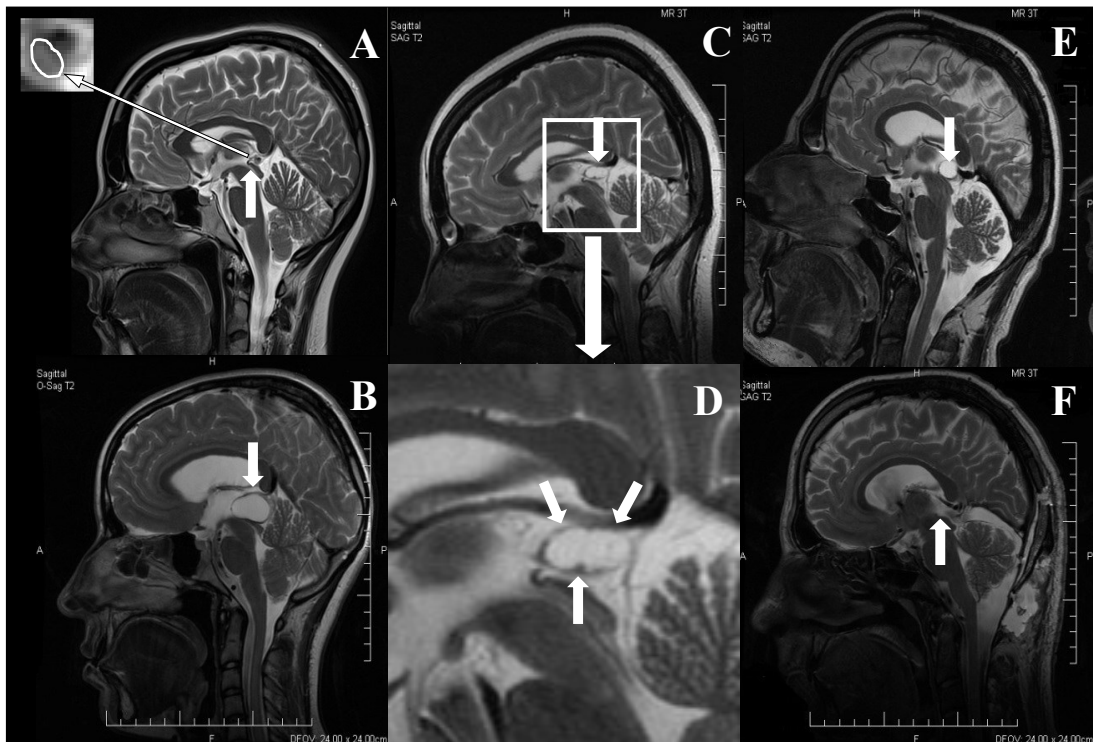
Více viz (Majovsky et al., 2017).

Klinické výsledky

Výsledky této studie byly publikovány v práci Majovsky et al. (Majovsky et al., 2017).

Zde uvádím jen výsledky, které se týkají velikostí pineálních cyst a melatoninové produkce (Tabulka 2). Dále přikládám snímky z MR od některých pacientů ze studie (Obrázek 40).

V tomto okruhu jsem k získaným výsledkům přispěla jen z části. Spolupracovala jsem s ÚVN ve Střešovicích (odd. Neurochirurgie) a v průběhu 3 let jsem předkládala pacientům s diagnózou pineální cista různé dotazníky. Dotazníky byly zaměřené na: denní periodicitu, sezonalitu, osobnostní charakteristiku, plodnost a závislost a závažné či chronické choroby. Tyto výsledky – zejména vzhledem k malému počtu pacientů a jejich nehomogenosti – prozatím nebyly publikovány. Dále jsem zaznamenávala pohlaví a věk pacienta, individuální velikost cyst jednotlivých pacientů a po stanovení melatoninového profilu jsem tyto hodnoty porovnávala s celkovou 24 hodinovou produkcí a s maximální naměřenou hodnotou melatoninu u jednotlivých pacientů. Pouze některé z těchto výsledků byly publikovány, ostatní výsledky pro malý počet a jeho nehomogenitu prozatím zveřejněny nebyly.

Obrázek 40 Sagitální řezy lidským mozkiem, zobrazení MR 3T.

A – Zdravá gl. pinealis; B – velká, jasně ohraničená pineální cysta; C – středně velká pineální cysta s dvěma oddíly; D – detail dvouoddílové cysty; E – středně velká pineální cysta před operací; F – stejný pacient po pinealektomii – zcela odstraněná gl. pinealis.

Tabulka 2 Velikost pineální cysty a melatoninová produkce.

Pohlaví	Věk	Velikost žlázy s cystou v mm ³	Operace ANO / NE	Celková suma produkce melatoninu pg /ml plazmy / 24 hod před operací	Celková suma produkce melatoninu pg /ml plazmy / 24 hod po operaci	Maximální naměřená hodnota melatoninu pg / ml plazmy před operací	Maximální naměřená hodnota melatoninu pg / ml plazmy po operaci
F	21	1565	NE	1164	-	154	-
F	22	925	ANO	3429	267	365	36
F	23	4475	ANO	1641	69	228	25
M	33	1041	ANO	1549	208	147	25
M	36	351	NE	581	-	60	-
F	40	717	NE	526	-	81	-
F	59	418	ANO	526	80	70	19

Velikost žlázy s cystou byla po proměření tří rozměrů na snímcích z MR vypočtena podle vzorce obecného elipsoidu ($\frac{4}{3} \pi abc$), kde a b c jsou poloosy rozměrů. Celková melatoninová produkce byla vypočtena jako suma získaných hodnot během 24 hodinového profilu s intervalem 2 hod. Seřazeno dle věku pacientů.

Připouštěná souhrnná chyba u vypočteného objemu pineální cysty (chyba zobrazení, měření a výpočtu) 0,2 – 2,4 % objemu. Možná chyba při stanovení hladiny melatoninu v jednotlivých časových bodech +/- 0,3 – 3,1 pg/ml (dle specifikace použitého analyzačního kitu). Statistika vzhledem k malému počtu hodnot a jejich nehomogenosti nebyla provedena.

Diskuse:

Z publikovaných výsledků je patrné, že, kortizol byl postoperačně zvýšený. To lze částečně vysvětlit vlivem operace, a zároveň to odpovídá i výsledkům získaných v animálním modelu po 36 týdnech od operace (viz část B). Hladiny glukózy se nelišily před a postoperačně. To ovšem odpovídá přirozenému stravovacímu režimu a stavu bez diagnózy diabetes. Nevíme však, jak by vypadaly hodnoty po zátěžovém testu OGTT, který nebyl proveden.

Zdá se také, že výskyt subjektivních obtíží nesouvisí s velikostí pineální žlázy s cystou. V některých případech již i malá patologie byla provázána subjektivními potížemi (nejčastěji bolest hlavy). Tyto obtíže však nepocházely od počínajícího hydrocefalu, neboť u žádného ze sledovaných pacientů na MR snímcích nebyl patrný útlak akveduktu. Subjektivní obtíže po operaci většinou vymizely.

Postoperační ztráta systemického melatoninu je téměř úplná, avšak na normalizovaných grafech je patrné přibližné zachování cirkadiálního rytmu i přes zcela odstraněnou pineální žlázu. Nabízí se tedy vysvětlení, že za tyto nízké, ale rytmické oscilace odpovídá extrapineální produkce melatoninu.

Při volbě radikálního výkonu bychom však neměli opomíjet význam pineální žlázy jako biologického synchronizátoru periodických dějů v organismu a rozsáhlý význam hlavního pineálního hormonu - melatoninu. Melatoninová suplementace je dnes lékárensky již běžně dostupná, v některých státech (i v České republice) lze melatonin běžně volně koupit jako „potravinový doplněk“, tedy i bez receptu. O to více s podivem je, že tato substituce, která by měla být jako například u thyroideálních hormonů po totální thyreidektomii doživotní, není neurochirurgy po pinealektomii ani zmíněna a navržena a pojišťovny ji také nehradí. Pinealektomie provedená v animálních modelech naznačuje širokou škálu účinků melatoninové deplece. Na první pohled se může zdát, že u lidských pacientů po pinealektomii se melatoninová deplece nijak zvláště neprojevuje, to může být obecně způsobeno několika jevy. Především je stále významnější narušení přirozeného životního prostředí. Nepříznivé dopady působí na všechny živé organizmy a zejména na člověka žijícího v civilizovaných společnostech, které navozují závažné desynchronizační změny. Jejich důsledkem může být obecně nespavost, nárůst hmotnosti, kardiovaskulární změny, neplodnost, zvýšený výskyt psychických poruch a v neposlední řadě i zvýšení rizika vzniku a rozvoje závažného tumorového procesu. Tyto patologické stavy však zpětně ovlivňují celý systém a vedou tak k rozvoji bludného kruhu (circulus vitiosus) patofyziologických příčin a důsledků (jako je tomu například u aterosklerózy nebo diabetu). Další možnosti,

proč je obtížné zachytit příčinnou souvislost pinealektomie či obecně dlouhodobého nedostatku melatoninu a nějakého patologického stavu, tkví v tom, že melatonin má přes své široké pole dlouhodobých efektů jen relativně malý okamžitý dopad. To znamená ještě obtížnější diagnostiku potenciálních důsledků deplece melatoninu. Další příčinou, proč je obtížné v klinické praxi zachytit potenciální důsledky, je i dnes značná izolovanost lékařských oborů. Jak ovšem víme, tělo funguje i po fyziologické stránce zcela integrálně a tak malá změna v jednom systému může případně zhoršit funkci jiných systémů. V neposlední řadě se na obtížné identifikaci potenciálních důsledků může podílet i neustále se obecně zhoršující zdravotní stav celosvětové populace a s tím stoupající nároky na lékařské vyšetření a s tím i spojené zvýšené finanční a sociální náklady. V důsledku toho se často řeší jen nejzávažnější patologické stavy a ty méně závažné se často pomíjejí. Tato postreseckní absence melatoninu však může při dlouhodobém nedostatku přinášet mnoho dalších různých poškození a patologických stavů. Vyplývá to z řady studií na animálních modelech i z některých publikací z humánní kliniky, jako příklad potenciálního poškození v důsledku nízkých nebo snížených hladin melatoninu uvádím tabulku z připravované publikace (viz Tabulka 3).

Tabulka 3

Potential pathophysiological changes associated with altered melatonin levels / production.

targeted system	specific group	change of melatonin levels or production	potential pathophysiological contexts	reference
sleep		decrease of melatonin levels	pathology of sleep (insomnia, somnolence) and sleep phases	(Richardson, 2005)
			modulatory effect on standard measures of sleep	(Slawik et al., 2016)
		melatonin supplementation	improves sleep	(Kurdi and Muthukalai, 2016)
metabolism	young (0-20 years), and later indistinct	low levels at night	strongly negative correlate with weight gain and body size	(Waldhauser et al., 1988)
		chronic sleep deprivation – decrease melatonin levels	increased food intake, subsequent fatty tissue growth and obesity	(Cizza et al., 2011)
		thyroid gland - inhibitory action of melatonin on the thyroid growth and function – low levels of melatonin	higher oxidative stress with possible consequences - Graves-Basedov' disease, or goiter formation or thyroid cancer	(Karbownik and Lewinski, 2003)
		decrease of melatonin levels	lead to increased the volume of food intake; increase C-peptide	(Starka et al., 2008)
		administration of melatonin	potential therapeutic effect in diabetes-related disorders: saccharide metabolism, disordered lipid, particularly cholesterol	(Andersson and Sandler, 2001), (Klepac et al., 2006), (Nishida, 2005), (Sudnikovich et al., 2007), (Yavuz et al., 2003)
calcium metabolism		pineal lesion – low levels of melatonin	idiopathic scoliosis, disorder ossification, osteoporosis	(Day et al., 2007), (Wai et al., 2014)

hypothalamo hypophyseal system	patients with Cushing's disease as well as with major depressive disorder	low levels of nocturnal serum melatonin and consequently little inhibited increased of corticotropin-releasing factor (CRF); the mechanism may be related to increased (CRF)	stimulation of hypothalamo-hypophyso-adrenal axis – higher levels of CRF	(Wetterberg, 1983)
	during fetal and perinatal life	change of melatonin signal and melatonin receptors expression	pathophysiology of developing gonadotrophic axis	(Hazlerigg, 2001)
sexual, gonadal		low or high levels of melatonin	modulation of gonadotropin-releasing hormone secretion from the median eminence and its role in the timing of puberty	(Olcese, 1995)
	teenage	tumor of pineal gland - high levels of melatonin	precocious puberty	(LeBaron, 1972)
		clear correlation between melatonin and gonadotropins and/or sexual steroids; (Indirectly interfere with gonadal function indirectly - through an effect on secretion of gonadotropin and / or gonadotrophin releasing hormone. Directly - melatonin can be synthesized in the gonads too.)	sexual maturation, ovulation or menopause; abnormal levels of melatonin in the blood are associated with several disorders of the hypothalamus-pituitary-gonads axis activity, i.e., precocious or delayed pubertas, hypogonadotrophic or hypergonadotrophic hypogonadism or amenorrhoea;	(Boczek-Leszczczyk and Juszcak, 2007)
pregnancy		absence of maternal melatonin synchronization signal	neurobehavioral deficits in offspring	(Reiter et al., 2014a)
	women	melatonin deficit – low levels	essential problems in pregnancy (fetal and maternal physiology: fetal maturation, placental and fetal ischemia and parturition), difficulties in fetus delivery	(Reiter et al., 2014b)
aging	women	without melatonin	worsening menopausal symptoms	(Gursoy et al., 2015)
immune		permanent light together with pinealectomy or prolonged total time of exposure to light (shift work) - melatonin deficit – low levels	increased carcinogenesis, incidence of breast cancer	(Anisimov, 2002), (Anisimov, 2003), (Anisimov et al., 2014)
		natural or substituted melatonin levels	antiinflammatory	(Brzozowska et al., 2014)
			immunomodulatory	(Plytycz and Seljelid, 1997)
			protects endothelial cells against hypoxia	(Matejovska et al., 2008)
			tumor-protective effects, and can help slow down ageing	(Cardinali et al., 2008)
			antioxidant	(Brzozowska et al., 2014), (Munoz-Hoyos et al., 1998)
psychiatric		melatonin deficit – low levels	depression	(Strunecká and Patočka, 2005)
	women with premenstual dysphoria	malsynchronization circadian rhythm	occurrence of depressive symptoms in luteal phase	(Parry et al., 1990) (Parry et al., 2011)
		day-night rhythm disturbance	potential correlation with psychiatric disorders	(Brown, 1992)
		smaller pineal gland volume	potential correlation with schizophrenia	(Findikli et al., 2015)
		melatonin deficit – lower levels	potential correlation with bipolar mood disorders	(Lam et al., 1990)
	Alzheimer's disease patients	melatonin supplementation	slows down the progression of cognitive impairment	(Lin et al., 2013)
	in older age	decline melatonin production	may be corresponsable for the development of dementia	(Skaper et al., 1999)
		melatonin supplementation	may help prevent neurological diseases through maintaining the integrity of blood brain barrier	(Liu et al., 2017)
		administration of melatonin at normal secretion	improved cognitive abilities of patients	(Jansen et al., 2006)
	melatonin	potential anxiolytic effect	(Bustamante-Garcia et al., 2014)	

Z předcházející Tabulky 3 i z literární rešerše (viz Teoretická část) je zřejmý význam funkční gl. pinealis. Z této situace lze obecně soudit, že dlouhodobá deplece melatoninu či provedení pinealektomie bez substituce ohrožuje pacienta spíše zhoršením nebo rozvojem

nějakého patologického stavu, pro který je konkrétní jedinec zdravotně, geneticky či sociálně predisponován, než rozvojem nějaké „nové“ choroby.

V případě totální pinealektomie pravděpodobně dochází k řadě dlouhodobých, latentních, zprvu subklinických změn, které se mohou projevit až po čase, ale které ošetřující lékař nemusí spojovat s podstoupenou pinealektomií, nebo obecně nízkou hladinou melatoninu. Existuje farmakologická substituce hlavního pineálního hormonu – melatoninu, ten však není pojišťovnou hrazený, je drahý a není lékaři ani po pinealektomii standardně předepisován ani doporučován. Tento přístup by mohl být pro pacienty nepříznivý.

Bylo by třeba uvažovat v širších souvislostech a pacientům s provedenou pinealektomií rozhodně alespoň doporučovat melatoninovou substituci a zaměřit na ně také následně i větší dlouhodobou klinickou pozornost. Samozřejmostí by měla být i dlouhodobá dispenzarizace u endokrinologa a praktického lékaře. Věřím, že by trvalá melatoninová substituce, pacientům do budoucna přinesla vyšší kvalitu života a méně onemocnění.

V budoucnu by tento soubor dat od pacientů s pineální cystou mohl být rozšířen a výsledky využity také jako pomocné rozhodovací kritérium při volbě mezi konzervativním a radikálním přístupem při diagnóze pineální cista. Je třeba uvážit i alternativní postup chirurgické intervence a s tímto vědomím volit mezi totální ablací, parciální resekcí, trvalým otevřením stěny cysty a eventuálně pouhou punkcí a odsátím obsahu. Tyto alternativní zákroky by zřejmě (alespoň částečně) zachovaly přirozenou sekreci melatoninu.

Závěr:

Pinealektomie způsobila očekávané značné snížení produkce melatoninu. Reziduální nízké hodnoty po pinealektomii jsou pravděpodobně následkem extrapineální produkce. Denní glukózový profil se před a po operaci u jednotlivých pacientů nelišil. Kortizol byl po operaci zvýšený.

D Intracerebroventrikulární (i.c.v.) aplikace – v experimentu:

Intracerebroventrikulární (i.c.v.) aplikace slouží v experimentu k **akutnímu** nebo **chronickému** podávání látek do mozkových komor. Je možné pomocí i.c.v. kanyly získat i vzorky mozkomíšního moku (například mikrodialyzáty).

Akutní aplikace spočívá v jednorázové či opakované aplikaci látek přímo do mozkomíšního moku zpravidla postranní mozkové komory, v průběhu akutního experimentu. Tato akutní technika může mít několik rozdílných variant. Aplikace látky přímo do cílového místa u anestezovaného zvířete fixovaného ve stereotaktickém přístroji (viz níže). Další variantou je operační implantace a fixace vodící kanyly k lebce zvířete před aplikací. Skrz tuto kanylu je kdykoli poté možno látku aplikovat jednorázově i opakovaně při plném vědomí zvířete.

Chronická aplikace slouží zejména k přesnému kontinuálnímu přívodu látky do cílového místa. Zpravidla využíváme komerční osmotické minipumpy. Při i.c.v. chronické kontinuální aplikaci tuto osmotickou minipumpu spojíme s pevnou (zpravidla kovovou) kanylou, kterou zavedeme do cílového místa mozkového komorového systému (zpravidla do postranní komory) a pevně fixujeme k lebce. Osmotické minipumpy jsou schopné (dle parametrů výrobce) infundovat látku kontinuálně po různou dobu, dle typu 1 až 6 týdnů. Pro správnou funkci pumpy je nutné umístění na vhodné místo, kde k pumpě ze všech stran volně přiléhá měkká tkáň a nikoli kost. Pumpu je možné umístit podkožně, nebo do břišní dutiny.

Všechny tyto techniky v naší laboratoři běžně provádím.

Cíl:

Ověřit, zda intracerebroventrikulární aplikace látek je experimentální chirurgická technika vhodná pro výzkum centrálního vlivu aplikovaných látek.

Hypotéza:

Dlouhodobé či akutní i.c.v. podávání látky v experimentu způsobí chronické či akutní změny ve fyziologických i behaviorálních odpovědích na konkrétní testované podněty.

Metodiky:

Jako způsob aplikace látek do CNS používáme i.c.v. kanylaci.

K měření fyziologických odpovědí oběhového systému používáme nepřímé a přímé měření kardiovaskulárních parametrů. Nepřímé tonometrické měření provádíme pletysmograficky na ocase. Přesnější je přímé měření, které vyžaduje chirurgický zákrok - kanylaci (arteria carotis) nebo implantaci telemetrické sondy (do břišní aorty). Provádíme též ověření polohy a funkčnosti i.c.v. kanyly: V případě akutního experimentu jsou na konci měření podány i.c.v. jednorázově 2 µl 3M roztoku NaCl, což způsobí značné zvýšení krevního tlaku i srdeční frekvence. Polohu i.c.v. kanyly je možno ověřit též histologicky na kryomikrotomovém řezu tkáně mozku v oblasti zavedené kanyly. Polohu implantované i.c.v. kanyly je možno lokalizovat vstříknutím malého množství inkoustové barvy skrz zavedenou i.c.v. kanylu (na následně provedeném nativním příčném řezu mozku kadáveru jsou probarveny komory nikoli však okolní intaktní tkáň). V neposlední řadě je vlastní kontrolou polohy i.c.v. kanyly změna reakcí oběhového systému po aplikaci testované látky.

Určitou kontrolou polohy a funkce cévních kanyl či telemetrické sondy je také vlastní záznam oběhových reakcí.

Podrobnější popis jednotlivých postupů viz příloha – publikace: (Rezacova et al., 2019), (Rezacova et al., 2022), (Vaneckova et al., 2016).

Všechny tyto postupy byly prováděny na animálním modelu potkan.

Popis všech užitých chirurgických či měřicích technik viz níže dle následujících rozdělení:

a) Intracerebroventrikulární aplikace

b) Měření krevního tlaku a dalších parametrů oběhového systému

ba) Nepřímé - Tonometrie

bb) Přímé

bba) Kanylace cév

bbb) Telemetrie

Užité chirurgické techniky:

a) Intracerebroventrikulární aplikace

K tomuto zákroku využívám stereotaktický atlas mozku potkana a stereotaktický aparát, který umožňuje přesné zaměření struktury ve 3D.

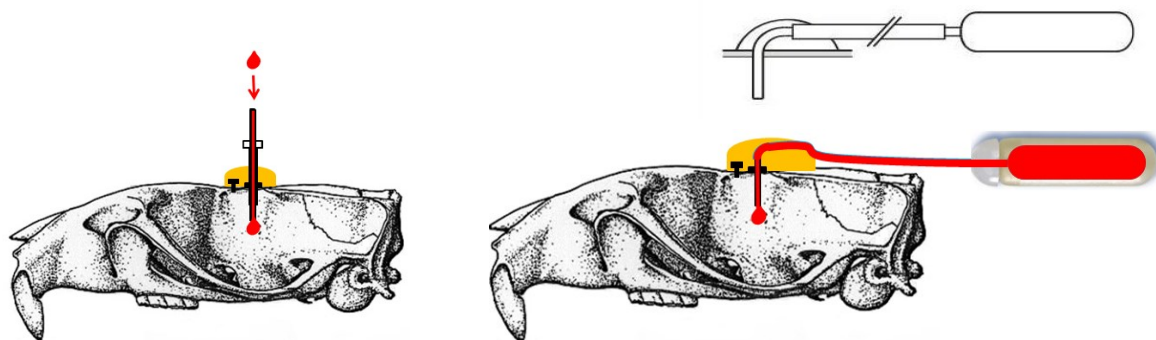
Stereotaktický atlas mozku je soubor zvětšených snímků nativních řezů mozku a/nebo soubor schematicky překreslených nativních řezů se standardní vzdáleností mezi

jednotlivými řezy s paralelně umístěnými měřítky. Zobrazuje polohu jednotlivých struktur a mozkových jader vůči vnějším orientačním bodům na lebce zvířete. Tak je možno navrhnout nejvhodnější cestu k cílové struktuře. Nejčastěji používaný stereotaktický atlas pro potkany: (Paxinos and Watson, 1996), (viz obr 43a).

Stereotaktický aparát (stereotax) je zařízení, které se používá při studiu mozku a jeho struktur a funkcí. Umožňuje přesně a reprodukovatelně zafixovat hlavu zvířete a zaměřit cílovou strukturu zpravidla uvnitř lebky. V základním uspořádání se skládá z pevné podložky (na níž zvíře leží), kovového rámu (k němuž se upevňuje hlava zvířete pomocí aurikulárních hrotů a držáků na tlamku) a mobilního ramene s mikroposuvy držáku sloužící k přesnému zavedení kanyl, sond, elektrod, mikroinjektoru a pod.. Stereotaktický aparát je velikostí určen pro malá laboratorní zvířata do velikosti morčete. Pro králíka je nutný větší. V základní sadě by měly být různé druhy výměnných aurikulárních hrotů a tlamkových (nebo řezákových) držáků pro myš, potkana, křečka a ev. morče. K rozšířené sadě patří i maska k inhalační anestézii. Dále je možno individuálně dokoupit další vybavení (integrovaná vrtačka, elektronické zaměřovací zařízení a pod.).

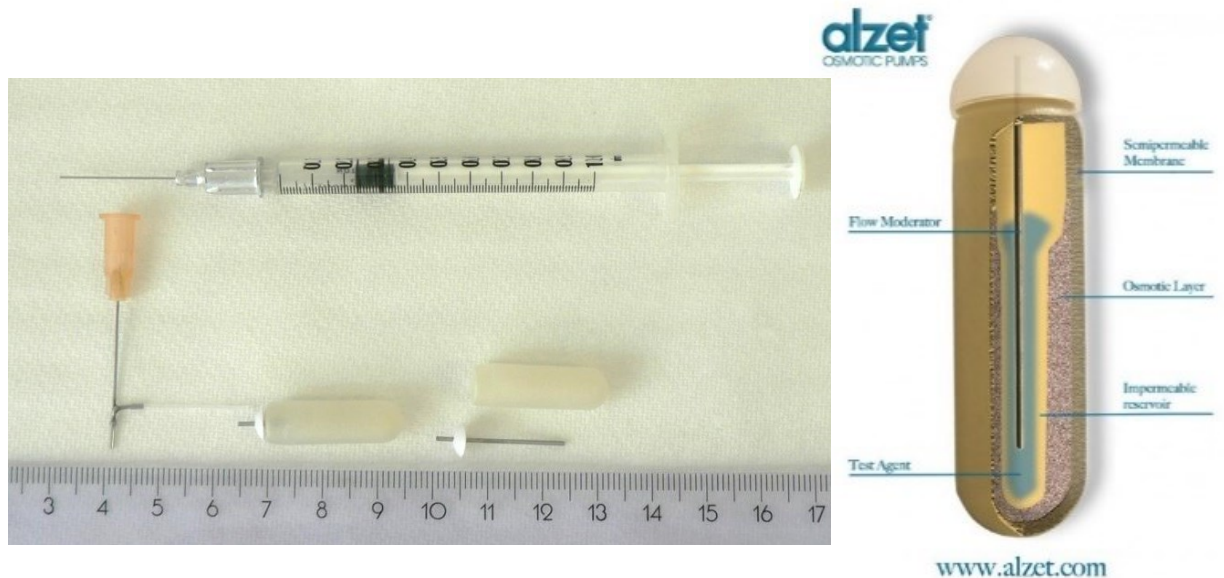
Obrázek 41a, b

Schematické znázornění variant i.c.v. kanyly - vlevo kanyla akutní (volná, jednoduchá); vpravo i.c.v. kanyla chronická spojená s osmotickou minipumpou (nahore ve schématu). Oba typy kanyl jsou k lebce ukotveny šroubkovou retencí a fixovány v samopolymerující pryskyřici Duracrol (žlutě), aplikovaná látka červeně.

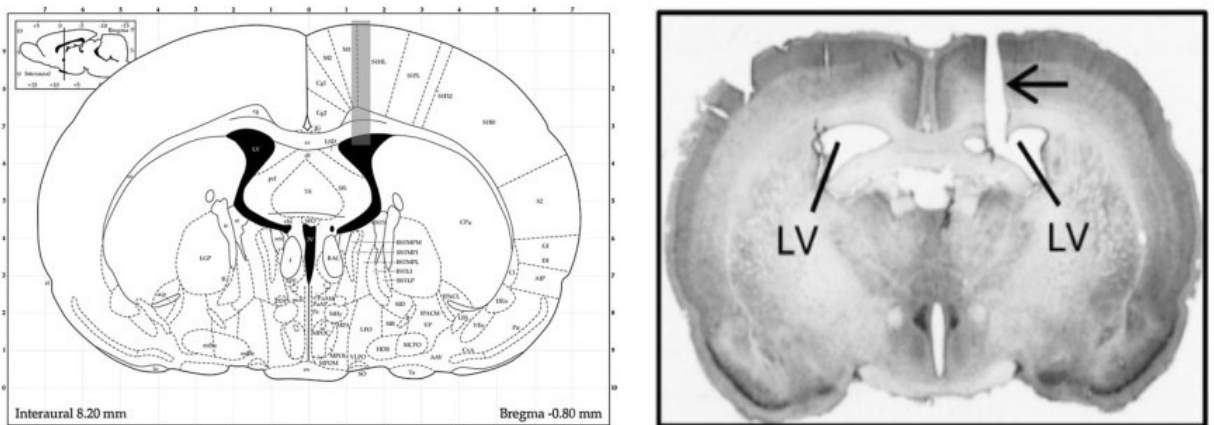


Obrázek 42a, b

Pohled na osmotickou minipumpu s příslušenstvím - shora a zleva: injekční stříkačka se speciální plnicí jehlou, vlastnoručně vyrobená i.c.v. kanyla s napojenou PE trubičkou a stereotaktickým fixačním trnem z přiletované injekční jehly, osmotická minipumpa (model 2004 = 200 μ l, 4 týdny), osmotická minipumpa před naplněním s vnitřním brčkovým trnem; schéma osmotické minipumpy firmy Alzet.

**Obrázek 43a, b**

Snímek ze stereotaktického atlasu Paxinos and Watson (Paxinos and Watson, 2006) pro potkany s naznačenou polohou zavedené i.c.v. kanyly (šedě); demonstrace histologického způsobu následné kontroly umístění kanyly. (upraveno)



Chirurgický postup

Po výše popsané přípravě všech potřeb prostředí a zvířat uvedeme zvíře do celkové anestézie (většinou injekční (ketamin + xylazin) nebo inhalační (izofluran)) a vystříháme operační pole. Při užití inhalační anestézie je zapotřebí speciální nástavec s dýchací maskou, která ale velmi často prostorově komplikuje manipulaci na hlavě zvířete, nebo můžeme zvíře intubovat. Dále během celé operace průběžně sledujeme hloubku anestézie, dýchání a oxygenaci krve.

Umístíme anestezované zvíře do připraveného stereotaktického aparátu. Dbáme na správné a přesné umístění aurikulárních hrotů do zevních zvukovodů a zafixování horních řezáků tak, aby byla rovina temenních kostí přibližně rovnoběžná vůči základně stereotaxu. Povytáhneme jazyk a tělo srovnáme, abychom zajistili co možná nejlepší ventilaci. Oči pokryjeme mastí a překryjeme vlhkou gázou. Dezinfikujeme operační pole. Provedeme řez (žiletkou nebo skalpelem) na temeni hlavy nejčastěji v mediální rovině kůži, vazivem až k periostu v délce zpravidla 2 až 3 cm. Je-li třeba, stavíme krvácení přitlakem tamponu nebo kauterem. Tupě odpreparujeme kůži v dostatečné šířce od periostu a svalů. Můžeme lokálně aplikovat prokainové 2% anestetikum cca 0,5 ml. Nasadíme jemný pérový rozvěraček a odstraníme periost v místě budoucího implantátu. Znovu sušíme. Nyní ověříme a doladíme přesné nastavení hlavy. Body bregma (bod na lebce – dotyk koronárního a sagitálního švu) a lambda (okcipitálně od dotyku sagitálního a lambdoidního švu) musí být v mediální pozici a stejně vysoko vůči základně stereotaxu (Paxinos et al., 1985). Přesně odměříme místo zamýšleného trepanačního návrtnu, který provedeme zubní vrtačkou s přiměřeně velkým vrtákem. (V případě pinealektomie ze zkušenosti odhadneme místo okénkové trepanace, kterou provedeme okružní pilkou nad cílovým místem podle plánovaného zákroku. Okénkovou preparaci můžeme ponechat otevřenou nebo překrýt vhodným materiálem nebo můžeme vrátit vyjmutou část kosti nazpět do původní pozice.) Vrtáme za vlhka. Sušíme. Zhotovujeme-li trvalý implantát, uděláme zároveň návrty nebo řezy pro umístění retenčních elementů. Provedeme plánovaný zákrok - zavedení trvalých kanyl (nebo v jiných případech elektrod, lokální injekční inaktivaci struktury, ektomie a pod.). Při zhotovování implantátu ze samopolymerující pryskyřice dbáme, aby byl co nejmenší, neměl ostré hrany a aby byl přitom pevně fixován k lebce (šroubky nebo suboseálními kotvičkami). Při jeho vytváření hlídáme, aby se volné částičky materiálu a pryskyřičná iniciátorová tekutina nedostaly do tkáně. Ránu vypláchneme fyziologickým roztokem. Vyjmeme rozvěraček a ránu vyčistíme, vysušíme a lehce dezinfikujeme. Kůži s podkožím adaptujeme. Pokud je třeba, odstříhneme přebytečnou kůži kolem implantátu

a provedeme suturu nejlépe jednoduchými uzlovými stehy. Vymačkáme ze sutury volnou tekutinu a zkontrolujeme adaptaci okrajů, případně ji upravíme. Očistíme a dezinfikujeme operační pole a ránu překryjeme antiseptickou masťou. Zvíře uložíme do připraveného boxu do probuzení a lehce překryjeme tělo pilinami, abychom zabránili ztrátám tepla.

Fotodokumentace implantace i.c.v. kanyly spojené s osmotickou minipumpou u dlouhodobě přežívajícího potkana

Obrázek 44

Autorka při implantaci i.c.v. kanyly.



Obrázek 45a, b, c

pohled na užívanou anesteziologickou soustavu; potkana umístěného do plynového boxu pro úvod inhalační anestezie; stereotaktický aparát s dvěma rameny (měřicím – vpravo a zaváděcím – vlevo).



Obrázek 46

Celkový pohled na přístrojové, nástrojové a materiálové vybavení potřebné a používané k implantaci i.c.v. kanyl.



Obrázek 47a, b, c

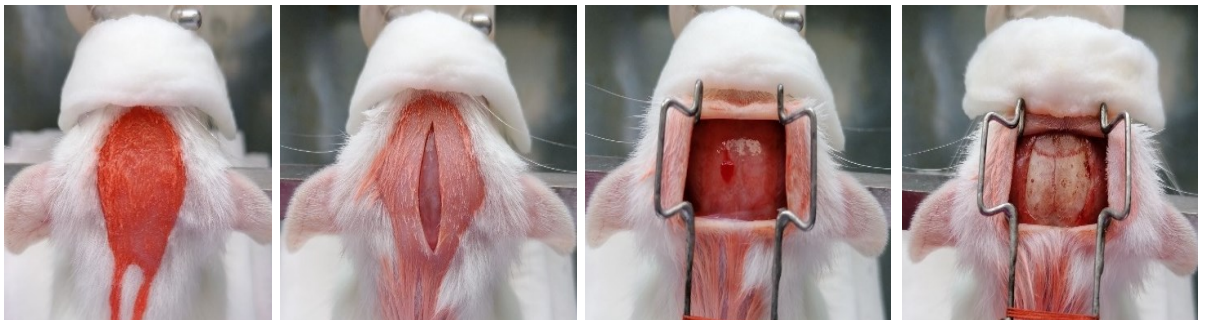
Postup při fixaci hlavy anestezovaného potkana do stereotaktického aparátu s inhalační maskou: nejprve zachytíme horní řezáky; dále zastavíme levý; následně pravý aurikulární trn a vyrovnáme lebku do střední linie stereotaktického aparátu.

**Obrázek 48a, b, c**

Pohled z boku na zafixovanou hlavu potkana; oči chráněny před vysycháním, světlem i mechanickým zraněním oční mastí; překryty přeloženým vlhčeným bunovým čtvercem.

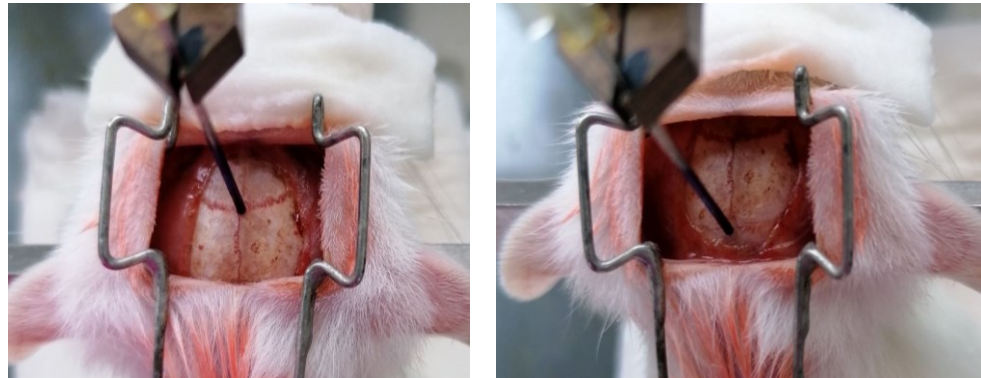
**Obrázek 49a, b, c, d**

Desinfekce operačního pole; řez kůží a odhalení periostu; vložení kožního rozvěráčku; odstranění periostu.

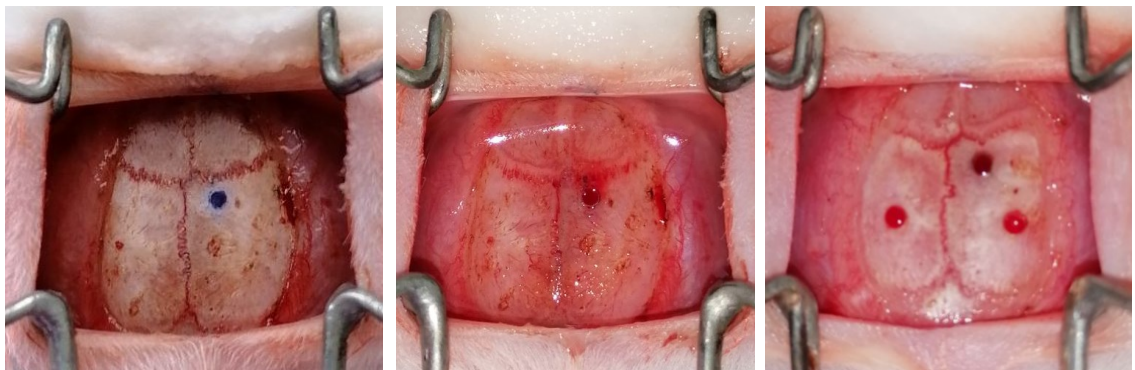


Obrázek 50a, b

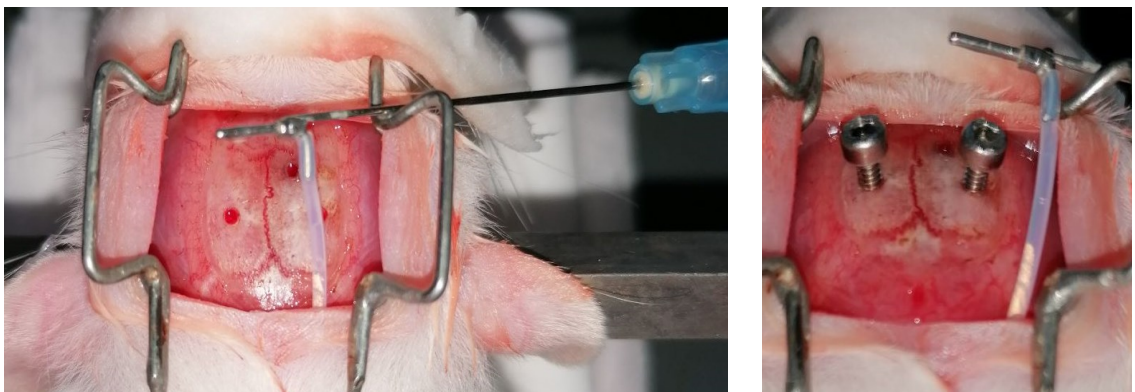
Vyrovnění fixované lebky v podélném směru podle bodů Bregma; a Lambda.

**Obrázek 51a, b**

Naznačená pozice budoucího návrtu pro i.c.v. kanylu; provedený návrt lebky v místě budoucí i.c.v. kanyly; dva další návrtů pro retenční šroubky.

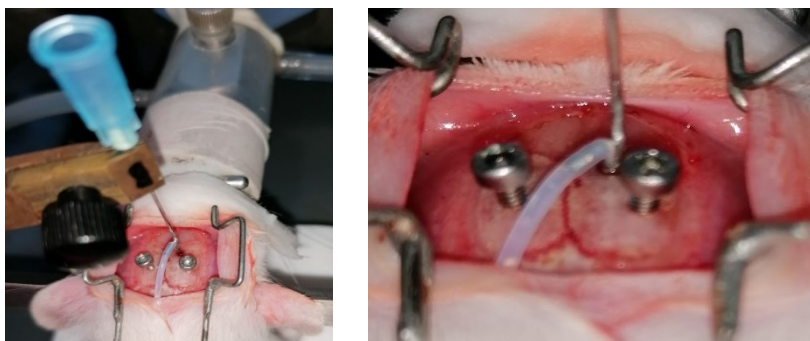
**Obrázek 52a, b**

Umístění osmotické minipumpy do podkoží v oblasti lopatek, do operačního pole vyčnívá jen část PE trubičky a i.c.v. kanyla s jehlovým implantačním trnem; zakotvení retenčních šroubků do návrtů.

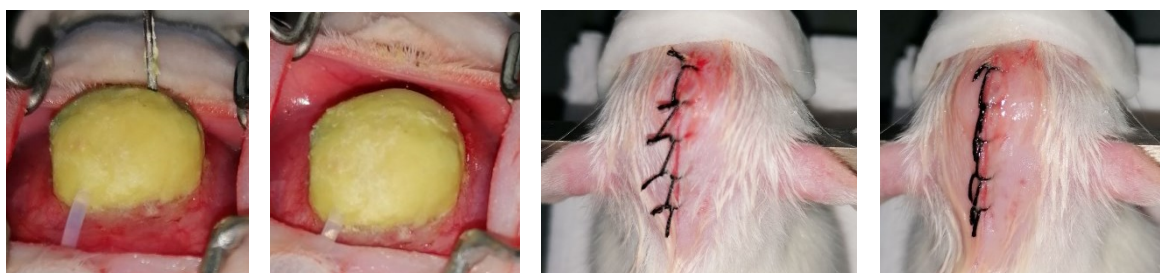


Obrázek 53a, b

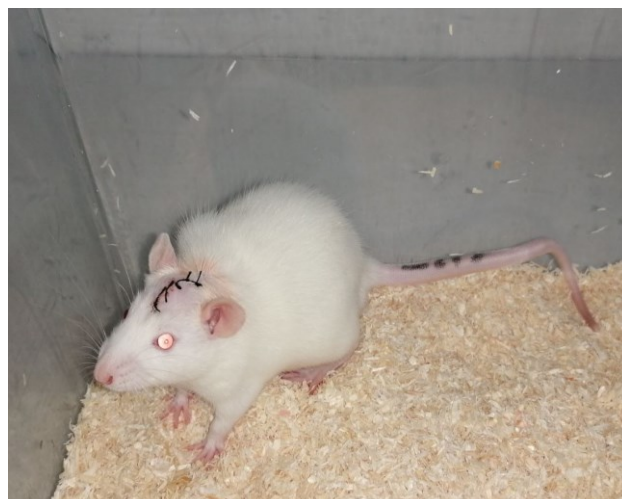
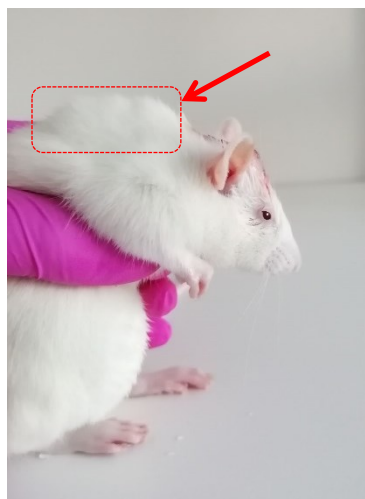
Jehlový implantační trn upevněný v ramenu stereotaktického aparátu a i.c.v. kanyla nasazená do i.c.v. návrtu v lebce; i.c.v. kanyla zavedená do správné konečné hloubky.

**Obrázek 54a, b, c, d**

Fixace i.c.v. kanyly a retenčních šroubků ve správné pozici samopolymérizující pryskyřicí Duracrol a vytvoření pryskyřičné korunky; po odstranění jehlového implantačního trnu (z finálního implantátu kaudálně vyčnívá pouze PE trubička vedoucí do podkoží k připojené osmotické minipumpě); zašitá operační rána v jedné kožní vrstvě jednotlivými stehy; následné překrytí sutury antiseptickou mastí.

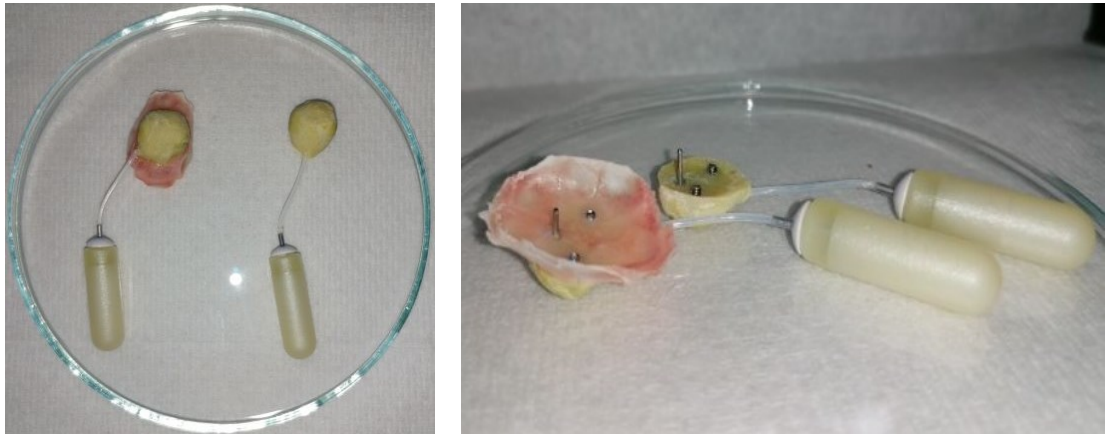
**Obrázek 55a, b**

Operované zvíře 5 minut po uvolnění ze stereotaktického aparátu (na hřbetu v podkoží jasně patrná implantovaná osmotická minipumpa označena červenou šipkou a rámečkem); totéž zvíře po 4 hodinách od operace.

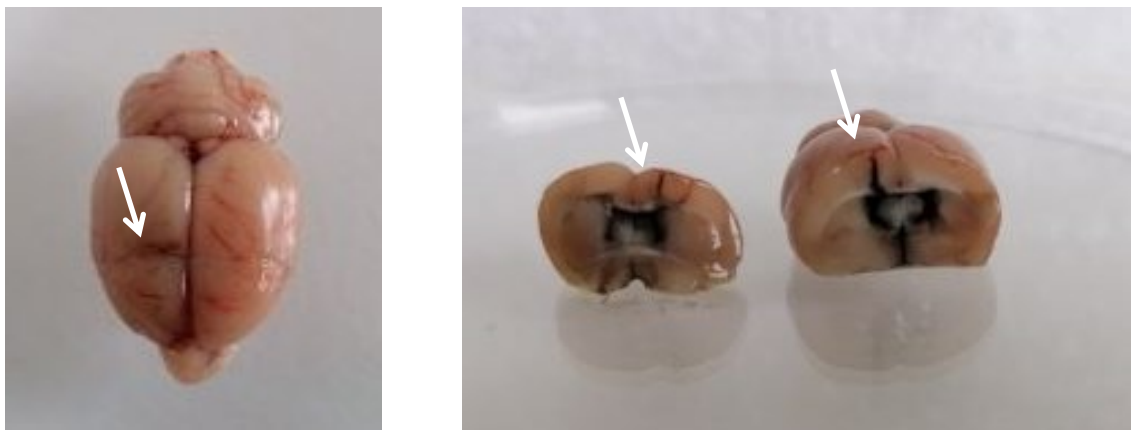


Obrázek 56a, b

Post mortem vyjmutý implantát (vlevo a dole i s kusem kalvy, ke kterému je připevněn retenčními šroubky). Šroubky procházejí kostí, ale nevyčnívají do dutiny lební!

**Obrázek 57a, b**

Post mortem kontrola umístění a průchodnosti i.c.v. kanyly (místo vstupu kanyly naznačeno bílou šipkou). Vypreparovaný mozek je napříč v místě průchodu i.c.v. kanyly rozříznut žiletkou (pokud je kanyla dobře umístěna a je průchodná, komorový systém je obarven).

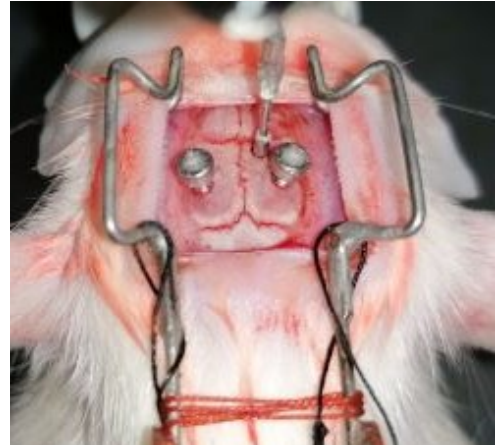


Fotodokumentace implantace přímé i.c.v. kanyly u dlouhodobě přežívajícího potkana

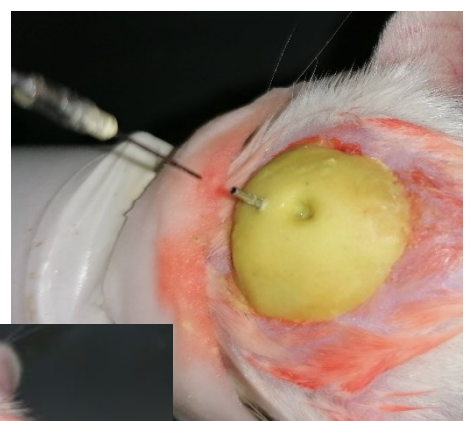
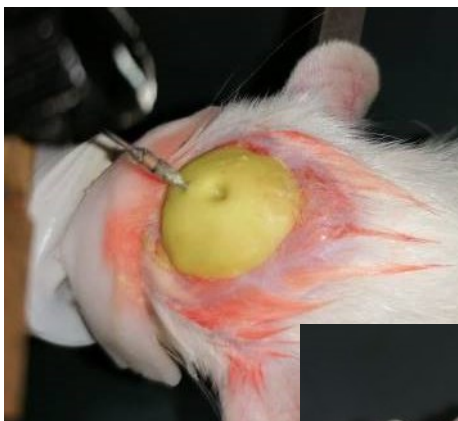
Chirurgický postup se až na vlastní kanylu a způsob uzavření operační rány více méně nijak neliší od postupu předchozího.

Obrázek 58a, b

Zakotvené retenční šroubky do připravených návrťů, patrný též návrť pro vodící i.c.v. kanylu; vodící kanyla zavedená do trepanačního návrťu.

**Obrázek 59a, b, c**

Duracrolová čepička fixující polohu vodící kanyly; vysunutí implantačního držáku z vodící kanyly; vodící kanyla uzavřená dočasným drátěným mandrenem.



b) Měření krevního tlaku a dalších parametrů oběhového systému**ba) Nepřímé - Tonometrie****bb) Přímé****bba) Kanylace cév****bbb) Telemetrie****Techniky používané v experimentu k měření krevního tlaku**

V naší laboratoři se již dlouhou řadu let při výzkumu hypertenze využívají k měření fyziologických parametrů oběhového systému (např. systolického a diastolického tlaku, srdeční frekvence a dalších hodnot) dva odlišné přístupy. Technika **nepřímá** – tedy neinvazivní měření TK plethysmografickou metodou na ocase a technika **přímá** – přesnější avšak vyžadující chirurgický zákrok (kanylaci cév nebo implantaci sondy).

Technika **nepřímá** je obdobou humánního tonometru či plethysmografu. Umisťuje se na kořen ocasu potkana. Záznamová soustava (zařízení firmy HATTERAS, USA viz Obrázek 60) se skládá ze čtyř měřicích pozic. Temné komůrky, ve kterých se zvířata cítí bezpečně, jsou vyhřívané a na zadním konci mají malý otvor pro ocásek, což umožňuje kontrolovat funkci měřicího kroužku který se během cca 20ti minutového sezení opakovaně nafukuje a měří hodnoty cca 10 x, vždy po dobu půl až jedné minuty. V intervalech mezi měřeními je zvíře stále v klidu bez vyrušování a manipulace.

Technika **přímá** má stejně jako i.c.v. aplikace dvě základní varianty: krátkodobou akutní a dlouhodobou chronickou.

Krátkodobá akutní varianta spočívá v zavedení kanyl do arteria carotis a vena jugularis. Arteriální kanyla slouží k měření krevního tlaku a srdeční frekvence (je zavedena proti směru toku krve, tedy směrem k srdci). Venózní kanyla slouží k aplikaci farmak do krevního oběhu (je zavedena po přirozeném směru toku krve). Druhý den po kanylaci je pokusný potkan umístěn do měřicí komůrky a jeho arteriální kanyla je napojena na speciální převodní systém sloužící k přesnému kontinuálnímu záznamu oběhových parametrů. Měřené parametry jsou v reálném čase převedeny do elektronické podoby a následně hodnoceny a statisticky zpracovány. Venózní kanyla slouží k podávání farmak. Pokus trvá dle charakteru pokusu standardně 1,5 až 3 hodiny. Po ukončení měření je pokusné zvíře humánně utraceno předávkováním anestetik.

Dlouhodobá chronická varianta spočívá v implantaci telemetrické sondy a následném dlouhodobém měření oběhových parametrů. Telemetrickou sondu implantujeme nejčastěji

do peritoneální dutiny. Telemetrické sondy se používají k záznamu nejrůznějších biopotenciálů – krevního tlaku, EKG, EEG, glukosy, tělesné teploty, aktivity apod..

Na našem oddělení se častěji používá sonda pro měření TK, tepové frekvence, aktivity a teploty na jejímž konci je napojena kanyla. Kanyla se zpravidla zavádí do břišní aorty nad ileofemorální bifurkaci. Stěna cévy se zavedenou kanylou je po implantaci utěsněna tkáňovým histoakrylovým lepidlem. Sonda je přišita k břišní stěně, aby se bránilo jejímu většímu pohybu v břišní dutině. Jako prevence infekčních komplikací jsou podána krátkodobá, zpravidla penicilinová antibiotika. Telemetrická sonda vysílá informace speciální podložce, na které je umístěna chovná klec, a tato podložka je spojena s počítačem. Délka záznamu je volitelná či sekvenční. Omezením je pouze životnost baterie v telemetrické sondě (zpravidla kolem 4 - 5 měsíců kontinuálního přenosu dat u sondy pro potkany). Telemetrickou sondu je možno zapnout či vypnout kdykoli, přes břišní stěnu silným magnetem.

ba) Nepřímé - Tonometrie

Obrázek 60a, b

Přístroj HATTERAS užívaný v naší laboratoři; foto při tonometrickém měření tlaku krve.



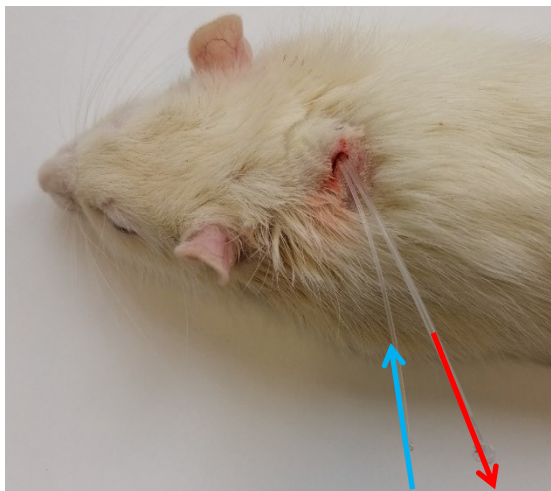
bb) Přímé

bba) Kanylace cév

Na našem oddělení se nejčastěji k měření parametrů oběhového systému v akutním pokusu používá kanyla umístěná do a.carotis jednostranně. K aplikaci látek v průběhu pokusu využíváme nejčastěji kanylovanou v. jugularis externa.

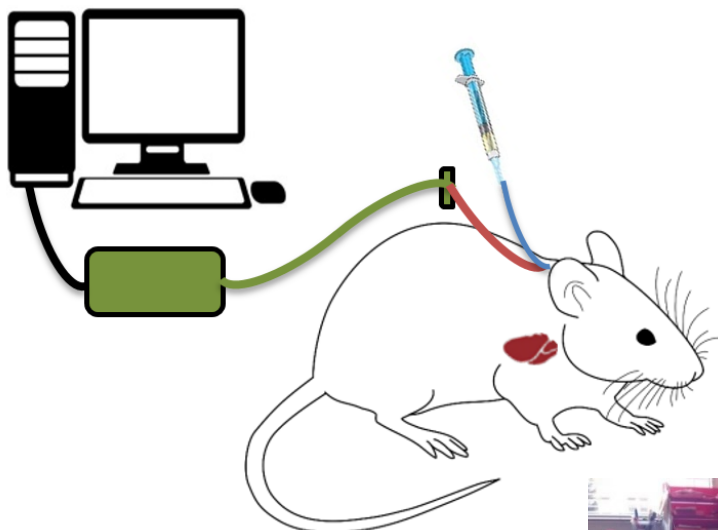
Obrázek 61

Potkan s implantovanými kanylami k přímému měření krevního tlaku (arteriální karotická měřicí kanyla - označena červenou šipkou a venózní jugulární aplikační kanyla - označena modrou šipkou).



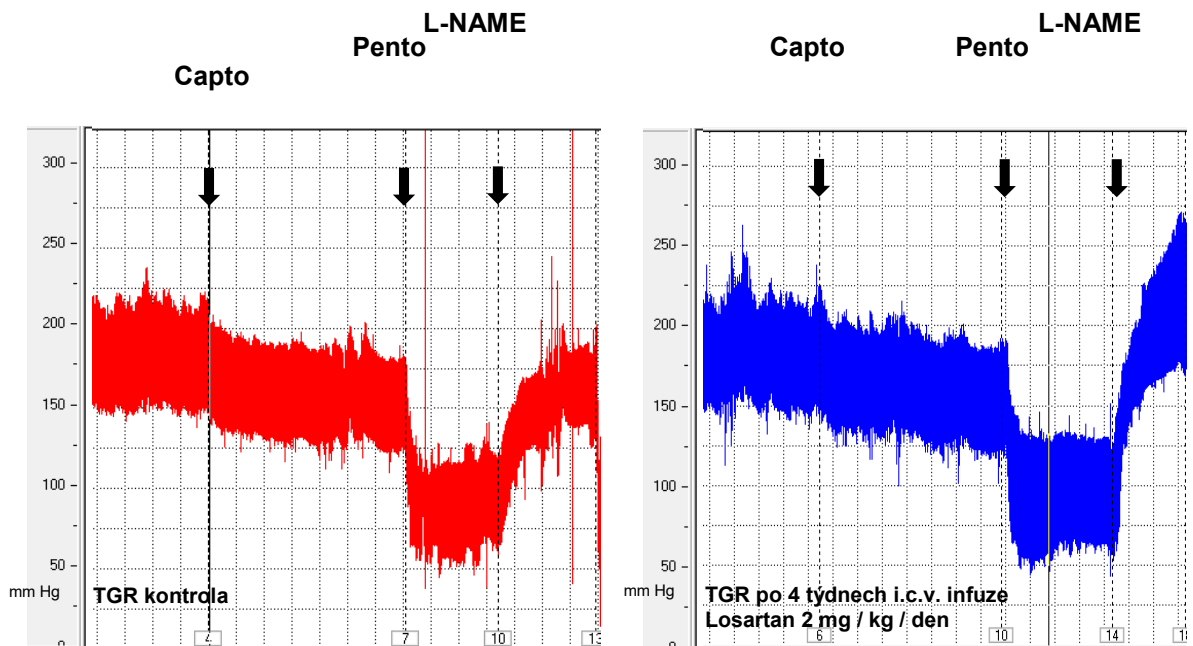
Obrázek 62a, b

Snímek z laboratoře při kontinuálním současném měření 4 zvířat; schema přímého kontinuálního měření a záznamu změn krevního tlaku a pulzu u kanylovaného zvířete (modře venózní kanyla, červeně arteriální kanyla, zeleně označeno detekční čidlo a převodník signálu připojený k počítači).



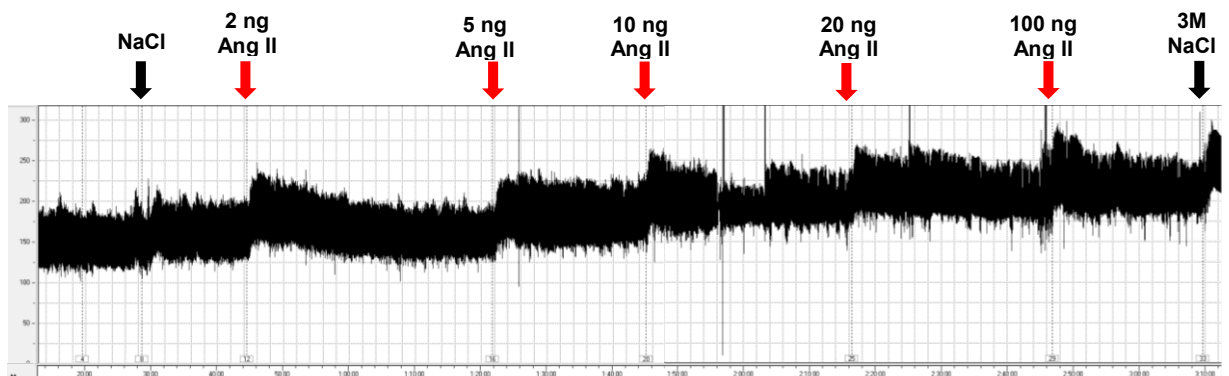
Obrázek 63

Ukázka záznamu z měření krevního tlaku u bdělých kanylovaných TGR potkanů a určení podílu renin-angiotenzinového systému (RAS) delta Captopril (Capto, 10 mg/kg), sympatického nervového systému (SNS) delta Pentolinium (Pento 5 mg/kg), a oxidu dusnatého (NO) delta L-NAME (L-NAME 30 mg/kg) na udržování krevního tlaku kontrolních TGR (vlevo) a TGR vystavených chronické blokádě angiotensinových receptorů losartanem podávaným i.c.v. osmotickou minipumpou 2 mg/kg/den (vpravo). Data z publikace Rezacova et al. (Rezacova et al., 2022).



Obrázek 64

Ukázka změn krevního tlaku u bdělého TGR potkana vyvolaných zvyšujícími se dávkami angiotenzinu II podávaného i.c.v..



Do postranní mozkové komory byl při měření postupně aplikován (vždy ve 2 μ l dávkách) roztok 0,9 M NaCl (k promytí kanyly a kontrole reakce na i.c.v. aplikaci), dále angiotenzin II ve vzrůstajících koncentracích 2, 5, 10, 20 a 100 ng. Jako kontrola polohy i.c.v. kanyly byl podán 3M roztok NaCl vyvolávající velký vzestup krevního tlaku. Data z publikace Rezacova et al. (Rezacova et al., 2019).

Chirurgický postup

Před operací si připravíme kanyly vhodné délky, tvrdosti a průměru. Vnější průměr kanyly by měl být jen nepatrně menší než je vnitřní průměr kanylované cévy. Venózní kanyly před operací naplníme koncentrovaným heparinovým roztokem až po ústí a na vnějším konci uzavřeme vhodnou zátkou nebo zatavíme. U arteriálních kanyl se ve vnější koncové části před zataveným koncem ponechává malá bublinka. Ta slouží ke kontrole zavedení a přispívá i k delší použitelnosti (průchodnosti) kanyly (pomaleji se tvoří případný trombus na zavedené části kanyly).

Zvíře uvedeme do zpravidla inhalační anestézie ve volném boxu. Následně anestezované zvíře lehce fixujeme v dorzální poloze a zajistíme kontinuální přísun anestetika dýchací maskou. Zvíře si zpravidla orientujeme čenichem směrem k sobě. Vystříháme a dezinfikujeme operační pole ve střední části ventrální strany krku ve vhodném rozsahu. Opatrně provedeme jemný nástřih kůže a řez nůžkami v mediální linii, abychom neporušili hlubší struktury. K rozevření operační rány je možné použít jemný pérový rozvěraček.

Kanylace a. carotis:

Jednostranně tupě paratracheálně ve vzdálenosti asi 0,5 – 1 cm preparujeme mezi svaly krku (m. sternocleidomastoideus a mm. pectorales), až uvidíme nervově cévní svazek. Opatrně oddělujeme jednotlivé struktury tupou preparací nejlépe anatomickou (zubní) pinzetou v délce asi 1 – 1,5 cm. Dbáme na to, abychom neporušili ani příliš nedráždili n. vagus, který jde přímo nebo v těsném sousedství karotické arterie. Pod očištěnou a tedy pružnou cévu podvlékneme dva podvazy, na nichž si připravíme jednoduché uzly, které ale zatím nedotahujeme. Kraniální podvaz posuneme kraniálněji (blíže k hlavě) a dotáhneme. Za kaudální podvaz, ještě blíže k srdci, naložíme na cévu jemnou cévní svorku. Arterii tahem za kraniální podvaz pozvedneme z hloubky a jemnými ostrými hrotnato-hrotnatými (očními) nůžkami z boku nebo ze shora prostříhneme malý otvor v úhlu 45 stupňů (na cévě se vytvoří V stříh). Připravenou kanylu jemně zasuneme skrz otvor do lumen cévy (směrem k srdci) v délce asi 1 cm až k cévní svorce. Kanylu lehce zajistíme kaudálním podvazem, který ale prozatím definitivně neutahujeme. Kanylu přidržujeme v cévě přes tento ne zcela dotažený uzel. Pomalu uvolníme cévní svorku a kanylu za stálého přidržování zasuneme ještě dále do arterie o cca 0,5 – 1 cm hlouběji. Na cévu s kanylou opět naložíme cévní svorku a následně definitivně dotáhneme distální podvaz. Uvolníme svorku. Zbytky distálního podvazu a kanylu ještě následně zavážeme do kraniálního podvazu (dvojitě zajištění kanyly i cévy in situ).

Kanylace v. jugularis:

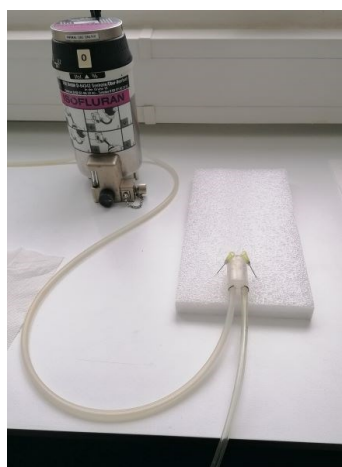
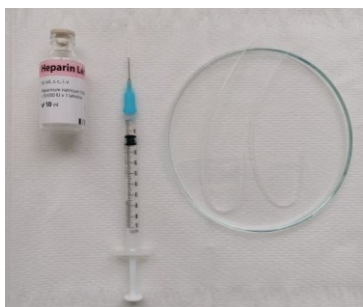
Postup je obdobný jako u arterie. Při kanylaci jugulární vény je třeba postupovat obzvláště jemně - hrozí její přetržení, navíc vena většinou rychle při preparaci reaguje kontrakcí a její lumen je prakticky bez krve. V tomto případě není nutné užívat cévní svorku. Kanyly vedeme podkožně na dorzální (šijovou) stranu krku, kde je drobným otvorem exteriorizujeme.

Operační ránu na ventrální straně krku uzavíráme jednotlivými uzlovými stehy nebo stehem pokračujícím. Při jemně, dobře a čistě provedeném postupu je celý zákrok prakticky bez krvácení a zvíře se po krátké anestezii rychle zotavuje.

Fotodokumentace provedení implantace karotické a jugulární kanyly u potkana

Obrázek 65a, b, c

Příprava na kanylaci v. jugularis a a. carotis. Vlevo ampule heparinu, stříkačka pro plnění kanyl a 2 kanyly; inhalační anestetický přístroj a operační podložka s fixovanou anesteziologickou maskou; používané chirurgické nástroje a potřeby.



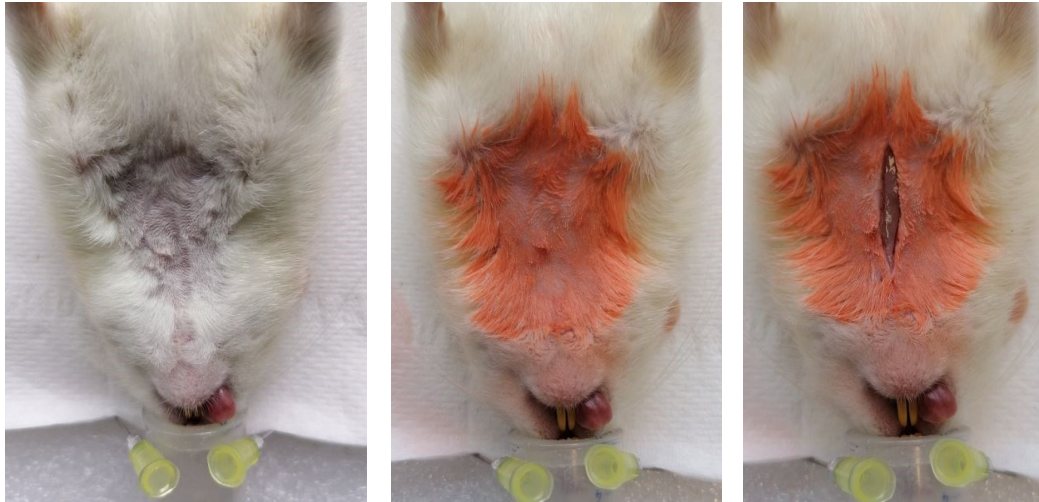
Obrázek 66

Uspané zvíře s vystříhaným operačním polem.

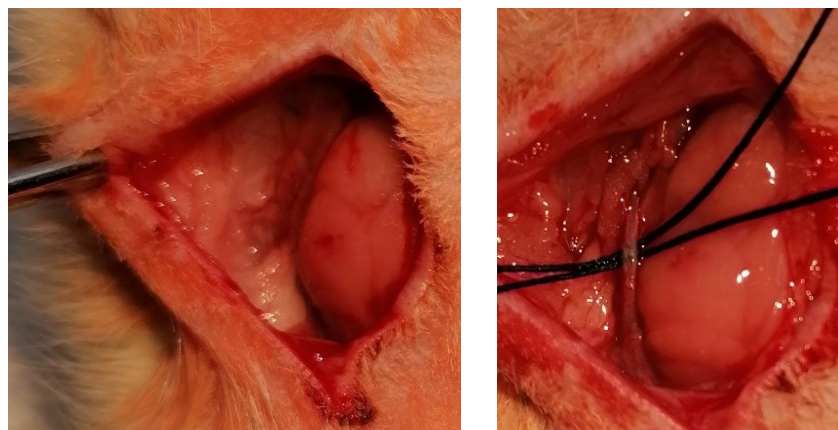


Obrázek 67a, b, c

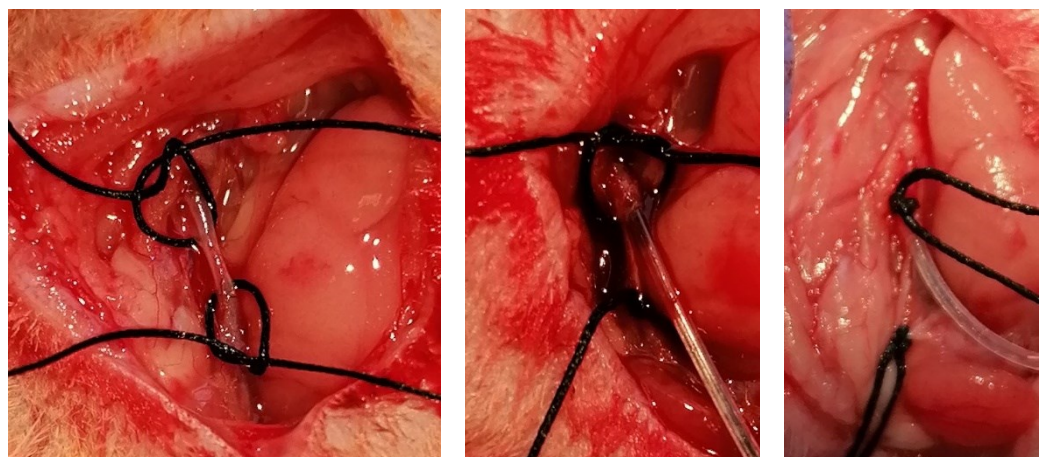
Vystříhané; a desinfikované operační pole; řez kůží.

**Obrázek 68a, b**

Lokalizace v. jugularis; založení dvou podvazů pod v. jugularis.

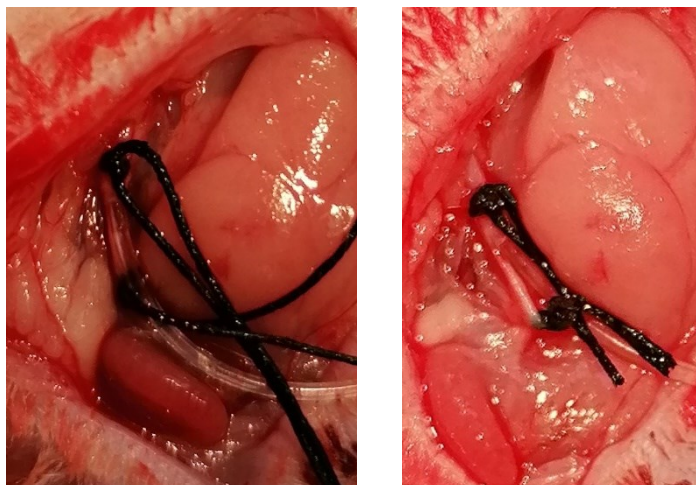
**Obrázek 69a, b, c**

Příprava k fixaci kanyly - jednoduché uzly na podvazcích; zavedená venózní kanyla; dotažení podvazců.



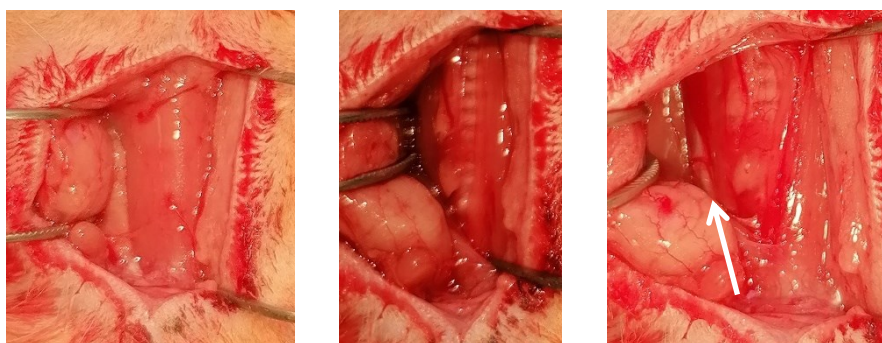
Obrázek 70a, b

Zavázání kaudálního podvazu do podvazu kraniálního, zkrácení konců podvazů a pohled na zafixovanou jugulární kanylu.



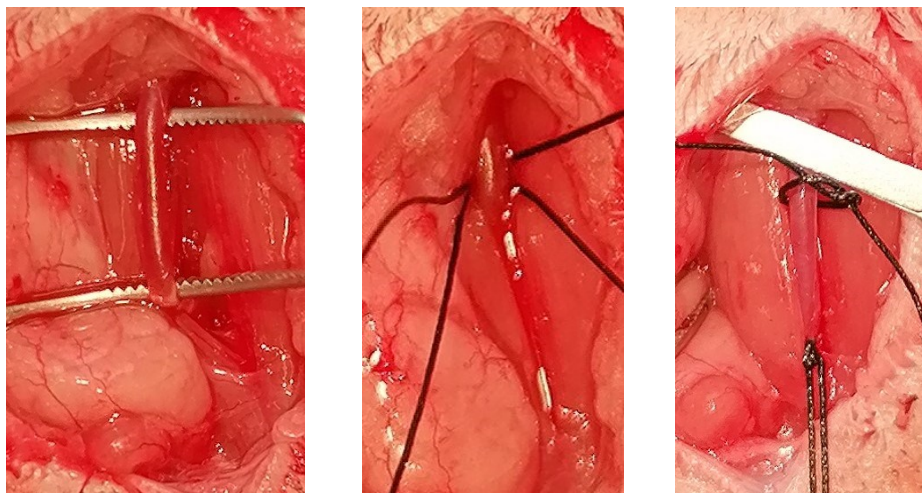
Obrázek 71a, b, c

Kanylace arterie. Pohled na mediální svalovou linii nad tracheou; preparace v přísně mediální linii skrz sval a odsunutí levé části svalu více sinistrálně; laterálně v hloubce uložená a. carotis (pozici naznačuje bílá šipka).



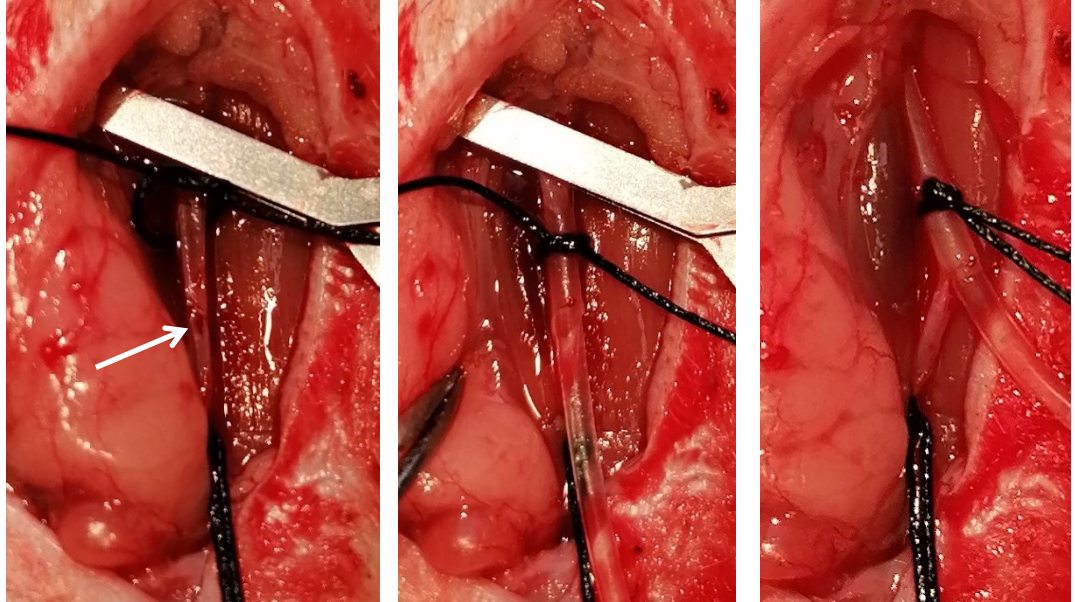
Obrázek 72a, b, c

Uvolnění a. carotis a její vyzvednutí na pinzetě; založení dvou podvazů; dotažení podvazu kraniálního, volný podvaz kaudální a cévní svorka naložená na arterii.

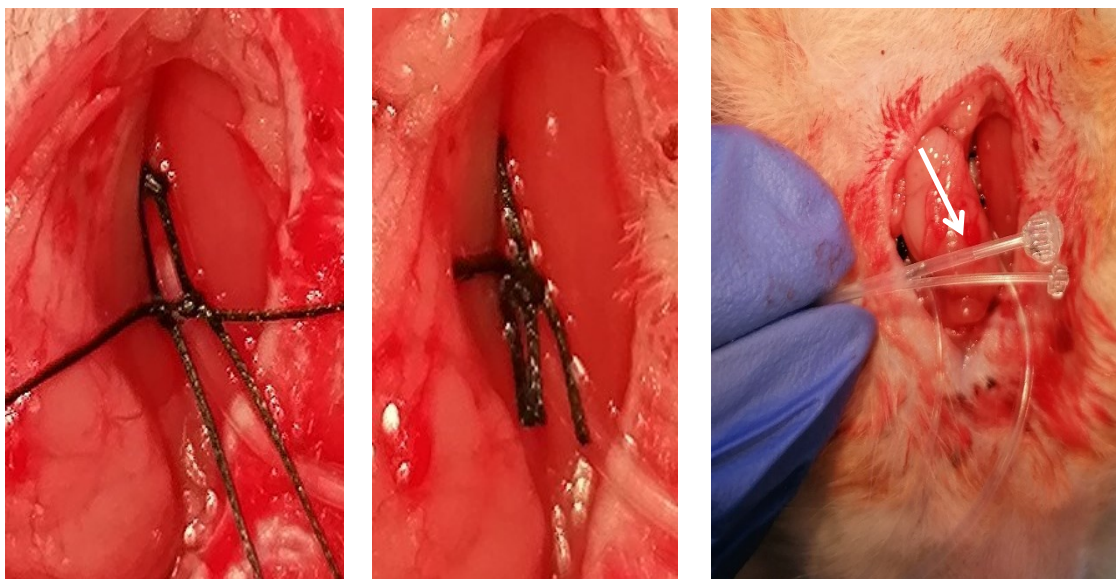


Obrázek 73a, b, c

Nastřížení karotidy (bílá šipka); zavedení karotické kanyly; fixace kanyly v a. carotis.

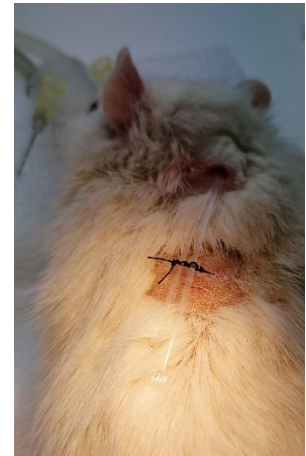
**Obrázek 74a, b, c**

Fixace karotické kanyly; zkrácení konců podvazů; zavedená jugulární a arteriální kanyla (arteriální silnější a slabší venózní kanyla, naplněná arteriální kanyla se vzduchovou bublinou – hladinu naznačuje bílá šipka).

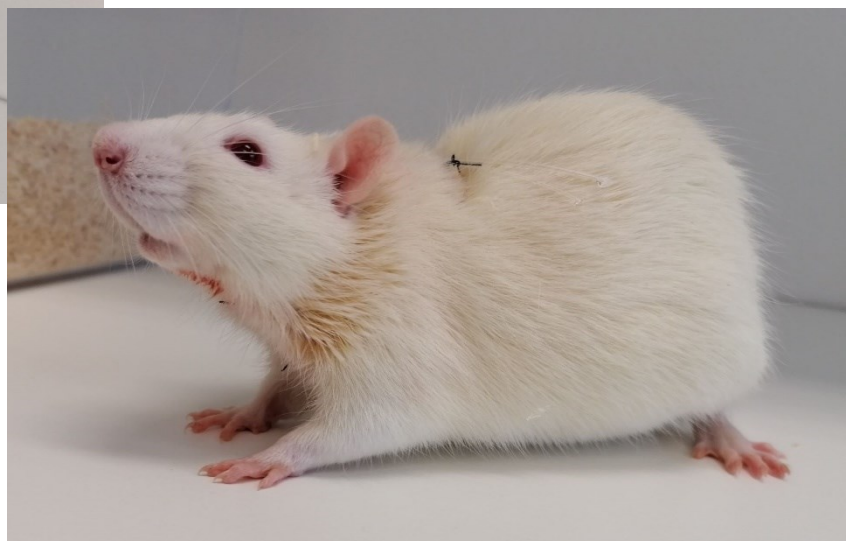


Obrázek 75a, b, c

Operační rána sešitá pokračujícím podvlékaným stehem; exteriorizované kanyly; zajištění kanyl v bezpečné pozici kožním stehem na zádech.

**Obrázek 76a, b**

Kanylované zvíře cca 15 minut po operaci; stejné zvíře cca 30 minut po operaci.

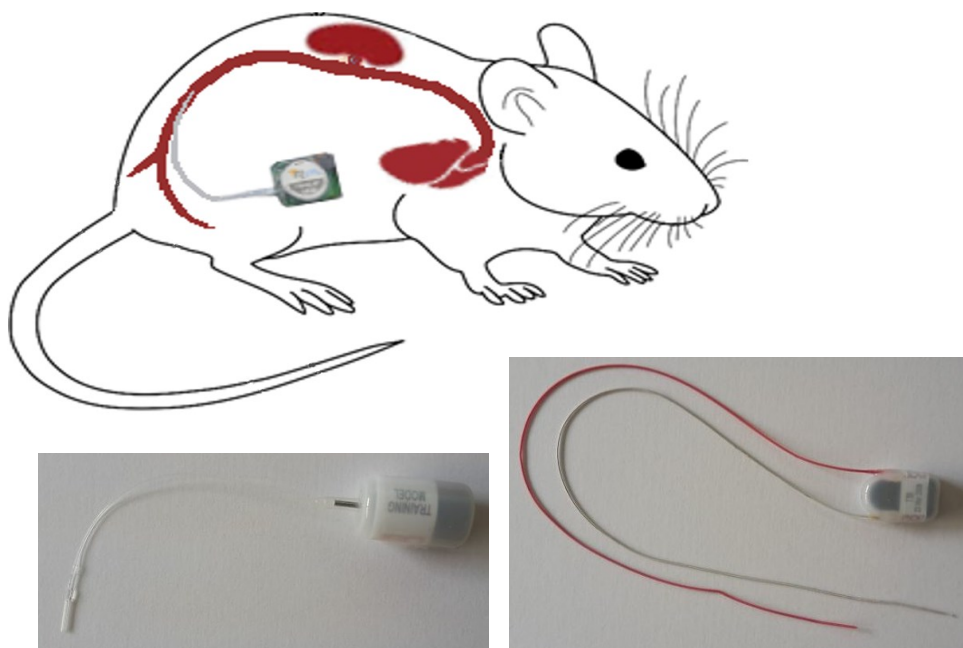


bbb) Telemetrie

Na našem oddělení se nejčastěji k měření parametrů oběhového systému v chronickém pokusu používá telemetrická sonda zavedená do břišní aorty nad ileofemorální bifurkací.

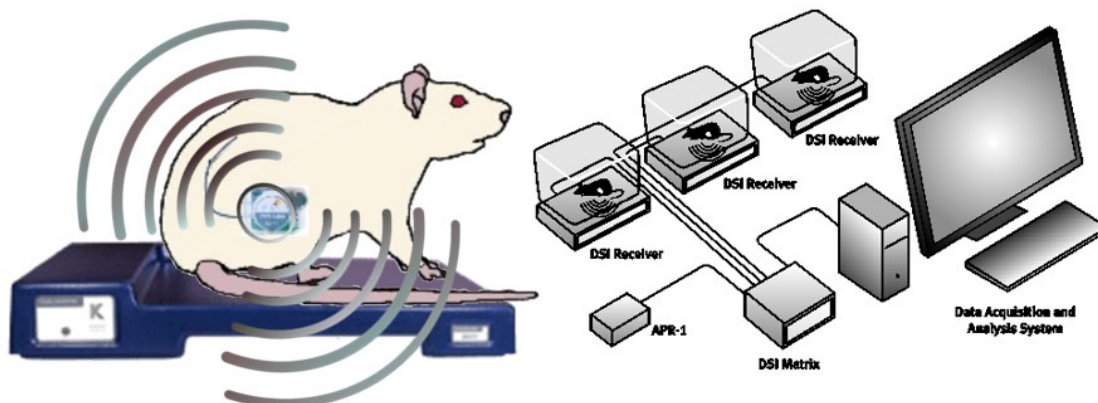
Obrázek 77a, b

Nahoře schematicky znázorněna zavedená telemetrická sonda sloužící k detekci krevního tlaku a pulzu; dole různé modely telemetrických sond používaných na našem oddělení sloužící k přímému měření krevního tlaku a pulzu a/nebo kontinuálního snímání ekg.



Obrázek 78a, b

Vlevo schematické znázornění systému přenosu signálu z telemetrické sondy do detekční podložky, vpravo schema zapojení celého systému (převzato z instruktážního materiálu DSI, Kuba dříve Millar telemetry, upraveno).



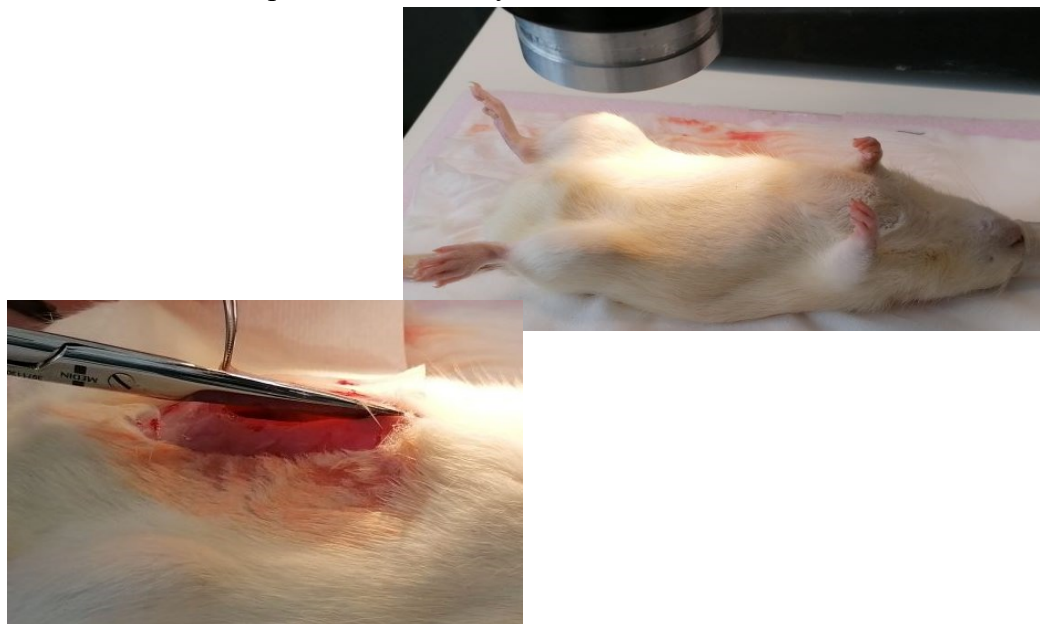
Chirurgický postup

Předoperačně aplikujeme jako prevenci infekčních komplikací krátkodobá, zpravidla penicilinová antibiotika. Zvíře v celkové anestezii obrátíme na záda, zajistíme volné dýchání a vystříháme srst v krajině břicha v rozsahu cca 15 x 8 cm v mediální linii. Pole vydesinfikujeme a provedeme střední laparotomii v přísně mediální linii řezem kůži a následně i v linea alba řezem svalovou vrstvou a pronikneme do dutiny břišní. Jemně odsuneme střeva a odhalíme dorzálně umístěný arteriovenózní svazek. Uvolníme malý úsek břišní aorty, pod který zavedeme dočasný návlek, který slouží ke krátkodobému omezení průtoku krve (postačuje pouhé pozvednutí návleku). Zahnutou injekční jehlou provedeme jemné nabodnutí břišní aorty a vzniklým malým otvorem zavedeme konec telemetrické sondy s čidlem. Otvor kolem zavedené sondy šetrně vysušíme a lehce zakápneme histoakrylovým lepidlem. Pro jistotu ještě lepidlo překryjeme malými kostičkami gelasponu. Po ověření, že nedochází ani k drobnému krvácení fixujeme telemetrickou sondu stehem k břišní stěně. Operační ránu uzavíráme ve dvou vrstvách - nejprve vrstvu svalovou následně vrstvu kožní. Kůži je možné fixovat jednotlivými uzlovými stehy nebo kovovými svorkami. Celou ránu následně ještě vydesinfikujeme. Po operaci je sonda zapnuta a zvíře zařazeno do pokusu.

Fotodokumentace implantace telemetrické sondy

Obrázek 79a, b

Potkan v inhalační anestezii uložený v dorzální poloze pod binolupou; prostrižení břišní stěny v linea alba a otevření peritoneální dutiny.

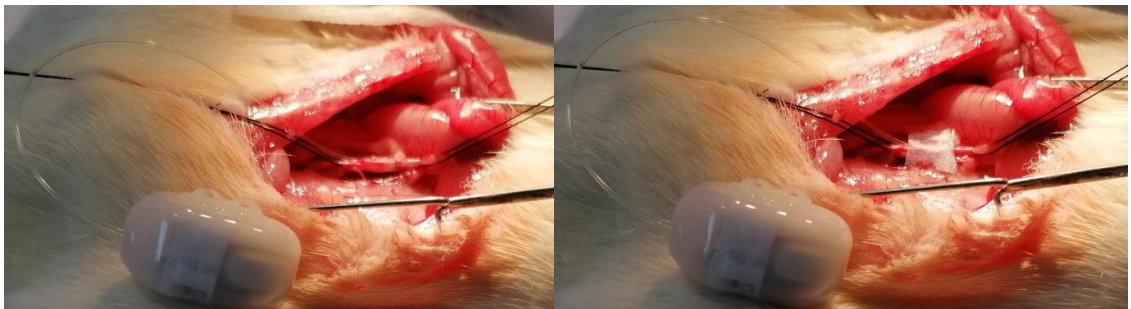


Obrázek 80a, b

Odhalená břišní aorta (označena bílou šipkou); založení dvou dočasných podvazů kraniálně a kaudálně od budoucího vstupu telemetrické sondy.

**Obrázek 81a, b**

Telemetrická sonda zavedená do břišní aorty; místo vstupu sondy do cévy zajištěné histoakrylovým lepidlem a překryté gelasponovým čtverečkem.

**Obrázek 82a, b**

Sonda umístěná do břišní dutiny; na sondě jsou dva retenční otvory, kterými se sonda fixuje k břišní stěně dvěma stehy.



Obrázek 83a, b

Sonda fixovaná k břišní stěně v místě svalové sutury; břišní svaly sešité jednotlivými stehy.

**Obrázek 84a, b**

Kožní řez uzavřený kovovými svorkami; rána po desinfekci překryta kolodiem.

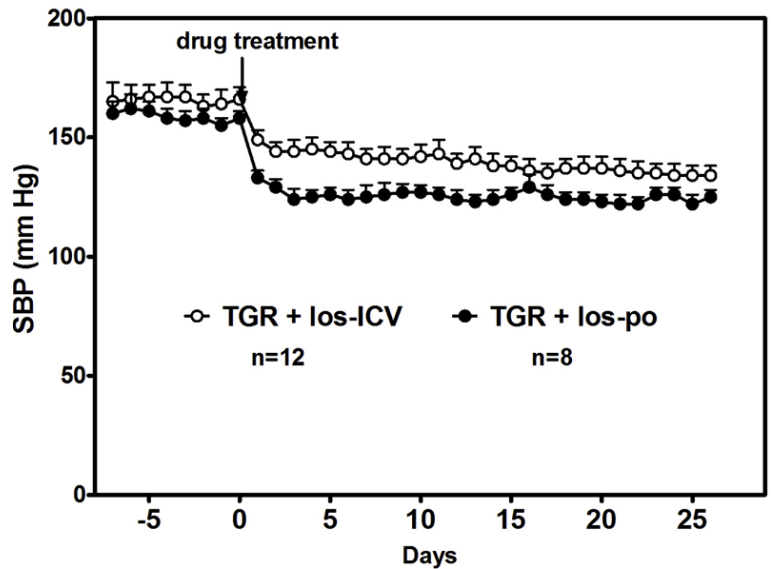
Výsledky i.c.v. aplikace, kanylace cév:

Techniku i.c.v. kanylace ve výzkumu stále používám již více než 15 let. Po celou tuto dobu nám umožňovala nová zajímavá zjištění v různých oblastech. Například behaviorální změny po 4 týdenní i.c.v. aplikaci cortikotropinreleasing hormonu (CRH) osmotickou minipumpou (Rezacova et al., 2011) nebo porovnat vliv centrální a periferní složky při řízení krevního tlaku u hypertenzních animálních modelů (Rezacova et al., 2019), (Rezacova et al., 2022). Ukázky výsledků viz dále. Diskuse jednotlivých výsledků je uvedena v příložených publikacích.

Graf 9

Radiotelemetrické sledování změn systolického krevního tlaku (SBP systolic blood pressure) u transgenních potkanů Ren-2 TGR, kterým byl chronicky podáván blokátor angiotensinových AT1 receptorů losartan buď centrálně (2 mg/kg/den i.c.v.) nebo v pití (10 mg/kg/den p.o.).

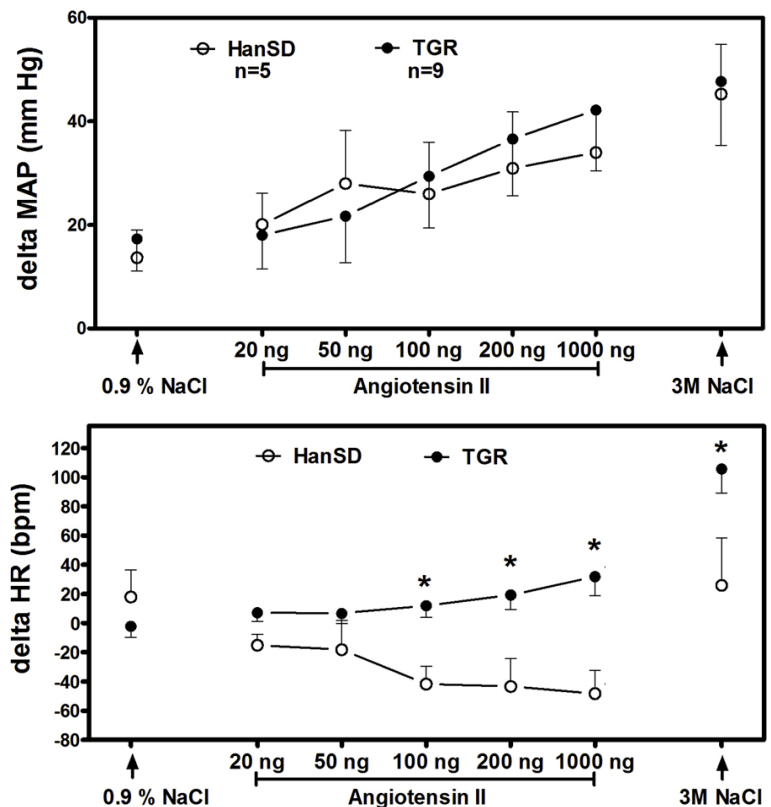
ex (Rezacova et al., 2019)



Graf 10a, b

Změny krevního tlaku (MAP - mean arterial pressure) a srdeční frekvence (HR – heart rate) po akutním i.c.v. podání stoupajících dávek angiotensinu II a i.c.v. aplikaci hypertonického solného roztoku (3M NaCl).

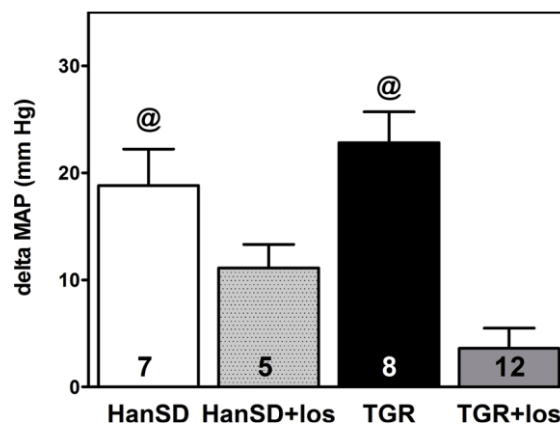
ex (Rezacova et al., 2019)



Graf 11

Vliv blokády mozkových AT1 receptorů i.c.v. aplikací losartanu na presorickou odpověď potkanů vyvolanou akutním i.c.v. podáním angiotensinu II.

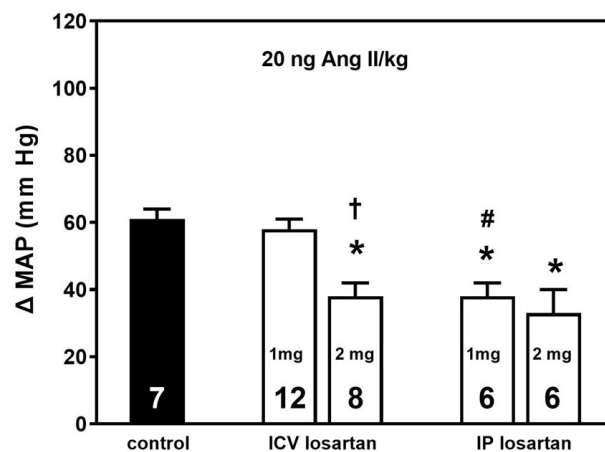
ex (Rezacova et al., 2019)



Graf 12

Změny krevního tlaku (MAP) vyvolané akutním podáním angiotensinu II (2 ng/kg) u Ren-2 TGR potkanů ovlivněných i.c.v. nebo intraperitoneálním (i.p.) losartanem podávaným po dobu 4 týdnů v dávce 1 nebo 2 mg/kg/den.

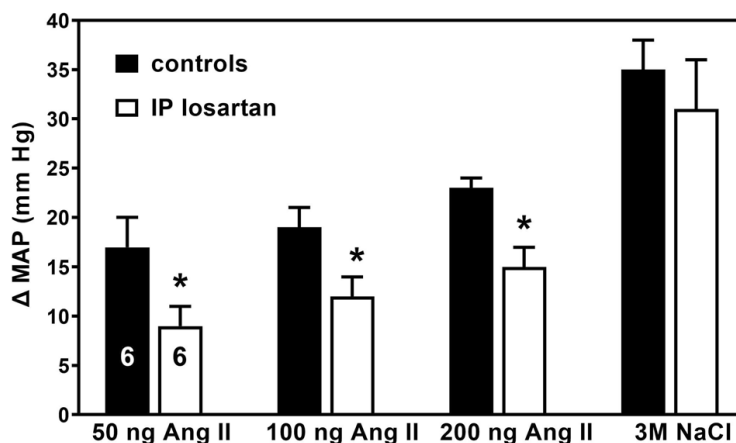
ex (Rezacova et al., 2022)



Graf 13

Změny krevního tlaku (MAP) vyvolané akutním i.c.v. podáním stoupajících dávek angiotensinu II u Ren-2 TGR potkanů ovlivněných chronickým i.p. podáním losartanu v dávce 2 mg/kg/den.

ex (Rezacova et al., 2022)



Diskuse i.c.v. aplikace, kanylace cév:

Intracerebroventrikulární aplikace je operace provedená podle vnějších koordinát zjištěných ze stereotaktického atlasu, který ovšem není individuální, ale je standardní pro daný kmen a stáří potkana či jiných druhů. Za pomoci vnějších stereotaktických koordinát zjištěných v atlase provádíme návrh na předem určeném místě lebky. Tato pozice by měla odrážet i ideální polohu kanyly vůči velkému komorovému systému. Teoreticky by tedy bylo možno kanylu umístit kamkoli v rámci intracerebroventrikulárního prostoru. To ovšem prakticky možné není, neboť chceme dosáhnout maximálně homogenní skupiny pokusných zvířat. K jednotnosti přispíváme i standardní polohou i.c.v. kanyly a standardní minimálně zatěžující technikou operace. I.c.v. kanylace je většinou snadný chirurgický zákrok, který potkani v cca 99 % přežívají. Zřídka dochází k nitrolebnímu krvácení a ve výjimečných případech i ke smrti, která je způsobena zejména krvácením do mozku a pod jeho obaly. Za dlouhé roky praxe jsem vytypovala několik nejvíce spolehlivých a zároveň nejméně komplikujících poloh i.c.v. kanyly. I přes to se někdy poruší laterální durální vena a hrozí vážnější krvácení. V takovém případě je nutné operaci přerušit a pokusit se krev z trepanačního návrhu odsávat mikrotamponem. Po zástavě krvácení je možno pokračovat v zákroku. Vytvoří-li se pod průsvitnou lebkou rozsáhlejší hematom, je prognóza obvykle špatná a takové zvíře dál v pokusu nepokračuje.

Pokud je zákrok proveden lege artis je prakticky bez krvácení a zvířata se po odeznění anestezie chovají zcela přirozeně, bez projevů bolesti. Důkazem toho je, že již po $\frac{3}{4}$ hodině od odpojení z anestezilogické soustavy zvířata běžně žerou a pijí vodu. Zvířata se po zotavení z anestezie mohou vrátit do své původní chovné nádoby s ostatními jedinci. Druhý den již nejsou nijak behaviorálně odlišitelná od neoperovaných zvířat.

Kanylaci arteria carotis a vena jugularis potkani přežívají bez vážnějších následků, na rozdíl od stejného zákroku u lidí, kde by uzavření už jedné a. carotis mělo velice vážné následky. U potkanů a malých hlodavců je mozek relativně dostatečně prokrven přes a. vertebralis, která po jednostranné okluzi přebírá hlavní úlohu. Dle nepublikovaných pokusů provedených v AVČR na odd. Neurofyzologie paměti (u kterých jsem byla přítomna) dokonce ani úplná oboustranná okluze a. carotis u potkana kmene Long-Evans neznamená smrt, dokonce po probuzení je zvíře schopno samostatného života. Jeho kognitivní funkce jsou však lehce narušeny (obtížnější učení se prostorovým úlohám).

Je-li jednostranná kanylace cév provedena lege artis, jde také o prakticky bezkrevný zákrok. Zvířata ho relativně dobře snášejí. Jedním z negativních důsledků kanylace je nutné

individuální ustájení kanylovaných zvířat, abychom předešli vzájemnému poškození voperovaných kanyl či případnému vykrvácení zvířete po porušení arteriální kanyly. Z postoperačních důsledků největší komplikace působí vlastní kožní rána na krku. Protože sice nepatrně, ale přesto omezuje pohyb zvířat (obtížnější odebírání žrádla z víka chovné nádoby v záklonu hlavy), jsou operovaným potkanům krmné pelety pokládány volně na podestýlku. Na potkanech však nepozorujeme žádné známky pooperační bolesti.

Při implantaci telemetrické sondy není oběh krve trvale narušen, jen po krátkou dobu, kdy probíhá vsunutí telemetrického čidla a jeho bezpečnou fixaci v arterii, je oběh v dolních končetinách omezen. Doba omezení oběhu zpravidla nepřekračuje 3 - 5 minut. Po zahojení operační rány (cca 7 - 10 dnů od operace) na zvířatech nepozorujeme žádné změny ani projevy bolesti ve srovnání se zvířaty neoperovanými.

Telemetrické snímání dat má nespornou výhodu v možnosti kontinuálního 24 hodinového či sekvenčního záznamu dat získaného bez rušivých interakcí. Jistým omezením tohoto systému je fakt, že v rámci používaného systému (Millar telemetry) zvířata musejí být ustájena jednotlivě. Implantace telemetrické sondy vyžaduje sice rozsáhlejší operační zákrok ve srovnání s kanylací a. carotis a v. jugularis avšak s menšími potenciálními patofyziologickými důsledky.

Chirurgická experimentální technika i.c.v. aplikace látek přináší mnoho zajímavých a důležitých zjištění zejména díky tomu, že látky podané do mozkových komor mohou přímo působit na mozek a nemusejí procházet skrz těsnou hematoencefalickou bariéru. Tuto techniku využívají různé výzkumné obory. I.c.v. podání angiotenzinu II nebo blokátorů RAS bylo recentně použito při studiu mechanismů regulace krevního tlaku (Nautiyal et al., 2012), (Huang et al., 2012), (Leenen and Yuan, 2001) a arteriálního baroreflexu (Tsai et al., 2013), (Tsai et al., 2019) nebo příjmu vody a soli (Omouessi et al., 2021).

Závěr i.c.v. aplikace, kanylace cév:

Z našich publikovaných prací vyplývá že, jak krátkodobá tak dlouhodobá i.c.v. aplikace testovaných látek je schopná akutně či chronicky ovlivnit v experimentu měřené fyziologické a behaviorální reakce a parametry.

Souhrnný závěr

Historický vývoj poznání funkce jednotlivých biologických soustav byl v minulosti více méně odkázán na výskyt vrozených vad, které způsobí nefunkčnost systému. Vnější projevy takového defektu odrážejí skutečný význam systému ve funkčním stavu. S postupem poznání bylo možno takové vady uměle vytvářet a tak prověřovat, zda představy o funkci a významu systému jsou pravdivé. S dalším stupněm poznání bylo možno simulovat nejen vady ve smyslu ztráty funkce, ale nově i ve smyslu posílení funkce či alternativních možností její aktivace. Chirurgický přístup se podílí na obou směrech výzkumu, jak ve smyslu navození ztráty funkce, tak i ve smyslu jejího zesílení.

Dnes je možno vytvořit model prakticky jakékoliv poruchy konkrétního genu, ale komplexita některých patologických a patofyziologických stavů stále s výhodou využívá i chirurgického modelu, který poskytuje komplexní důsledky. U většiny onemocnění a vad není ani v současné době známý genetický kontext a ve většině případů ani není porucha způsobena jednotlivými geny, nýbrž jejich společným působením.

Operační pinealektomie je klinicky velmi významný a stále nenahraditelný zákrok, který slouží k odstranění tumorových změn nebo zmírňuje příznaky vyvolané pineální cystou a ulevuje tak pacientům v běžném životě. Jako experimentální technika je tento zákrok sice často využíván, ale dle mého osobního názoru je jeho správné provedení velmi problematické. Při námi zvoleném způsobu experimentální pinealektomie s přerušením centrálního durálního splavu dochází zřejmě často k přidruženým změnám, které značně komplikují interpretaci získaných výsledků, jak se ukázalo zejména u skupiny sham operovaných zvířat.

Metoda intracerebroventrikulární aplikace jak v provedení akutní aplikace, tak i v podobě dlouhodobé infuze testované nebo terapeutické látky do mozkových komor je i v dnešní době velmi dobře využitelný model zvláště v biomedicínském výzkumu, omezeně také v klinice.

V experimentu je použitelná například ke studování vlivu centrálně aplikovaných látek na změny a řízení krevního tlaku. To je zvláště výhodné v kombinaci s technikami přímého měření oběhových parametrů (kanylace cév, telemetrie). Punkce mozkových komor se naopak v experimentu využívá k získání vzorku mozkomíšního moku (nebo jeho

mikrodialyzátů), a v klinice zejména ke snížení nitrolebního tlaku (např. při obstrukčním nebo traumatickém hydrocefalu).

Celá tato práce dokládá, že využití různých chirurgických postupů je stálou a dosud nenahraditelnou součástí biomedicínského výzkumu a výsledky získané v experimentech mohou dále sloužit k rozvoji poznání a pochopení provázanosti fyziologických dějů a přispívají i k hledání a rozvoji nových potenciálních terapeutik.

Příložené publikace:

(Rezacova et al., 2021)

Řezáčová L, Vaněčková I, Hojná S, Vavřínová A, Valovič P, Rauchová H, Behuliak M, Zicha (2021) Both central sympathoexcitation and peripheral angiotensin II-dependent vasoconstriction contribute to hypertension development in immature heterozygous Ren-2 transgenic rats.

Hypertens Res. 2021 Oct 8.

doi: 10.1038/s41440-021-00775-2.

IF 3,872 (Q2)

(Rezacova et al., 2019)

Řezáčová L, Hojná S, Kopkan L, Rauchová H, Kadlecová M, Zicha J, Vaněčková I. (2019) Role of angiotensin II in chronic blood pressure control of heterozygous Ren-2 transgenic rats: Peripheral vasoconstriction versus central sympathoexcitation.

Biomed Pharmacother. 2019 Aug;116:108996.

doi: 10.1016/j.biopha.2019.108996.

IF 6,53 (Q1)

(Majovsky et al., 2017)

Martin Májovský, **Lenka Řezáčová**, Alena Sumová, Lenka Pospíšilová, David Netuka, Ondřej Bradáč, Vladimír Beneš (2017) Melatonin and cortisol secretion profile in patients with pineal cyst before and after pineal cyst resection.

Journal of Clinical Neuroscience 39 (2017) 155–163

doi: 10.1016/j.jocn.2017.01.022.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2017.01.022>

IF 1,961 (Q4)

(Vaneckova et al., 2016)

Vaněčková, I., **Řezáčová, L.**, Kuneš, J., & Zicha, J. (2016). Moderate additive effects of endothelin receptor A blockade in Ren-2 transgenic rats subjected to various types of RAS blockade. Life sciences, 159, 127-134.

IF 5,037 (Q1)

Nepříložené publikace:

(Rezacova et al., 2011)

Lenka Rezacova, Jan Svoboda, Ales Stuchlik, Karel Vales (2011) Differential effects of stable elevated levels of corticotropin-releasing hormone and systemic corticosterone on various types of rat learning.

Neuroendocrinol Lett 2011; 32(1):64–76

IF 0,765 (Q4)

(Stuchlik et al., 2004)

Stuchlik, A., Rezacova, L., Vales, K., Bubenikova, V., & Kubik, S. (2004). Application of a novel Active Allothetic Place Avoidance task (AAPA) in testing a pharmacological model of psychosis in rats: comparison with the Morris Water Maze. Neuroscience letters, 366(2), 162-166.

IF 3,046 (Q3)

Seznam literatury:

- Andersson, A. K. and S. Sandler. 2001. Melatonin protects against streptozotocin, but not interleukin-1beta-induced damage of rodent pancreatic beta-cells. *J Pineal Res* 30:157-165.
- Anisimov, V. N. 2002. The light-dark regimen and cancer development. *Neuroendocrinology Letters* 23:28-36.
- Anisimov, V. N. 2003. The role of pineal gland in breast cancer development. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 46:221-234.
- Anisimov, V. N., I. A. Vinogradova, A. V. Bukalev, I. G. Popovich, M. A. Zabezhinskii, A. V. Panchenko, M. L. Tyndyk, and M. N. Iurova. 2014. [Light-induced disruption of the circadian clock and risk of malignant tumors in laboratory animals: state of the problem]. *Vopr. Onkol.* 60:15-27.
- Asai, M. A. M., L. M. L. Mayagoitia, D. G. D. Garcia, G. M. T. G. Matamoros-Trejo, M. V. T. M. Valdes-Tovar, and P. L. P. Leff. 2007. Rat brain opioid peptides-circadian rhythm is under control of melatonin. *Neuropeptides* 41:389-397.
- Bagnara, J. T. and M. E. Hadley. 1970. Endocrinology of the amphibian pineal. *Am. Zool.* 10:201-216.
- Ballur, A. F. H., E. Altinoz, G. Yigitturk, M. O. Onal, H. Elbe, Y. Bicer, M. Karayakali, and M. Demir. 2022. Influence of Pinealectomy and Long-term Melatonin Administration on Inflammation and Oxidative Stress in Experimental Gouty Arthritis. *Inflammation* 1-16.
- Banerji, T. K., T. Kachi, and W. B. Quay. 1980. Adrenal and hypothalamic dopamine-beta-hydroxylase activity in the hamster: evidence for species-distinctive day-night and post-pinealectomy differences in activity. *J Neurosci. Res* 5:371-378.
- Bartness, T. J. and G. N. Wade. 1985. Photoperiodic control of seasonal body weight cycles in hamsters. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9:599-612.
- Basaloglu, H. K., M. Turgut, C. Sirin, Y. Uyanikgil, B. Demirci, and E. O. Cetin. 2021. The influence of functional pinealectomy and exogenous melatonin application on healing of burr hole in adult rat calvaria: a histological and immunohistochemical study. *Folia Morphol. (Warsz.)*.
- Boczek-Leszczak, E. and M. Juszcak. 2007. [The influence of melatonin on human reproduction]. *Pol. Merkur Lekarski.* 23:128-130.
- Borovanský, L., J. Hromada, J. Kos, J. Zrzavý, and K. Žlábek. 1973. *Soustavná anatomie člověka I, II.* Avicenum Prague.
- Brown, G. M. 1992. Day-Night Rhythm Disturbance, Pineal Function and Human-Disease. *Hormone Research* 37:105-111.
- Brzozowska, I., M. Strzalka, D. Drozdowicz, S. J. Konturek, and T. Brzozowski. 2014. Mechanisms of esophageal protection, gastroprotection and ulcer healing by melatonin. implications for the therapeutic use of melatonin in gastroesophageal reflux disease (GERD) and peptic ulcer disease. *Curr. Pharm. Des* 20:4807-4815.
- Bulian, D. and W. Pierpaoli. 2000. The pineal gland and cancer - I. Pinealectomy corrects congenital hormonal dysfunctions and prolongs life of cancer-prone C3H/He mice. *Journal of Neuroimmunology* 108:131-135.
- Bustamante-Garcia, R., A. S. Lira-Rocha, O. Espejo-Gonzalez, A. E. Gomez-Martinez, and O. Picazo. 2014. Anxiolytic-like effects of a new 1-N substituted analog of melatonin in pinealectomized rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 51:133-139.
- Canpolat, S., S. Sandal, B. Yilmaz, A. Yasar, S. Kutlu, G. Baydas, and H. Kelestimur. 2001. Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on serum leptin levels in male rat. *European Journal of Pharmacology* 428:145-148.
- Cardinali, D. P., A. I. Esquifino, V. Srinivasan, and S. R. Pandi-Perumal. 2008. Melatonin and the Immune System in Aging. *Neuroimmunomodulation* 15:272-278.

- Carrillo-Vico, A., J. R. Calvo, P. Abreu, P. J. Lardone, S. Garcia-Maurino, R. J. Reiter, and J. M. Guerrero. 2004. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J* 18:537-539.
- Chen, L., T. Zhou, N. Wu, A. O'Brien, J. Venter, L. Ceci, K. Kyritsi, P. Onori, E. Gaudio, A. Sybenga, L. Xie, C. Wu, L. Fabris, P. Invernizzi, D. Zawieja, S. Liangpunsakul, F. Meng, H. Francis, G. Alpini, Q. Huang, and S. Glaser. 2019. Pinealectomy or light exposure exacerbates biliary damage and liver fibrosis in cholestatic rats through decreased melatonin synthesis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis.* 1865:1525-1539.
- Cizza, G., M. Requena, G. Galli, and J. L. de. 2011. Chronic sleep deprivation and seasonality: implications for the obesity epidemic. *J Endocrinol. Invest.* 34:793-800.
- Concha, M. L. and S. W. Wilson. 2001. Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *J Anat.* 199:63-84.
- Cos, S. and E. J. Sanchez-Barcelo. 2000a. Melatonin and mammary pathological growth. *Front Neuroendocrinol.* 21:133-170.
- Cos, S. and E. J. Sanchez-Barcelo. 2000b. Melatonin, experimental basis for a possible application in breast cancer prevention and treatment. *Histol. Histopathol.* 15:637-647.
- Day, G. A., I. B. McPhee, J. Tuffley, F. Tomlinson, R. Chaseling, S. Kellie, I. Torode, M. Sherwood, K. Cutbush, A. J. Geddes, and B. Brankoff. 2007. Idiopathic scoliosis and pineal lesions in Australian children. *J. Orthop. Surg. (Hong. Kong.)* 15:327-333.
- De, B. M., T. Fortin, and B. A. Pappas. 2002. Pinealectomy: behavioral and neuropathological consequences in a chronic cerebral hypoperfusion model. *Neurobiol. Aging* 23:309-317.
- Dempsey, R. J., J. Hopkins, E. L. Bittman, and G. W. Kindt. 1982. Total pinealectomy by an occipital parasagittal approach in sheep. *Surg. Neurol.* 18:377-380.
- Dyer, R. S., D. A. Weldon, and A. J. Mento. 1974. Pinealectomy and two-way avoidance in the guinea pig (*Cavia porcellus*). *Physiol Behav.* 12:671-672.
- Ebadi, M., M. Samejima, and R. F. Pfeiffer. 1993. Pineal-Gland in Synchronizing and Refining Physiological Events. *News in Physiological Sciences* 8:30-33.
- Čihák, R. 2004. *Anatomie 3*. Grada publishing.
- Erlich, S. S. and M. L. Apuzzo. 1985. The pineal gland: anatomy, physiology, and clinical significance. *J Neurosurg.* 63:321-341.
- Esrefoglu, M., M. Seyhan, M. Gul, H. Parlakpınar, K. Batcioglu, and B. Uyumlu. 2005. Potent therapeutic effect of melatonin on aging skin in pinealectomized rats. *J Pineal Res* 39:231-237.
- Findikli, E., M. F. Inci, M. Gokce, H. A. Findikli, H. Altun, and M. F. Karaaslan. 2015. Pineal gland volume in schizophrenia and mood disorders. *Psychiatr. Danub.* 27:153-158.
- Fischer, T. W., A. Slominski, D. J. Tobin, and R. Paus. 2008a. Melatonin and the hair follicle. *J Pineal Res* 44:1-15.
- Fischer, T. W., A. Slominski, M. A. Zmijewski, R. J. Reiter, and R. Paus. 2008b. Melatonin as a major skin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair. *Exp. Dermatol.* 17:713-730.
- Guerrero, J. M. and R. J. Reiter. 2002. Melatonin-immune system relationships. *Curr. Top. Med. Chem.* 2:167-179.
- Gursoy, A. Y., M. Kiseli, and G. S. Caglar. 2015. Melatonin in aging women. *Climacteric.* 18:790-796.
- Hasegawa, A., K. Ohtsubo, and W. Mori. 1987. Pineal gland in old age; quantitative and qualitative morphological study of 168 human autopsy cases. *Brain Res* 409:343-349.
- Hazlerigg, D. G. 2001. What is the role of melatonin within the anterior pituitary? *J Endocrinol.* 170:493-501.
- Hervieu, G. 2003. Melanin-concentrating hormone functions in the nervous system: food intake and stress. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 7:495-511.
- Hoffman, R. A. and R. J. Reiter. 1965. Rapid pinealectomy in hamster and other small rodents. *Anat. Rec.* 153:19-21.

- Hsieh, K. S. and O. Minoru. 1969. Improved procedure of pinealectomy in rat. *Endocrinol. Jpn.* 16:477-478.
- Huang, B. S., H. Wang, and F. H. Leenen. 2001. Enhanced sympathoexcitatory and pressor responses to central Na⁺ in Dahl salt-sensitive vs. -resistant rats. *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol* 281:H1881-H1889.
- Huang, B. S., R. A. White, L. Bi, and F. H. Leenen. 2012. Central infusion of aliskiren prevents sympathetic hyperactivity and hypertension in Dahl salt-sensitive rats on high salt intake. *Am. J Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 302:R825-R832.
- Illnerova, H., A. Sumova, Z. Travnickova, M. Jac, and D. Jelinkova. 2000. Hormones, subjective night and season of the year. *Physiol Res* 49 Suppl 1:S1-10.
- Illnerova, H. and J. Vanecek. 1985. Regulation of the circadian rhythm in pineal melatonin production. *Physiol. Bohemoslov.* 34 Suppl:57-61.
- Jamieson, D. and A. Roberts. 2000. Responses of young *Xenopus laevis* tadpoles to light dimming: possible roles for the pineal eye. *J Exp. Biol.* 203:1857-1867.
- Janik, D., J. Dittami, and E. Gwinner. 1992. The effect of pinealectomy on circadian plasma melatonin levels in house sparrows and European starlings. *J Biol. Rhythms* 7:277-286.
- Jansen, S. L., D. A. Forbes, V. Duncan, and D. G. Morgan. 2006. Melatonin for cognitive impairment. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD003802.
- Joshi, B. N., M. E. Troiani, J. Milin, F. Nurnburger, and R. J. Reiter. 1986. Adrenal-mediated depression of N-acetyltransferase activity and melatonin levels in the rat pineal gland. *Life Sci.* 38:1573-1580.
- Karbownik, M. and A. Lewinski. 2003. The role of oxidative stress in physiological and pathological processes in the thyroid gland; possible involvement in pineal-thyroid interactions. *Neuro Endocrinol. Lett.* 24:293-303.
- Khavinson, V. K., S. S. Konovalov, V. V. Yuzhakov, V. V. Popuchiev, and I. M. Kvetnoi. 2001a. Modulating effects of epithalamin and epithalon on the functional morphology of the spleen in old pinealectomized rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 132:1116-1120.
- Khavinson, V. K., I. M. Kvetnoi, V. V. Popuchiev, V. V. Iuzhakov, and L. N. Kotlova. 2001b. [Effect of pineal peptides on neuroendocrine system after pinealectomy]. *Arkh. Patol.* 63:18-21.
- Kim, M., S. M. Lee, J. Jung, Y. J. Kim, K. C. Moon, J. H. Seo, T. K. Ha, and E. Ha. 2020. Pinealectomy increases thermogenesis and decreases lipogenesis. *Mol. Med. Rep.* 22:4289-4297.
- Kitay, J. I. 1954. Pineal lesions and precocious puberty: a review. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 14:622-625.
- Kitay, J. I. and M. D. Altschule. 1954. The pineal gland : a review of the physiologic literature. Camb., Mass. : Harvard U.P. for the Commonwealth Fund .
- Kittnar, O., K. Jandová, and E. Kuriščák. 2020. *Lékařská fyziologie*. 2. vydání ed. Grada Publishing.
- Klepac, N., Z. Rudes, and R. Klepac. 2006. Effects of melatonin on plasma oxidative stress in rats with streptozotocin induced diabetes. *Biomed. Pharmacother.* 60:32-35.
- Kurdi, M. S. and S. P. Muthukalai. 2016. The Efficacy of Oral Melatonin in Improving Sleep in Cancer Patients with Insomnia: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Indian J Palliat. Care* 22:295-300.
- Lafortune, P., C. E. Aubin, H. Boulanger, I. Villemure, K. M. Bagnall, and A. Moreau. 2007. Biomechanical simulations of the scoliotic deformation process in the pinealectomized chicken: a preliminary study. *Scoliosis.* 2:16.
- Lam, R. W., A. L. Berkowitz, S. L. Berga, C. M. Clark, D. F. Kripke, and J. C. Gillin. 1990. Melatonin suppression in bipolar and unipolar mood disorders. *Psychiatry Res* 33:129-134.
- LeBaron, R. 1972. *Hormones: A Delicate Balance*. Pegasus Publications.
- Leenen, F. H. and B. Yuan. 2001. Prevention of hypertension by irbesartan in Dahl S rats relates to central angiotensin II type 1 receptor blockade. *Hypertension* 37:981-984.
- Lin, L., Q. X. Huang, S. S. Yang, J. Chu, J. Z. Wang, and Q. Tian. 2013. Melatonin in Alzheimer's disease. *Int J Mol. Sci.* 14:14575-14593.

- Liu, W. C., X. Wang, X. Zhang, X. Chen, and X. Jin. 2017. Melatonin Supplementation, a Strategy to Prevent Neurological Diseases through Maintaining Integrity of Blood Brain Barrier in Old People. *Front Aging Neurosci.* 9:165.
- Liu, X. Y., Y. T. Xu, Q. Shi, Q. S. Lu, S. R. Ma, X. Y. Xu, and X. Z. Guo. 2013. Alterations of reproductive hormones and receptors of male rats at the winter and summer solstices and the effects of pinealectomy. *Neuro Endocrinol. Lett.* 34:143-153.
- Lopuchin, Ju. M. 1976. *Experimental surgery.* Mir, Moscow.
- Machida, M., I. Murai, Y. Miyashita, J. Dubousset, T. Yamada, and J. Kimura. 1999. Pathogenesis of idiopathic scoliosis. Experimental study in rats. *Spine (Phila Pa 1976.)* 24:1985-1989.
- Machida, M., M. Saito, J. Dubousset, T. Yamada, J. Kimura, and K. Shibasaki. 2005. Pathological mechanism of idiopathic scoliosis: experimental scoliosis in pinealectomized rats. *Eur. Spine J* 14:843-848.
- Maganhin, C. C., R. S. Simoes, L. F. Fuchs, R. M. Oliveira-Filho, M. J. Simoes, N. J. Evencio, E. C. Baracat, and J. M. Soares, Jr. 2009. Rat pinealectomy: a modified direct visual approach. *Acta Cir. Bras.* 24:321-324.
- Májovský, M., N. D., and B. V. 2019. Současný pohled na diagnostiku a léčbu pacientů s pineální cystou. *Neurol. praxi:*20(2):121-126.
- Majovsky, M., L. Rezacova, A. Sumova, L. Pospisilova, D. Netuka, O. Bradac, and V. Benes. 2017. Melatonin and cortisol secretion profile in patients with pineal cyst before and after pineal cyst resection. *J. Clin. Neurosci.* 39:155-163.
- Malpoux, B., H. Tricoire, F. Mailliet, A. Daveau, M. Migaud, D. C. Skinner, J. Pelletier, and P. Chemineau. 2002. Melatonin and seasonal reproduction: understanding the neuroendocrine mechanisms using the sheep as a model. *Reprod. Suppl.* 59:167-179.
- Mamourian, A. C. and J. Towfighi. 1986. Pineal cysts: MR imaging. *AJNR Am. J Neuroradiol.* 7:1081-1086.
- Markowitz, J. 1959. *Experimental surgery: including surgical physiology.* 3rd ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Matejovska, I., K. Bernaskova, D. Krysl, and J. Mares. 2008. Influence of melatonin pretreatment and preconditioning by hypobaric hypoxia on the development of cortical photothrombotic ischemic lesion. *Physiol Res* 57:283-288.
- Mendonca, M. T., A. J. Tousignant, and D. Crews. 1996a. Courting and noncourting male red-sided garter snakes, *Thamnophis sirtalis parietalis*: plasma melatonin levels and the effects of pinealectomy. *Horm. Behav.* 30:176-185.
- Mendonca, M. T., A. J. Tousignant, and D. Crews. 1996b. Pinealectomy, melatonin, and courtship behavior in male red-sided garter snakes (*Thamnophis sirtalis parietalis*). *J Exp. Zool.* 274:63-74.
- Mizrak, B., H. Parlakpinar, A. Acet, and Y. Turkoz. 2004. Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on rat hearts. *Acta Histochem.* 106:29-36.
- Molinero, P., M. Soutto, S. Benot, A. Hmadcha, and J. M. Guerrero. 2000. Melatonin is responsible for the nocturnal increase observed in serum and thymus of thymosin alpha1 and thymulin concentrations: observations in rats and humans. *J Neuroimmunol.* 103:180-188.
- Munoz-Hoyos, A., M. Sanchez-Forte, A. Molina-Carballo, G. Escames, E. Martin-Medina, R. J. Reiter, J. A. Molina-Font, and D. Acuna-Castroviejo. 1998. Melatonin's role as an anticonvulsant and neuronal protector: experimental and clinical evidence. *J Child Neurol.* 13:501-509.
- Nautiyal, M., H. A. Shaltout, D. C. de Lima, N. K. do, M. C. Chappell, and D. I. Diz. 2012. Central angiotensin-(1-7) improves vagal function independent of blood pressure in hypertensive (mRen2)27 rats. *Hypertension* 60:1257-1265.
- Nayak, P. K. and T. P. Singh. 1987. Effect of pinealectomy on thyroid hormone (T4 and T3) levels in plasma during annual reproductive cycle in the freshwater catfish, *Clarias batrachus*. *J Pineal Res* 4:387-394.
- Němeček, V. 1953. *Základy veterinární chirurgie.* Státní zdravotnické nakladatelství.
- Nishida, S. 2005. Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and diabetes mellitus. *Endocrine* 27:131-136.

- Nolte, I., M. A. Brockmann, L. Gerigk, C. Groden, and J. Scharf. 2010. TrueFISP imaging of the pineal gland: more cysts and more abnormalities. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 112:204-208.
- Olcese, J. 1995. The mammalian pineal gland and reproduction. Controversies and strategies for future research. *Adv. Exp. Med. Biol.* 377:1-14.
- Omuouessi, St., B. Boussera, B. Ongali, B. Fernette, G. J. Lemamy, B. Ndeboko, J. Mouecoucou, and Sn. Thornton. 2021. Exogenous central angiotensin fails to stimulate a sodium appetite in diabetes insipidus Brattleboro rats. *Physiol Behav.* 230.
- Oyama, J., I. Murai, K. Kanazawa, and M. Machida. 2006. Bipedal ambulation induces experimental scoliosis in C57BL/6J mice with reduced plasma and pineal melatonin levels. *J Pineal Res* 40:219-224.
- Palin, L. P., T. O. B. Polo, F. R. S. Batista, P. H. S. Gomes-Ferreira, I. R. Garcia Junior, A. C. Rossi, A. Freire, L. P. Faverani, D. H. Sumida, and R. Okamoto. 2018. Daily melatonin administration improves osseointegration in pinealectomized rats. *J Appl. Oral Sci.* 26:e20170470.
- Parry, B. L., S. L. Berga, D. F. Kripke, and J. C. Gillin. 1990. Melatonin and phototherapy in premenstrual depression. *Prog. Clin. Biol. Res* 341B:35-43.
- Parry, B. L., C. J. Meliska, D. L. Sorenson, L. F. Martinez, A. M. Lopez, J. A. Elliott, and R. L. Hauger. 2011. Reduced phase-advance of plasma melatonin after bright morning light in the luteal, but not follicular, menstrual cycle phase in premenstrual dysphoric disorder: an extended study. *Chronobiol. Int.* 28:415-424.
- Paulis, L. and F. Simko. 2007. Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: potential mechanisms behind. *Physiol Res.* 56:671-684.
- Paxinos, G. and C. Watson. 1996. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 3 ed. Academic press, San Diego.
- Paxinos, G. and C. Watson. 2006. *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. 6 ed. Elsevier.
- Paxinos, G., C. Watson, M. Pennisi, and A. Topple. 1985. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J. Neurosci. Methods* 13:139-143.
- Petitcolin, V., J. M. Garcier, R. Mohammedi, A. Ravel, R. Mofid, J. F. Viallet, G. Vanneuville, and L. Boyer. 2002. [Prevalence and morphology of pineal cysts discovered at pituitary MRI: review of 1844 examinations]. *J Radiol.* 83:141-145.
- Plytycz, B. and R. Seljelid. 1997. Rhythms of immunity. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 45:157-162.
- Prata Lima, M. F., E. C. Baracat, and M. J. Simoes. 2004. Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. *Braz. J Med. Biol. Res* 37:987-995.
- Reiter, R. J. 1973. Comparative physiology: pineal gland. *Annu. Rev. Physiol* 35:305-328.
- Reiter, R. J., D. Melchiorri, E. Sewerynek, B. Poeggeler, L. Barlow-Walden, J. Chuang, G. G. Ortiz, and D. Acuna-Castroviejo. 1995. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 18:1-11.
- Reiter, R. J., H. Tamura, D. X. Tan, and X. Y. Xu. 2014a. Melatonin and the circadian system: contributions to successful female reproduction. *Fertil. Steril.* 102:321-328.
- Reiter, R. J., D. X. Tan, A. Korkmaz, and S. A. Rosales-Corral. 2014b. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Hum. Reprod. Update.* 20:293-307.
- Rezacova, L., S. Hojna, L. Kopkan, H. Rauchova, M. Kadlecova, J. Zicha, and I. Vaneckova. 2019. Role of angiotensin II in chronic blood pressure control of heterozygous Ren-2 transgenic rats: Peripheral vasoconstriction versus central sympathoexcitation. *Biomed. Pharmacother.* 116:108996.
- Rezacova, L., J. Svoboda, A. Stuchlik, and K. Vales. 2011. Differential effects of stable elevated levels of corticotropin-releasing hormone and systemic corticosterone on various types of rat learning. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 32:64-76.
- Rezacova, L., I. Vaneckova, S. Hojna, A. Vavrinova, P. Valovic, H. Rauchova, M. Behuliak, and J. Zicha. 2021. Both central sympathoexcitation and peripheral angiotensin II-dependent vasoconstriction contribute to hypertension development in immature heterozygous Ren-2 transgenic rats. *Hypertens. Res.*

- Rezacova, L., I. Vaneckova, S. Hojna, A. Vavrinova, P. Valovic, H. Rauchova, M. Behuliak, and J. Zicha. 2022. Both central sympathoexcitation and peripheral angiotensin II-dependent vasoconstriction contribute to hypertension development in immature heterozygous Ren-2 transgenic rats. *Hypertens. Res.* 45:414-423.
- Richardson, G. S. 2005. The human circadian system in normal and disordered sleep. *J Clin. Psychiatry* 66 Suppl 9:3-9.
- Sawamura, Y., J. Ikeda, M. Ozawa, Y. Minoshima, H. Saito, and H. Abe. 1995. Magnetic resonance images reveal a high incidence of asymptomatic pineal cysts in young women. *Neurosurgery* 37:11-15.
- Simko, F., R. J. Reiter, O. Pechanova, and L. Paulis. 2013. Experimental models of melatonin-deficient hypertension. *Front Biosci. (Landmark. Ed)* 18:616-625.
- Skaper, S. D., M. Floreani, M. Ceccon, L. Facci, and P. Giusti. 1999. Excitotoxicity, oxidative stress, and the neuroprotective potential of melatonin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 890:107-118.
- Slawik, H., M. Stoffel, L. Riedl, Z. Vesely, M. Behr, J. Lehmborg, C. Pohl, B. Meyer, M. Wiegand, and S. M. Krieg. 2016. Prospective Study on Salivary Evening Melatonin and Sleep before and after Pinealectomy in Humans. *J Biol Rhythms* 31:82-93.
- Slominski, A., T. W. Fischer, M. A. Zmijewski, J. Wortsman, I. Semak, B. Zbytek, R. M. Slominski, and D. J. Tobin. 2005. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine* 27:137-148.
- Soares, J. M., Jr., M. J. Simoes, C. T. Oshima, O. A. Mora, G. R. De Lima, and E. C. Baracat. 2003. Pinealectomy changes rat ovarian interstitial cell morphology and decreases progesterone receptor expression. *Gynecol. Endocrinol.* 17:115-123.
- Sobajima, S., A. Kin, I. Baba, K. Kanbara, Y. Semoto, and M. Abe. 2003. Implication for melatonin and its receptor in the spinal deformities of hereditary Lordoscoliotic Rabbits. *Spine (Phila Pa 1976.)* 28:554-558.
- Šonka, K. and S. Nevšimalová. 2008. Melatonin známe 50 let. Co o něm víme a jak jen můžeme použít? *Neurol. prax* 2:96-98.
- Starka, L., M. Duskova, B. Racz, K. Simunkova, M. Hill, and R. Kancheva. 2008. Melatonin negatively correlates with C-peptide after food intake. *Physiol Res* 57 Suppl 1:S187-S192.
- Strunecká, A. and J. Patočka. 2005. About pineal gland, light, serotonin and depression. *Psychiatrie* 11-116.
- Stuchlik, A., L. Rezacova, K. Vales, V. Bubenikova, and S. Kubik. 2004. Application of a novel Active Allothetic Place Avoidance task (AAPA) in testing a pharmacological model of psychosis in rats: comparison with the Morris Water Maze. *Neurosci. Lett.* 366:162-166.
- Sudnikovich, E. J., Y. Z. Maksimchik, S. V. Zabrodskaya, V. L. Kubyshin, E. A. Lapshina, M. Bryszewska, R. J. Reiter, and I. B. Zavodnik. 2007. Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats. *Eur. J Pharmacol.* 569:180-187.
- Sumova, A., M. Jac, M. Sladek, I. Sauman, and H. Illnerova. 2003. Clock gene daily profiles and their phase relationship in the rat suprachiasmatic nucleus are affected by photoperiod. *J Biol. Rhythms* 18:134-144.
- Sumova, A., Z. Travnickova, and H. Illnerova. 1995a. Memory on long but not on short days is stored in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci. Lett.* 200:191-194.
- Sumova, A., Z. Travnickova, R. Peters, W. J. Schwartz, and H. Illnerova. 1995b. The rat suprachiasmatic nucleus is a clock for all seasons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:7754-7758.
- Tapp, E. and M. Huxley. 1972. The histological appearance of the human pineal gland from puberty to old age. *J Pathol.* 108:137-144.
- Taraszevska, A., E. Matyja, W. Koszewski, A. Zaczynski, K. Bardadin, and Z. Czernicki. 2008. Asymptomatic and symptomatic glial cysts of the pineal gland. *Folia Neuropathol.* 46:186-195.
- Tchekalarova, J., M. Atanasova, N. Ivanova, N. Boyadjiev, R. Mitreva, and K. Georgieva. 2020. Endurance training exerts time-dependent modulation on depressive responses and circadian rhythms of corticosterone and BDNF in the rats with pinealectomy. *Brain Res. Bull.* 162:40-48.
- Tosini, G., C. Bertolucci, and A. Foa. 2001. The circadian system of reptiles: a multioscillatory and multiphotoreceptive system. *Physiol Behav.* 72:461-471.

- Tsai, C. Y., Y. Y. Poon, J. Y. H. Chan, and S. H. H. Chan. 2019. Baroreflex functionality in the eye of diffusion tensor imaging. *J Physiol* 597:41-55.
- Tsai, C. Y., C. H. Su, V. Baudrie, D. Laude, J. C. Weng, A. Y. Chang, J. Y. Chan, J. L. Elghozi, and S. H. Chan. 2013. Visualizing oxidative stress-induced depression of cardiac vagal baroreflex by MRI/DTI in a mouse neurogenic hypertension model. *Neuroimage*. 82:190-199.
- Tzoneva, R., I. Georgieva, N. Ivanova, V. Uzunova, Z. Nenchovska, S. Apostolova, T. Stoyanova, and J. Tchekalarova. 2021. The Role of Melatonin on Behavioral Changes and Concomitant Oxidative Stress in icvAbeta1-42 Rat Model with Pinealectomy. *Int. J Mol. Sci.* 22.
- Underwood, H. 1985. Annual testicular cycle of the lizard *Anolis carolinensis*: effects of pinealectomy and melatonin. *J Exp. Zool.* 233:235-242.
- Vakkuri, O., H. Rintamaki, and J. Leppaluoto. 1985a. Plasma and tissue concentrations of melatonin after midnight light exposure and pinealectomy in the pigeon. *J Endocrinol.* 105:263-268.
- Vakkuri, O., H. Rintamaki, and J. Leppaluoto. 1985b. Presence of immunoreactive melatonin in different tissues of the pigeon (*Columba livia*). *Gen. Comp Endocrinol.* 58:69-75.
- Vanecek, J., A. Pavlik, and H. Illnerova. 1987. Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res.* 435:359-362.
- Vaneckova, I., L. Rezacova, J. Kunes, and J. Zicha. 2016. Moderate additive effects of endothelin receptor A blockade in Ren-2 transgenic rats subjected to various types of RAS blockade. *Life Sci.* 159:127-134.
- Venegas, C., J. A. Garcia, C. Doerrier, H. Volt, G. Escames, L. C. Lopez, R. J. Reiter, and D. Acuna-Castroviejo. 2013. Analysis of the daily changes of melatonin receptors in the rat liver. *J Pineal Res* 54:313-321.
- Wai, M. G., W. W. Jun, Y. A. Yee, W. J. Ho, N. T. Bun, L. T. Ping, L. S. Man, N. B. Wah, W. C. Chiu, Q. Yong, and C. J. Yiu. 2014. A review of pinealectomy-induced melatonin-deficient animal models for the study of etiopathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *Int J Mol. Sci.* 15:16484-16499.
- Waldhauser, F., G. Weiszenbacher, E. Tatzer, B. Gisinger, M. Waldhauser, M. Schemper, and H. Frisch. 1988. Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J Clin. Endocrinol. Metab* 66:648-652.
- Waynforth, H. B. and P. A. Flecknell. 1992. *Experimental and Surgical Technique in the Rat*. 2 ed. Elsevier, Academic Press.
- Wehr, T. A. 2001. Photoperiodism in humans and other primates: evidence and implications. *J Biol. Rhythms* 16:348-364.
- Wetterberg, L. 1983. The relationship between the pineal gland and the pituitary--adrenal axis in health, endocrine and psychiatric conditions. *Psychoneuroendocrinology* 8:75-80.
- Yavuz, O., M. Cam, N. Bukan, A. Guven, and F. Silan. 2003. Protective effect of melatonin on beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Acta Histochem.* 105:261-266.