

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY

KATEDRA FYZIOLOGIE ŽIVOČICHŮ A VÝVOJOVÉ BIOLOGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCA

**Melatonin a jeho receptory
v gastrointestinálním traktu**

Matúš Soták

Vedúci diplomovej práce: Doc. RNDr. Jiří Pácha, DrSc.

Praha 2006

Ďakujem Doc. RNDr. Jiřimu Páchovi, DrSc za dôveru, trpezlivé a obetavé vedenie celej diplomovej práce a za mnohé odborné konzultácie i cenné rady v priebehu celej práce.

Ďakujem RNDr. Liborovi Mrnkovi, PhD za predanie bohatých skúseností z oblasti teoretických, praktických a metodických poznatkov, pomoc pri rozsiahlejších experimentoch, konštruktívnu kritiku a zasvätenie do tajov vedeckého „know-how“.

Ďakujem RNDr. Jane Bryndovej, PhD za odovzdanie cenných znalostí metodických postupov a celému kolektívu oddelenia Funkce epitelu Fyziologického ústavu AV ČR za konštruktívne odborné a metodické diskusie i rady.

Ďakujem Prof. Dr. Martinovi Dienerovi (Justus-Liebig-Universität, Gießen) za poskytnutie vzoriek myenterického plexu a Dr. Jaroslavovi Vorlíčkovi za konzultácie štatistickej analýzy.

Ďakujem Mgr. Valérii Molnárovej a Mgr. Markéte Rybovej za jazykovú korektúru formálnej stránky textu.

Nemalé poďakovanie vyjadrujem svojim rodičom za plnú dôveru a trvalú morálnu i materiálnu podporu počas celého štúdia a vzniku tejto práce.

Prehlasujem, že som prácu vypracoval samostatne na základe poznatkov z literatúry, konzultácii so školiteľom a vlastných výsledkov. Všetky použité zdroje sú uvedené v zozname literatúry.

V Prahe 10.5.2006

Matúš Soták

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, overlapping letters and lines, positioned above a dotted line.

.....

1. ÚVOD	7
2. LITERÁRNY PREHĽAD	9
2.1. SYNTÉZA MELATONÍNU	10
2.2. MELATONÍN A BIOLOGICKÉ HODINY	13
2.2.1. ORGANIZÁCIA VNÚTORNÝCH HODÍN	13
2.2.2. MOLEKULÁRNA PODSTATA CIRKADIÁNEJ RYTMICITY	14
2.2.3. MOLEKULÁRNA PODSTATA PRENOSU SVETELNÉHO SIGNÁLU	16
2.3. FUNKCIE MELATONÍNU V ORGANIZME	16
2.4. RECEPTORY MELATONÍNU	18
2.4.1. VÄZBOVÉ MIESTA PRE MELATONÍN	18
2.4.1.1. Väzbové miesta pre melatonín v CNS	18
2.4.1.2. Väzbové miesta pre melatonín v periférnych orgánoch	20
2.4.2. IDENTIFIKÁCIA MELATONÍNOVÝCH RECEPTOROV	22
2.4.2.1. Vysokoafinitné melatonínové receptory ML1	23
2.4.2.1.1. MT1 izoforma vysokoafinitného melatonínového receptoru v CNS	24
2.4.2.1.2. MT1 izoforma vysokoafinitného melatonínového receptoru na periférii	26
2.4.2.1.3. Intracelulárne pôsobenie melatonínu cez MT1 receptor	27
2.4.2.1.4. MT2 izoforma vysokoafinitného melatonínového receptoru	29
2.4.2.1.5. Intracelulárne pôsobenie melatonínu cez MT2 receptor	30
2.4.2.1.6. Mel1c izoforma vysokoafinitného melatonínového receptoru	30
2.4.2.2. Nízkoafinitné melatonínové receptory ML2 (= MT3)	30
2.4.2.3. Jadrové receptory	31
2.5. MELATONÍN V GIT	32
2.5.1. GIT – GASTROINTESTINÁLNY TRAKT	32
2.5.2. RYTMICITA V GIT	32
2.5.3. MELATONÍN A JEHO RECEPTORY V GIT	33
2.5.4. PÔVOD MELATONÍNU V GIT	35
2.6. ÚČINKY MELATONÍNU V GIT	35
2.6.1. STIMULÁCIA Cl ⁻ SEKRÉCIE	35
2.6.2. REGULÁCIA HCO ₃ ⁻ SEKRÉCIE	36
2.6.3. STIMULÁCIA INTRACELULÁRNEHO Ca ²⁺	38

2.6.4.	INHIBÍCIA AMILORID-SENZITÍVNEJ ABSORPCIE Na ⁺	40
2.6.5.	MODULÁCIA SEKRÉCIE PANKREATICKÝCH ENZÝMOV	41
2.6.6.	VPLYV NA SEKRÉCIU INZULÍNU	41
2.6.7.	VPLYV NA ČREVNÚ MOTILITU	42
2.6.8.	ANTIOXIDAČNÝ ÚČINOK	43
2.6.9.	ANTIKANCEROGÉNNY A PROAPOPTOTICKÝ ÚČINOK	44
3.	<u>CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE</u>	45
4.	<u>MATERIÁL A METÓDY</u>	46
4.1.	POUŽITÉ ZVIERATÁ	46
4.2.	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	46
4.3.	POUŽITÉ PRÍSTROJE	47
4.4.	POUŽITÝ SOFTWARE	48
4.5.	METÓDA NAPĀŤOVÝ ZÁMOK (VOLTAGE-CLAMP)	48
4.5.1.	ODOBRATIE TKANIVA	48
4.5.2.	APARATÚRA NAPĀŤOVÉHO ZÁMKU	48
4.6.	METÓDA REAL-TIME RT-PCR	50
4.6.1.	ODOBRATIE TKANIVA	50
4.6.1.1.	Špecificky izolované tkanivo myenterického plexu	51
4.6.2.	IZOLÁCIA RNA	51
4.6.3.	REVERZNÁ TRANSKRIPCIA	52
4.6.4.	KVANTIFIKÁCIA CDNA	53
4.6.4.1.	Kvantifikácia MT1 pomocou Roche Lightcycler FastStart DNA Master	55
4.6.4.2.	Kvantifikácia MT1 pomocou Qantitect SYBR Green Master mix	57
4.6.4.3.	Kvantifikácia MT2 pomocou Qantitect SYBR Green Master mix	58
4.6.5.	„NESTED“-PCR	59
4.6.5.1.	Podmienky reakcie	60
4.6.6.	ANALÝZA A VYJADRENIE DÁT	60
4.7.	ŠTATISTIKA	62
4.7.1.	HODNOTENIE VÝSLEDKOV MERANÍ NAPĀŤOVÝM ZÁMKOM	62
4.7.2.	ŠTATISTIKA VÝLEDKOV ANALÝZY REAL-TIME RT-PCR	62

4.7.2.1.	Analýza bazálnych hladín expresie v jednotlivých tkanivách	62
4.7.2.2.	Analýza cirkadiálneho rytmu expresie	62
4.7.2.3.	Analýza hladín expresie po experimentálnom hladovaní	63
5.	<u>VÝSLEDKY A DISKUSIA</u>	64
5.1.	URČENIE VPLYVU MELATONÍNU NA TRANSEPITELOVÝ TRANSPORT V DISTÁLNOH HRUBOM ČREVE	64
5.2.	INHIBIČNÝ VPLYV MELATONÍNU NA PGE ₂ STIMULOVANÝ VZOSTUP ISC	66
5.3.	STANOVENIE HLADINY EXPRESIE mRNA MT1 RECEPTORU V EPITELOVEJ A SUBEPITELOVEJ VRSTVE JEDNOTLIVÝCH SEGMENTOV ČREVA	68
5.4.	STANOVENIE EXPRESIE mRNA MT1 RECEPTORU V NEURÓNOCH MYENTERICKÉHO PLEXU	71
5.5.	STANOVENIE 24 HODINOVÉHO PROFILU EXPRESIE mRNA MT1 RECEPTORU V SUBEPITELI DISTÁLNEHO HRUBÉHO ČREVA	72
5.6.	SLEDOVANIE ZMIEN EXPRESIE mRNA MT1 RECEPTORU PRI ZMENE FYZIOLOGICKÝCH PODMIENOK	74
5.6.1.	STANOVENIE ZMIEN EXPRESIE mRNA MT1 RECEPTORU V SUBEPITELOVOM TKANIVE ČREVNÝCH SEGMENTOV ZA PODMIENOK HLADOVANIA	75
5.7.	STANOVENIE EXPRESIE mRNA MT2 RECEPTORU V ČREVNÝCH SEGMENTOCH	78
6.	<u>ZÁVER</u>	81
7.	<u>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY</u>	83
8.	<u>ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK</u>	98

1. Úvod

Organizmy žijú v prostredí, ktoré permanentne podlieha zmenám a mnohé z nich sa cyklicky opakujú. Pre organizmus je preto výhodné tieto zmeny registrovať a príslušne na ne reagovať denno-nočným i ročným zmenám. U živočíchov sa tak objavuje rytmicita vnútorných procesov ovplyvnená striedaním dňa a noci, striedaním ročných období, dostupnosťou potravy a vhodnými podmienkami pre rozmnožovanie.

Molekulou, ktorá je efektorom vnútornej cirkadiánnej i cirkaanuálnej rytmicity organizmu je melatonín. Jeho prítomnosť bola dokladovaná u rôznych zástupcov živočíšnej ríše, vrátane nižších živočíchov i rastlinnej ríše. Najviac preskúmaná úloha i mechanizmus účinku je u zástupcov cicavcov. Melatonín je tvorený v epifýze, a jeho tvorba je regulovaná vnútornými biologickými hodinami (pacemakerom), ktoré sú u cicavcov lokalizované v suprachiazmatických jadrách, ako i svetelnými podnetmi, ktoré inhibujú tvorbu samotného melatonínu.

Koncentrácia melatonínu v plazme je približne 10 krát vyššia v noci ako cez deň, keď organizmus prijíma svetelné signály. Platí to rovnako pre živočíchov aktívnych cez deň i aktívnych v noci.

Cirkadiánna rytmicita koncentrácie plazmatického melatonínu je signálom sprostredkovávajúcou informáciu o „aktuálnej fáze dňa“ a dĺžka trvania zvýšenej hladiny plazmatického melatonínu je informáciou o aktuálnej ročnej fáze (v lete je trvanie vysokej koncentrácie melatonínu dlhšie ako v zime). Podľa toho melatonín príslušne reguluje rôzne procesy v organizme súvisiace so striedaním aktivity a inaktivity, rovnako ako sa podieľa na sprostredkovaní sezónneho správania vrátane nástupu ruje, výmeny srsti, zhadzovania parohov, načasovania rozmnožovania, synchronizácie mláďat s matkou a pod.

Na úrovni CNS sú cieľovými miestami pôsobenia melatonínu štruktúra vlastných biologických hodín (suprachiazmatické jadrá), epifýza, kde sa melatonín tvorí a hypofýza, ktorá sprostredkováva tvorbu a uvoľňovanie širokého spektra hormónov. CNS však nie je jediným zdrojom melatonínu a jeho syntéza bola ukázaná aj v retine, mieste prijímania svetelných signálov. Prítomnosť melatonínu a enzýmov jeho syntézy v ďalších periférnych orgánoch (gastrointestinálny trakt, semenníky, vaječníky, cievny systém, imunitný systém) je dôkazom pleiotropného účinku melatonínu v rámci celého organizmu.

Gastrointestinálny trakt je zásobárňou niekoľkonásobne väčšieho množstva melatonínu, než je krvná plazma a je veľmi pravdepodobným miestom syntézy melatonínu, ktorý tu zohráva rôzne úlohy. Bol ukázaný jeho vplyv na transportné procesy v čreve (stimulácia i inhibícia sekrécie resp. absorpcie niektorých iónov), vplyv na črevnú motilitu a aktivitu črevnej svaloviny, modulácia sekrécie pankreatických enzýmov i inzulínu, ako i priame i nepriame antioxidantné účinky, proapoptotické účinky a modulačný vplyv na imunitný systém.

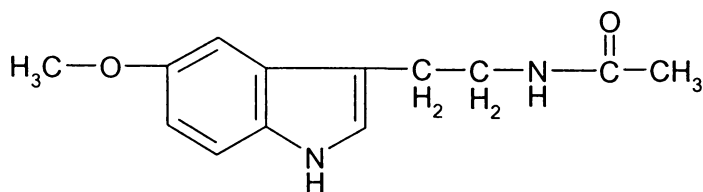
V tejto práci sme sa preto zaoberali objasňovaním úlohy melatonínu na transportné procesy v hrubom čreve, ako i podrobnou štúdiou popisujúcou rozloženie a expresiu melatonínových receptorov v tráviacej trubici v rostro-kaudálnej i mukózne-seróznej osi čreva. Ďalej sme zisťovali vplyv svetelných signálov a následne vplyv zmeny fyziologických podmienok na bazálnu hladinu miery expresie melatonínových receptorov v tráviacej trubici.

2. Literárny prehľad

Organizmy žijú väčšinou v prostredí podliehajúcim cyklickým zmenám. Základnými meniacimi sa atribútmi je striedanie svetelnej a tmavej fázy dňa, čo súvisí aj s príjmom potravy, stavom aktivity resp. odpočinku a zmenami telesnej teploty najmä u vyšších živočíchov. U živočíchov žijúcich v miernom pásme sa často vyskytuje sezónnosť, to znamená regulácia reprodukčnej aktivity a akumulácia zásob u hibernujúcich zvierat počas ročného cyklu.

Rytmické zmeny v niektorých fyziologických atribútoch sa v organizme hojne vyskytujú, napr. v príjme potravy, tekutín, telesnej teplote a chovaní celého organizmu (hniezdenie, spievanie u vtákov), v materskom období u cicavcov striedaním doby aktivity (aktívne vyhľadávanie potravy) a inaktivity (kojenie, spánok). S meniacim sa vonkajším správaním súvisí aj rytmicita vnútorných biologických mechanizmov (vazopresín, ACTH, kortizol). Silné cyklické zmeny v plazmatickej koncentrácii počas dňa a noci vykazuje aj melatonín, epifyzáry hormón.

Melatonín (obr. 1) je potentná lipofilná molekula, vznikajúca primárne v epifýze syntézou z L-tryptofánu a je hlavným efektorom cirkadiánnej rytmicity organizmu. Jeho koncentrácia v krvnej plazme je určovaná najvýznamnejšou mierou množstvom melatonínu vznikajúceho v epifýze. Plazmatická koncentrácia v priebehu noci, kedy organizmus nedostáva svetelné signály (resp. mnohonásobne menej intenzívne) je 5 – 15 krát vyššia ako počas dňa (Cogburn et al. 1987, Honma et al. 1997, Vaněček 1998). To platí rovnako pre živočíchov aktívnych cez deň i živočíchov aktívnych v noci. Melatonín je tak schopný nastavovať vnútorné hodiny, ktoré za podmienok kedy organizmus nemá žiadne cyklické stimuly z prostredia (konštantná tma, konštantná teplota), bežia svojím vlastným pravidelným rytmom so stálou vnútornou periódou, ktorá je približne 24 hodín. Synchronizácia s vonkajším prostredím je pre organizmus výhodná a potrebná. Melatonín plní túto úlohu nastavovaním vnútorných hodín podľa stimulov z prostredia (Redman et al. 1983, Underwood a Harless 1985, Zimmerman a Menaker 1975).



Obr. 1. Štruktúra melatonínu (5-metoxi-N-acetyltryptamín).

Ďalšou veľmi dôležitou funkciou melatonínu u cicavcov je úloha v regulácii sezónnych rytmov, sexuálneho správania a výmeny srsti. Sezónne zvieratá reagujú na zmenu dĺžky trvania melatonínového signálu v plazme, ktorý sa predlžuje so skracujúcim sa dňom v období vstupu do zimy a skracuje sa s predlžujúcim sa dňom v období prechodu do leta. Môžu tak vhodne reagovať sezónnym chovaním (Pevet 2003) – nástupom ruje a s ňou spojenými fyziologickými zmenami, rozmnožovaním, zhadzovaním parohov u jeleňov, stratou alebo nárastom zimnej srsti u líšky polárnej, zmenou v príjme potravy (hladovanie, príprava na hibernáciu) a hibernáciou.

2.1. Syntéza melatonínu

Vo všetkých miestach produkcie prebieha syntéza v zásadných krokoch rovnako a hlavným regulačným faktorom je rytmicita expresie a aktivity enzýmov podieľajúcich sa na syntéze. Hlavným zdrojom melatonínu je epifýza. Syntéza prebieha (obr. 2) z aminokyseliny L-tryptofánu. Enzým tryptofánhydroxyláza (TPOH), lokalizovaný v mitochondrii, hydroxyluje tryptofán v polohe 5, za vzniku 5-hydroxytryptofánu, z ktorého je následne v cytoplazme syntetizovaný 5-hydroxytryptamín (5-HT, serotonin) dekarboxylázou aromatických kyselín (AAAD). 5-HT je ďalej metabolizovaný dvoma kľúčovými enzýmami, ktorých regulácia zohráva hlavnú úlohu v následnej rytmicite produkovaného melatonínu. Arylalkylamín-N-acetyltransferáza (AA-NAT) premieňa 5-HT na N-acetylserotonín, ktorý je vzápätí O-metylovaný hydroxyindol-O-metyltransferázou (HIOMT), za vzniku fyziologicky aktívneho 5-metoxy-N-acetyltryptamínu (melatonín) (Simonneaux a Ribelayga 2003). Zúčastňujúce sa enzýmy sú zapojené nielen v tvorbe, ale zároveň aj v regulácii množstva produkovaného melatonínu. Rytmujuce hladiny expresie či aktivity v epifýze boli zaznamenané v TPOH (Shibuya et al. 1977, Ehret et al. 1991, Privat et al. 1999, Sugden 2003), s maximom počas tmavej fázy dňa. Aktivita i expresia AA-NAT podlieha rovnako prudkým zmenám počas svetelnej a tmavej fázy. Prudký nárast aktivity bol zaznamenaný s nástupom tmavej fázy (Klein a Weller 1970, Borjigin et al. 1995). Expresia AA-NAT podlieha regulácii svetelnými signálmi a je ovplyvnená predĺženým svetelným signálom (Illnerová a Vaneček 1987). HIOMT, posledný enzým v syntetickej dráhe melatonínu je takisto dôležitý vo vplyve na výsledné rytmické kolísanie koncentrácie melatonínu. Jeho silná

expresia bola ukázaná v epifýze aj retine (Wiechmann a Craft 1993). Zaznamenaný rytmus v enzýmovej aktivite (McLeod a Cairncross 1993) nebol vždy veľmi výrazný (Ribelayga et al. 1997) ako u AA-NAT, v niektorých štúdiách nebol zaznamenaný vôbec (Coon et al. 1999).

Bolo vyslovených viacero hypotéz, ktorý z enzýmov je limitujúcim a tak zodpovedným za výsledný rytmus v konečnom množstve tvoreného melatonínu. Môže to byť TPOH (Privat et al. 1999), ale pravdepodobnejší sa ukazuje AA-NAT (Borjigin et al. 1995), ktorý je v metabolických krokoch bližšie ku konečnému produktu. Hypotézu, že AA-NAT je zodpovedná za reguláciu dĺžky trvania píku zvýšenej nočnej hladiny, a že výsledkom HIOMT je veľkosť amplitúdy vyššej nočnej koncentrácie melatonínu, vyslovujú Simonneaux a Ribelayga (2003).

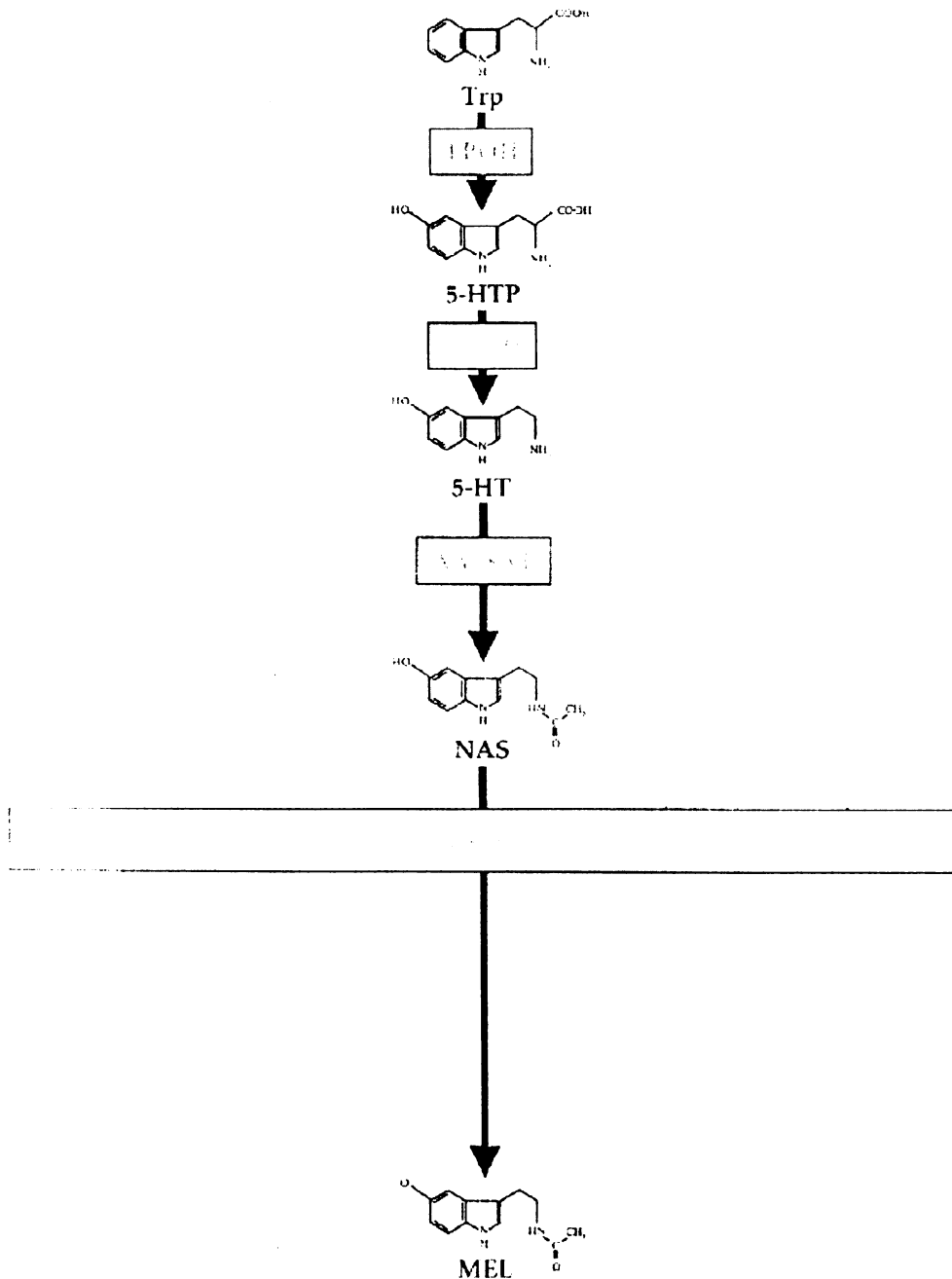
Hlavným zdrojom plazmatickeho melatonínu je epifýza, ale ako miesta tvorby sa ukazujú aj niektoré periférne orgány. Retina bola ukázaná ako zdroj nezanedbateľného množstva melatonínu a je považovaná za miesto syntézy (Gern a Ralph 1979) aj vďaka identifikácii enzýmov syntézy, ktorých expresia podlieha cirkadiánnemu rytmu (Privat et al. 1999, Iuvone 1990, Besharse a Iuvone 1983, Wiechmann a Hollyfield 1987).

Melatonín pochádzajúci z retiny neprispieva k plazmatickej hladine výrazne, pretože u pinaelektomovaných zvierat (zvierat operačne zbavených epifýzy) bol rytmus plazmatickej hladiny zrušený (Cogburn et al. 1987). Melatonín v retine podlieha v produkcii rovnako cirkadiánnemu rytmu a uprostred skotofázy dosahuje výrazného píku, oproti koncentrácii 15 krát nižšej počas fotofázy (Cogburn et al. 1987). Retina obsahuje aj štruktúry, ktoré môžu vykazovať vlastný rytmus v aktivite enzýmov a následnej produkcii i lokálnej koncentrácii melatonínu. V gangliách retiny ukázali Garbarino-Pico et al. (2004) zvýšenú aktivitu AA-NAT a pík maxima koncentrácie melatonínu počas svetelnej fázy dňa (LD cyklus), resp. počas subjektívneho dňa v konštantnej tme (DD cyklus). To potvrdzuje, že retina alebo jej súčasti môžu mať vlastný lokálny oscilátor, ktorý môže byť nezávislý na centrálnom pacemakeri.

Harderianova žľaza je ďalším miestom produkcie melatonínu (Cogburn et al. 1987), ale k výraznej rytmicite ovplyvňovanej svetlom tu nedochádza. Melatonín tu bol lokalizovaný aj v jadrových štruktúrach Harderianovej žľazy (Coto-Montes et al. 1996).

Menej je známe o syntéze melatonínu v gastrointestinálnom trakte. Melatonín tu bol nájdený v rôznych častiach vo vysokej koncentrácii (Poon et al. 1996, Messner et al. 2001, Bubenik a Pang 2004) a za miesto jeho syntézy sú považované enterochromafinné

bunky (Raikhlin et al. 1975) epitelu tráviacej trubice. To, že melatonín nie je len vychytávaný z centrálného obehu, ale že jeho syntéza je priamo lokalizovaná v gastrointestinálnom trakte, podporujú identifikácie expresie enzýmov AA-NAT a HIOMT v niektorých orgánoch tráviaceho systému (Stefulj et al. 2001).



[Simonneaux V, Ribelayga C. Pharmacol Rev. 2003 Jun;55(2):325-95.]

Obr. 2. Syntéza melatonínu. Prekurzorom je aminokyselina L-tryptofán.

Trp – L-tryptofán, 5-HTP – 5-hydroxytryptofán, 5-HT – 5-hydroxytryptamín (serotonín), NAS – N-acetylserotonín, MEL – melatonín, TPOH – tryptofánhydroxyláza, AAAD – dekarboxyláza aromatických aminokyselín, AA-NAT – arylalkylamín-N-acetyltransferáza, HIOMT – hydroxyindol-O-metyltransferáza.

Uvažuje sa aj o tvorbe melatonínu priamo v bunkách imunitného systému, čomu nasvedčuje schopnosť melatonínu ovplyvňovať intracelulárne procesy v bunkách imunitného systému (Zhang et al. 2004) ako i expresia melatonínových membránových (Carrillo-Vico et al. 2003, Pozo et al. 1997) i pravdepodobných jadrových receptorov (Steinhilber et al. 1995, Garcia-Maurino et al. 1997, Guerrero et al. 2000b, Carrillo-Vico et al. 2003, Pozo et al. 2004), spolu s expresiou kľúčových enzýmov syntézy (Pozo et al. 2004).

Melatonín sa vyskytuje v širokom spektre zástupcov živočíšnej i rastlinnej ríše. Jeho prítomnosť bola dokladovaná u svrčka (*Gryllus campestris*), kde bola ukázaná aj rytmicita v jeho hladine s maximom počas tmavej fázy (Itoh et al. 1995). Nielen živočíšna ríša produkuje melatonín, jeho prítomnosť bola detekovaná aj u zástupcov rastlín (Hattori et al. 1995).

2.2. Melatonín a biologické hodiny

2.2.1. Organizácia vnútorných hodín

U cicavcov bolo zistené, že každý živočích má svoju vlastnú endogénnu periódu, ktorá nie je presne 24 hodín, ale jej dĺžka sa pohybuje v úzkom okolí. Je do istej miery druhovo špecifická, ale aj medzi organizmami jedného druhu sa vyskytujú individuálne rozdiely. Pre jednotlivca je však stála a geneticky podmienená. U myši je zvyčajne kratšia ako 24 hodín (Edgar et al. 1991), u človeka obyčajne dlhšia než 24 hodín (Middleton et al. 1996, Middleton et al. 1997). Bolo ukázané, že v podmienkach konštantnej tmy a neprítomnosti akýchkoľvek cyklických stimulov (zmeny okolitej teploty a pod.), myši „voľne bežia časom“, čo znamená že rytmus v aktivite a inaktivite (meraný ako miera pohybovej aktivity zvierat'a) beží podľa vlastnej endogénnej periódy. Avšak pri chove na štandardných podmienkach svetelnej periódy (LD 12:12), je tento rytmus aktivity prispôbený svetelnému režimu. Vyplýva z toho, že svetelný signál dokáže vnútorné hodiny nastavovať, a tak prispôbiť endogénny rytmus podmienkam prostredia (Yamazaki et al. 2000).

Nastavovanie vnútorných hodín, podľa okolitého prostredia môže byť uskutočňované u rôznych organizmov viacerými signálmi (príjem potravy, vybudenie,

striedanie teploty prostredia a pod.). Najvýraznejším podnetom je však svetelný signál. Umožňuje tzv. „fázový posun“, tj. posun vnútornej fázy podľa podmienok prostredia, pričom sa jedná buď o predbehnutie (phase advance) alebo zbrzdzenie (phase delay). Rozdielne je vnímanie signálu v závislosti od aktuálneho stavu (aktuálnej fázy) vnútorných hodín. Svetelný pulz v druhej polovici subjektívnej noci, spôsobí predbehnutie vnútorných hodín (organizmus synchronizuje vnútorné hodiny podľa okolia a svetelný signál je vnímaný ako „začiatok dňa“, preto subjektívny začiatok dňa postupne prispôsobí tomuto podnetu) Naproti tomu, svetelný pulz v prvej polovici subjektívnej noci, spôsobí zbrzdzenie vnútorných hodín (organizmus tento svetelný signál interpretuje ako signál „ešte je stále deň“, a tak vnútorné hodiny zbrzdí) (Mrosovsky a Salmon 1987, Yamazaki et al. 2000). Vyplýva z toho, že je dôležitý nielen samotný svetelný pulz, ale aj tzv. svetelná história.

Samotný pacemaker (generátor cirkadiálneho rytmu) musí pre správnu synchronizáciu dostávať signály z prostredia. Úlohu pacemakera plnia u rôznych organizmov rôzne štruktúry. U motýľa je to oblasť niekoľkých špecifikovaných buniek v mozgu, u švába optické laloky v mozgu, u jašterice epifýza, u ostatných plazov tzv. parietálny orgán, napojený na epifýzu. U vtákov existuje trojica orgánov podieľajúcich sa do určitej miery na generovaní rytmu (oko, epifýza, SCN). U cicavcov sú týmto centrom SCN (Reppert a Weaver 1997). To, že centrom sú práve SCN bolo ukázané experimentom, kde u pokusného zvierat'a zbaveného SCN a implantovaní SCN donora, došlo k upraveniu cirkadiálnej periódy podľa SCN donora (Boer et al. 1998).

Pri rozvoľnení buniek SCN a sledovaní neurálnej aktivity jednotlivých buniek sa zistilo, že v rámci štruktúry SCN, ktoré navonok vykazujú vlastnú stabilnú endogénnu rytmicitu, jednotlivé bunky SCN majú autonómny rytmus, ktorý sa však medzi jednotlivými bunkami líši ako v dĺžke vlastnej periódy, tak vo fáze v ktorej sa aktuálne nachádza (Welsh et al. 1995).

2.2.2. Molekulárna podstata cirkadiálnej rytmicity

SCN sú centrom cirkadiálnej rytmicity a vlastným pacemakerom (vnútornými hodinami, „udávačom rytmu“). Vlastná rytmicita je udržiavaná cyklickou expresiou špecifických génov, ktorých proteíny svoju expresiu navzájom regulujú v časovej slučke, čo má za následok pravidelný rytmus v aktivite a aktuálnom aktívnom množstve toho ktorého proteínu. Jednotlivé proteíny následne ovplyvňujú expresiu rady mnohých

d'alších cieľových génov. Takéto gény, ktoré spätoväzbovo udržujú pravidelný cyklus vlastnej expresie, sa nazývajú tzv. hodinové gény. Patria medzi ne gény *Per1*, *Clock*, *Bmal* a *Tim*, identifikované v SCN s rytmickou expresiou (Jin et al. 1999). V spätoväzbovej mašinérii vzájomnej stimulácie a inhibície expresie, tak udržujú stály cyklus. Pre správne fungovanie organizmu v danom prostredí, je potrebné tento vnútorný cyklus prispôbovať okolitému prostrediu, preto je tento systém „nastaviteľný“ svetelnými signálmi z prostredia – jednak priamo tzv. retinohypotalamickým traktom (RHT) (Barrenetxe et al. 2004), a jednak melatonínom (jeho produkcia rovnako podlieha svetelným podnetom) schopným sprostredkovať fázový posun endogénnej periódy (Liu et al. 1997).

Mašinéria spätoväzbových kľúčiek vzájomnej stimulácie a inhibície expresie jednotlivými účastníkmi sa proteínmi bola dobre popísaná u *Drosophily melanogaster*, kde sa účastnia proteíny *Clock*, *Bmal1*, *Per* (period) a *Tim* (timeless) (Williams a Sehgal 2001). V jadre je proteín *Bmal1* exprimovaný konštitutívne a tvorí komplex s proteínom *Clock*, ktorého expresia je regulovaná. Komplex *Clock-Bmal1* spätoväzbovo inhibuje expresiu mRNA *Clock* génu. Zároveň tento komplex stimuluje expresiu mRNA génov *Per* a *Tim*, ktorých proteíny *Per* a *Tim* sú následne fosforylované (*Tim-P*, *Per-P*) špecifickými kinázami a vytvárajú komplex *Tim-P-Per-P*. Tento komplex fosforylovaných proteínov inhibuje komplex *Clock-Bmal1*, čím odblokováva expresiu *Clock* génu (ktorá bola komplexom *Clock-Bmal1* inhibovaná) a zároveň zablokuje vlastnú expresiu inhibovaním komplexu *Clock-Bmal1*, ktorý ich expresiu stimuloval.

Celý tento proces expresie mRNA, vzniku proteínov a spätoväzbové inhibície vytvára cyklus, ktorý trvá približne 24 hodín, a je ovplyvniteľný svetlom. Svetelný signál je sprostredkovaný pravdepodobne proteínom *Cry*, ktorý dokáže hyperfosforylovať proteín *Tim*. Hyperfosforylovaný *Tim* je vzápätí ubikvitinovaný a degradovaný. Svetlo tak dokáže trvanie daného cyklu ovplyvniť. U cicavcov (Reppert a Weaver 2001) je situácia podobná, do hry však vstupujú ďalšie proteíny, ktoré sa navzájom ovplyvňujú a môžu byť rôzne regulované. Funkciu *Tim-Per* komplexu tam hraje komplex fosforylovaných proteínov *Cry-Per2-Per1*. Expresia d'alších cieľových génov je zabezpečená tým, že *Clock-Bmal1* komplex stimuluje okrem *Per*, *Tim* a *Cry* génov rôzne ďalšie cieľové gény skorej odpovede.

2.2.3. Molekulárna podstata prenosu svetelného signálu

Signál svetla sa k SCN dostáva priamo i nepriamo. Nepriamo signálom melatonínu, ktorého tvorba podlieha svetelnej signalizácii a priamo dvoma základnými dráhami. Svetelný signál z oka je prenášaný do talamu a odtiaľ do SCN (úlohu mediátora hraje neuropeptid Y), druhou významnejšou dráhou je RHT (Hannibal 2002). Je to priame spojenie sietnice a SCN, a môže byť nezávislé na svetlocitlivých senzoch tyčinkách a čapíoch. Je to redundantný mechanizmus, ktorý využíva svetlocitlivé gangliové bunky sietnice. Časť gangliových buniek je svetlocitlivá, asi 2 – 3 %. Tieto bunky obsahujú pigment melanopsín (Hannibal a Fahrenkrug 2002), ktorý je podobný rodopsínu, a je schopný reagovať konformačnou zmenou na svetelný podnet, a odovzdať tak signál cez RHT do SCN. Hlavnými mediátormi v tejto dráhe sú glutamát a PACAP (hypofyzárny adenylát cyklázu aktivujúci peptid) (Hannibal 2002). V RHT sa po aktivovaní melanopsínu prenesie signál k SCN, kde sa uvoľní glutamát resp. PACAP a na svojich receptoroch na bunkách SCN spôsobí intracelulárne zmeny v hladine druhého posla (cAMP), čoho následkom sú aktivované príslušné transkripčné faktory (Hannibal 2002). Jedna z dráh vedie k stimulácii *c-fos* (Trávničková et al. 1996), keď vysoká hladina cAMP stimuluje fosforyláciu CREB, ktorý ako transkripčný faktor stimuluje expresiu *c-fos* – tzv. okamžitého ranného génu („early response gene“). Po dimerizácii pôsobí *c-fos* proteín ako transkripčný faktor pre gény neskorej odpovede („late response genes“) (Jáč et al. 2000).

2.3. Funkcie melatonínu v organizme

Jedným z hlavných efektov melatonínu je schopnosť „nastavovať“ vnútorné hodiny podľa stimulov z okolitého prostredia a túto informáciu sprostredkovať cieľovým štruktúram v celom organizme. Melatonín ovplyvňuje expresiu receptorov i hustotu vlastných väzbových miest v SCN a pars tuberalis, čo svedčí o úlohe samotného melatonínu i o úlohe SCN v udržovaní cirkadiánnej rytmicity (Neu a Niles 1997, Guerrero et al. 2000).

Melatonín inhibuje v SCN aktivitu neurónov (tzv. „neuronal firing“) (Liu et al. 1997). Potlačenie nervovej aktivity SCN môže hrať úlohu v zmene schopnosti SCN

reagovať na stimuly, ktoré môžu participovať na cirkadiánnej rytmicite, napr. na regulácii spánku, sekrécii hormónov a pod.

Fázový posun sprostredkováva v SCN s najväčšou pravdepodobnosťou receptor MT2, keďže táto schopnosť nebola zrušená (len mierne oslabená) u zvierat s cieľovou deléciou génu (knock-out) MT1 receptoru (Liu et al. 1997). Naproti tomu, u takýchto zvierat schopnosť melatonínu inhibovať „neuronal firing“ v SCN úplne vymizla, svedčiac o tom, že túto funkciu sprostredkováva pravdepodobne MT1 receptor. Toto zistenie je dôležité aj z hľadiska funkčného oddelenia efektu „neuronal firing“ a fázového posunu, a zdá sa tak, že „neuronal firing“ nedeterminuje schopnosť melatonínu posúvať endogénnu fázu subjektívneho dňa, resp. noci. Citlivosť SCN na melatonín, výsledkom ktorého je fázový posun, nie je rovnaká v priebehu celého cirkadiánneho cyklu, ale najviac sa prejavuje v subjektívnom čase prechodu svetlo/tma a tma/svetlo (McArthur et al. 1997).

MT2 receptor je považovaný za sprostredkovateľa fázového posunu, čo dokladovali Hunt et al. (2001) i McArthur et al. (1997). Tento záver však nie je možné úplne generalizovať, vzhľadom na to, že sezónne chovanie a cirkadiánna rytmicita je pozorovaná u škrečka, ktorému prirodzene chýba funkčný gén pre MT2 (Weaver et al. 1996), a tak nedokáže exprimovať funkčný proteín. Možno preto uvažovať o možnom spôsobe čiastočného nahradenia funkčnosti MT2 receptoru receptorom MT1 a o čiastočnej funkčnej redundandnosti medzi dvoma izoformami membránového receptoru. Možnosť čiastočnej funkčnej nahraditeľnosti receptorov MT1 a MT2 v sprostredkovaní fyziologických odpovedí bola ukázaná i u myši (Jin et al. 2003).

Pars tuberalis hypofýzy je jednou z cieľových štruktúr vnútorných hodín a cirkadiánnej rytmicity, o čom svedčí silná expresia melatonínových receptorov a silná väzba melatonínu v tejto štruktúre. V pars tuberalis je rytmicky exprimovaných viacero génov, jednak transkripčný inhibítor *Icer* (inducible cyclic AMP early repressor) a hodinový gén *Per1*. Nočná zvýšená hladina melatonínu je kľúčová pre udržanie rytmickej aktivity expresie týchto génov. Pinealektómia zruší rytmickú expresiu génov v pars tuberalis a predĺženie nočnej fázy LD cyklu spôsobí zníženie amplitúdy *Per1* a *Icer* expresie v pars tuberalis. Za normálnych svetelných podmienok LD cyklu expresia *Per1* a *Icer* prudko stúpa po prechode z tmavej do svetlej fázy dňa, čo by vysvetľovalo inhibičný vplyv predĺženej nočnej fázy (von Gall et al. 2002.).

V pars tuberalis myši sú cyklicky exprimované hodinové gény *Per1*, *Cry1*, *Clock*, *Bmall* (von Gall et al. 2005), narozdiel od *Per2* a *Cry2*, u ktorých rytmus zistený nebol.

Takýto vzorec expresie bol zistený u divokého kmeňa myši ako i u myši s cieľenou deléciou génu pre MT2 receptor. Expresia *Per1*, *Cry1*, *Clock* a *Bmal1* bola dramaticky znížená u MT1 knock-out myši (von Gall et al. 2005), čo svedčí o kľúčovej úlohe MT1 receptoru v udržovaní rytmickej expresie hodinových génov v pars tuberalis a potvrdzuje zásadnú úlohu melatonínu v udržovaní tejto rytmicity.

2.4. Receptory melatonínu

2.4.1. Väzbové miesta pre melatonín

2.4.1.1. Väzbové miesta pre melatonín v CNS

Cieľové tkanivá melatonínu interpretujú samotný melatonínový signál prostredníctvom receptorov. Experimentálne boli identifikované najprv väzbové miesta analógu melatonínu, radioaktívne značeného 2-[¹²⁵I]-melatonínu, ktorý vykazuje podobnú afinitu na väzbových miestach ako melatonín, ale nie úplne rovnakú. 2-[¹²⁵I]-melatonín vykazuje väčšiu schopnosť viazania sa ako melatonín (2-I-melatonín má nižšiu disociačnú konštantnu), čo bolo ukázané na štúdií porovnávajúcej väzbové vlastnosti [³H]-melatonínu a 2-[¹²⁵I]-melatonínu (Kennaway et al. 1994). Disociačná konštanta (K_d) pre 2-[¹²⁵I]-melatonín sa pohybovala v okolí $24 \pm 4,8$ pM, pričom [³H]-melatonín vykazoval hodnoty K_d v okolí 125 ± 21 pM. Väzbové štúdie s použitím 2-[¹²⁵I]-melatonínu tak môžu byť interpretované na kvalitatívnej úrovni lokalizácie melatonínových väzbových miest, resp. receptorov, ale presné disociačné konštanty a farmakologické vlastnosti musia byť z hľadiska fyziologickej funkcie melatonínu v organizme interpretované s vedomím týchto rozdielov.

Takto boli identifikované mnohé väzbové miesta 2-[¹²⁵I]-melatonínu v rôznych orgánoch u rôznych modelových organizmov. Reverzibilnú väzbu 2-[¹²⁵I]-melatonínu ukázali u potkana v SCN a eminentia media Vaneček et al. (1987) a cyklujúci rytmus v intenzite väzby počas svetelnej a tmavej fázy dňa v pars tuberalis a SCN potkana (chovaného na LD 12:12) zaznamenali Gauer et al. (1993) s maximom v CT 9 (cirkadiálny čas, CT 0 je začiatok svetelnej fázy) a minimom v CT 21. Rytmus v hustote väzbových miest a pík maxima v podobnom CT v SCN potkana zaznamenali aj Tenn a Niles (1993), ktorí však identifikovali jeden niekoľko hodín trvajúci pík, a to v CT 8 – CT

12, čo je približne na konci svetelnej fázy. Maximum je v opačnej fáze ako koncentrácia plazmatického melatonínu. To naznačuje možnosť negatívnej regulácie väzbových miest melatonínu v SCN samotným melatonínom. 2-[¹²⁵I]-melatonín sa dobre viazal aj v štruktúrach mozgu škrečka (hypotalamus a hipokampus, Pickering a Niles 1990), ako i kráľika, koňa a ovce (Stankov et al. 1991) s dominantným silným signálom v oblasti pars tuberalis a s nezanedbateľným signálom v SCN a v kortikálnych oblastiach. Podrobnejšiu štúdiu väzbových miest melatonínu v mozgu ovce previedli Bittman a Weaver (1990), keď ukázali na mozgových rezoch väzbové miesta v pars tuberalis hypofýzy, mediolaterálnom septe, hipokampe a SCN. Podobnosť väzbových miest 2-[¹²⁵I]-melatonínu v hypotalame a pars tuberalis u zástupcov domestikovaných kopytníkov, kravy, koňa a osla ukázali (Nonno et al. 1995). U zástupcov vtákov bola identifikovaná väzba 2-[¹²⁵I]-melatonínu v mozgu kurčat'a (Siuciak et al. 1991, Kennaway et al. 1994) i prepelice (*Coturnix japonica*) (Cozzi et al. 1993). Z daných štúdií vyplýva, že melatonín má množstvo väzbových miest v rôznych častiach CNS, čo svedčí o jeho úlohe v centrálnej regulácii fyziologických pochodov organizmu.

Melatonín nezohráva fyziologickú funkciu len u vyšších živočíchov, no o jeho úlohe u nižších stavovcov je známe málo. U niektorých zástupcov boli identifikované jeho väzbové miesta. Preskúmané boli u zástupcov rýb a nižších stavovcov (Vernadakis et al. 1998): u plášťovca *Branchiostoma floridae*, sliznatky *Myxine glutinosa*, mihule *Petromyzon marinus*, raje *Raja erinacea* a pstruha *Oncorhynchus mykiss*. Žiadna špecifická väzba nebola detekovaná u kopijovca a sliznatky, ktorým chýba v anatomickej stavbe štruktúra epifýzy. Naopak, u dospelej mihule bola väzba zaznamenaná v oblasti preoptických jadier a tectum opticum. U pstruha a raje vykazoval 2-[¹²⁵I]-melatonín silnú väzbu v preoptických jadrách, SCN, hypotalame a tectum opticum. Mozog zástupcu obojživelníkov preskúmali Wiechmann a Wirsig-Wiechmann (1993). U žaby *Rana pipiens* sa 2-[¹²⁵I]-melatonín viazal v oblasti telencefalon, diencefalon, mezencefalon a veľmi nápadne v oblastiach súvisiacich s prijímaním a spracovávaním optických podnetov. U plaza *Anolis carolinensis* sa 2-[¹²⁵I]-melatonín špecificky viaže v oblasti diencefalon a v častiach mozgu súvisiacich s príjmom optických podnetov (Wiechmann a Wirsig-Wiechmann 1992). Existencia väzbových miest pre melatonín v štruktúrach nižších stavovcov svedčí o veľmi pravdepodobnej fyziologickej funkcii melatonínu, jednak v cirkadiánnych rytmoch (aj keď tie nemusia byť také silné ako u cicavcov), v interpretácii svetelných signálov a závislosti chovania sa od svetelného rytmu dňa.

2.4.1.2. *Väzbové miesta pre melatonín v periférnych orgánoch*

Retina bola ukázaná ako jedna z dôležitých lokalizácií väzbových miest 2-[¹²⁵I]-melatonínu. Popísané boli väzby u kurčaťa (Dubocovich a Takahashi 1987), prepelice (James et al. 1995), žaby (Wiechmann a Wirsig-Wiechmann 1991) i plaza *Anolis carolinensis* (Wiechmann a Wirsig-Wiechmann 1994). Identifikácii väzbových miest rádioligandu 2-[¹²⁵I]-melatonín v tkanive obličky sa venoval Song so spolupracovníkmi, pričom väzbu popísali v ľudskej obličke (Song et al. 1995). Zároveň v obličke kačice zaznamenali aj variáciu a rozdiel medzi hustotou väzby počas dňa a noci a popísali nárast B_{max} (maximálna hustota väzby) o 50% v prostriedku temnej fázy dňa oproti hodnotám v prostriedku svetelnej fázy, pri nezmenenej hodnote K_d (Song et al. 1992). Nárast hustoty väzbových miest v obličke počas tmavej fázy je odlišný od nárastu väzbových miest v SCN potkana počas svetelnej fázy. Zdá sa tak, že vlastnosti regulácie hustoty väzbových miest i iných procesov melatonínom, môžu podliehať na periférii iným vplyvom, inej interpretácii signálu alebo môžu byť do značnej miery nezávisle od centrálného pacemakera.

Melatonín hrá úlohu u sezónnych zvierat aj v koordinácii reprodukcie, nástupu ruje a dejoch s tým súvisiacich. Túto jeho úlohu a priamu súvislosť potvrdzujú nálezy väzbových miest v reprodukčných orgánoch rôznych živočíchov. U potkana bola zaznamenaná v semenníkoch (Vera et al. 1997), v nadsemenníkoch (Yu et al. 1994), podobne v semenníkoch kačice (Ayre et al. 1994) a v semenníkoch prepelice (Wang et al. 1992), pričom v týchto prípadoch afinita ani hustota väzbových miest 2-[¹²⁵I]-melatonín nevykazovala rozdiely vo svetelnej oproti temnej fáze dňa, pri preukázanom rytmickom cyklovaní koncentrácie plazmatického melatonínu. Obdobná väzba 2-[¹²⁵I]-melatonínu bola zistená aj vo vaječníkoch. V reprodukčných orgánoch nebola preukázaná rytmicita ani zmena hustoty väzby 2-[¹²⁵I]-melatonínu v rôznych časových fázach dňa, a tak plazmatický melatonín na tejto úrovni a v týchto orgánoch pravdepodobne svoje väzbové miesta nereguluje.

Ďalším periférnym systémom s identifikovanými väzbovými miestami je gastrointestinálny trakt. V ľudskom jejunu bola väzba 2-[¹²⁵I]-melatonínu pozorovaná vo vrstve mukózy a submukózy (Pontoire et al. 1993). V duodene kurčaťa bola väzba v mukóznej vrstve intenzívnejšia ako väzba v mukózo-submukóznej vrstve (Pontoire et al. 1993). Odlišnosť väzby počas dňa a noci pozorovali Wan a Pang (1995) v pečeni prepelice, kde väzba vykazovala odlišnosť a pri zachovaní hustoty väzbových miest

(B_{max}) sa zvýšila hodnota K_d o 65% ($p < 0,05$) v prostriedku temnej fázy. Táto pozorovaná variácia sa odlišuje od zistení denno-nočných zmien vo vlastnostiach väzby pozorovaných v obličke kačice, kde zostala disociačná konštanta zachovaná a zmenila sa hustota väzbových miest (Song et al. 1992).

Imunitný systém rovnako vykazuje nálezy väzbových miest 2-[125 I]-melatonínu v orgánoch súvisiacich s imunitným systémom (týmus, slezina) (Yu et al. 1991, Poon et al. 1994), ako i v samotných imunitných bunkách (Calvo et al. 1995).

organizmus	orgán	K_d [pM]	B_{max} [fmol/mg prot.]	zdroj
potkan	SCN, eminentia media	21	8,5	Vaněček et al. 1987
potkan	SCN		3 - 5	Gauer et al. 1993
potkan	pars tuberalis (PT)		30 - 45	Gauer et al. 1993
kurča	mozog	33 - 48	31 - 58	Siuciak et al. 1991
kurča	mozog	24 ± 4,8		Kennaway et al. 1994
kurča	retina	434 ± 56	74 ± 13,6	Dubocovich a Takahashi 1987
prepelica	mozog	35 - 150		Cozzi et al. 1993
škrekčok	hypotalamus, hipokampus	1800 ± 300	75 ± 7	Pickering a Niles 1990
králik	PT, SCN, kortex		1 - 20	Stankov et al. 1991
kôň	PT, SCN, kortex		1 - 20	Stankov et al. 1991
ovca	PT, SCN, kortex		1 - 20	Stankov et al. 1991
mihula	SCN, hypotalamus	36	8,1	Vernadakis et al. 1998
raja	SCN, hypotalamus	38	19,8	Vernadakis et al. 1998
pstruh	SCN, hypotalamus	50	21,8	Vernadakis et al. 1998
žaba	mozog	70	0,8	Wiechmann a Wirsig-Wiech. 1993

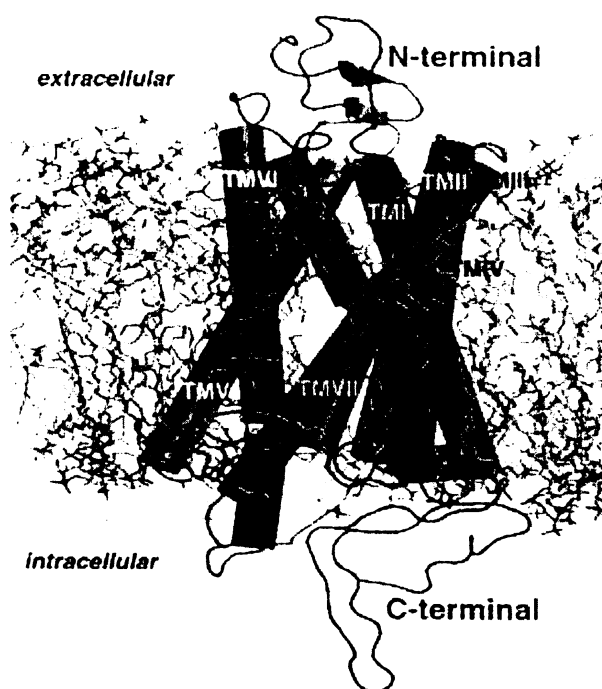
Tabuľka 1. Prehľad nameraných disociačných konstant (K_d) a maximálnych denzít väzby (B_{max}) 2-[125 I]-melatonínu v CNS.

organizmus	orgán	K_d [pM]	B_{max} [fmol/mg proteínu]	zdroj
človek	oblička	15,2 ± 2,5	1,8 ± 0,2	Song et al. 1995
kačica	oblička	44,6 ± 4,4	6,4 ± 0,6	Song et al. 1992
potkan	semenníky	215 ± 23	0,9 ± 0,1	Vera et al. 1997
potkan	nadsemenníky	62,6 ± 7,79	1,6 ± 0,2	Yu et al. 1994
kačica	semenníky	29 ± 6	1,9 ± 0,7	Ayre et al. 1994
prepelica	semenníky	46,6 ± 8,6	2,8 ± 0,02	Wang et al. 1992
kačica	vaječníky	53 ± 9	4,5 ± 0,6	Ayre et al. 1994
človek	jejunum	150 - 200	0,7	Pontoire et al. 1993
kurča	duodenum	68 ± 18	0,2 - 1	Pontoire et al. 1993
prepelica	pečeň	19,4 ± 1	1,2 ± 0,19	Wan a Pang 1995
kačica	slezina	73,1 ± 5,4	3,6 ± 1,4	Yu et al. 1991

Tabuľka 2. Prehľad nameraných disociačných konstant (K_d) a maximálnych denzít väzby (B_{max}) 2-[125 I]-melatonínu v periférnych orgánoch.

2.4.2. Identifikácia melatonínových receptorov

Z vlastností väzbových štúdií 2-[¹²⁵I]-melatonínu, prípadne inhibičných štúdií s melatonínom a ďalšími jeho analógmi, bolo predikované, že väzbové miesta 2-[¹²⁵I]-melatonínu odpovedajú dvom základným membránovým typom receptorov. A to vysokoafinitného typu melatonínového receptora ML1 a nízkoafinitného typu ML2 (Dubocovich 1995). Neskôr boli receptory podrobnejšie analyzované a bola odhalená ich genómová lokalizácia, ako i podrobne určená sekvencia DNA génu, mRNA a popísané miesta zosteru. Bola určená i 3D štruktúra, špecifikovaním hydrofóbných a hydrofilných úsekov a kryštalografickou analýzou. Výsledkom bola identifikácia dvoch izoform ML1 receptorového typu - Mel1a (= MT1) a Melb (= MT2), u vtákov a obojživelníkov navyše Mel1c (Slaugenhaupt et al. 1995, Reppert et al. 1995, Reppert et al. 1995b). Receptory sú afinitne i štruktúrne podobné, rovnako zdieľajú sekvenčnú homológiu, sú však do istej miery farmakologicky rozlíšiteľné. Všetky izoformy typu ML1 patria do rodopsínovej rodiny receptorov so siedmimi transmembránovými α -helixami, ktoré sú spojené hydrofilnými kľučkami (obr. 2).



[Sovová et al. 2004. A structural model of human MT2 melatonin receptor and its melatonin recognition site. Abstract. 3rd Discussions in Structural Molecular Biology.]

Obr. 2. Trojrozmerný model štruktúry vysokoafinitného membránového receptora typu ML1, zahrňujúci izoformy Mel1a, Mel1b a Mel1c, so siedmimi transmembránovými α -helixami.

Receptor typu ML2 patrí do rodiny chinónových reduktáz a o jeho fyziologickom uplatnení, lokalizácii a farmakologickej charakteristike je známe veľmi málo (Dubocovich 1995).

Pozorovaná bola aj väzba melatonínu do jadrových štruktúr buniek jednotlivých orgánov, je preto predpoklad, že sa melatonín uplatňuje aj v regulácii pomocou jadrových receptorov, pravdepodobne z rodiny RZR/ROR (retinoid Z receptor, retinoid orphan receptor) „orphanových“ jadrových receptorov (Smirnov 2001).

2.4.2.1. *Vysokoafinitné melatonínové receptory ML1*

Vysokoafinitné membránové receptory patria do rodopsínovej rodiny receptorov so siedmimi transmembránovými doménami (Ebisawa et al. 1994, Reppert et al. 1994) a boli odlišené od nízkoafinitných membránových receptorov ML2 (Dubocovich 1995). Vstup do podrobnej charakterizácie urobili vyizolovaním cDNA vysokoafinitného receptora z *Xenopus leavis* a následnej expresii v línii buniek COS-7 Ebisawa et al. (1994). Tento naklonovaný receptor vykazoval v následnej väzbovej štúdii podobné vlastnosti, ako v experimentoch prevedených na receptoroch *in vivo*. 2-[¹²⁵I]-melatonín sa viazal s hodnotou $K_d = 6,3 \pm 0,3 \cdot 10^{-11}$ M a väzba 2-[¹²⁵I]-melatonínu bola inhibovaná ligandami štruktúrne podobnými melatonínu rovnako ako v *in vivo* štúdiách.

Analýza cDNA ukázala, že proteín tohoto receptora má 7 hydrofóbných transmembránových domén spojených hydrofilnými kľučkami, N-koniec proteínu sa nachádza v extracelulárnom prostredí a C-koniec je obrátený smerom do cytozolu. Štruktúrne analýzy odhalili, že je spriahnutý s GTP viažúcim proteínom (Morgan et al. 1989, Ebisawa et al. 1994, Witt-Enderby a Dubocovich 1996), čo je v súlade so zisteniami väzbových štúdií, kde GTP ovplyvňoval hodnoty K_d a B_{max} po jeho aplikácii (Wan a Pang 1995, Song et al. 1995). To, že rovnaký receptor je u cicavcov zodpovedný za sprostredkovanie nastavovania vnútorného cirkadiálneho pacemakera a sprostredkovanie sezónneho správania, potvrdili Reppert et al. (1994) charakterizáciou a naklonovaním ľudského a ovčieho melatonínového receptora. Použili na to primery navrhnuté na cDNA melatonínového receptora *Xenopus leavis* (Ebisawa et al. 1994) a metódou PCR získali sekvenciu príslušného receptora z ovčieho a ľudského tkaniva. Následne expresiou v COS-7 bunkách a väzbovými štúdiami ($K_d \sim 36$ pM u ovce a $K_d \sim 26$ pM u človeka, $B_{max} \sim 104$ fmol/mg proteínu u ovce a $B_{max} \sim 220$ fmol/mg proteínu u človeka) ukázali podobnosť s doteraz prevedenými štúdiami *in vivo*. Sekvenáciou

charakterizovali ovčieho receptora, ktorý s tým z *Xenopus leavis* zdieľal homológiu sekvencie aminokyselín 65 %. ako i ľudský receptor, ktorý zdieľal homológiu aminokyselín s *Xenopus leavis* 65 % a s ovcou 85 %. Tento receptor bol neskôr charakterizovaný ako izoforma Mel1a (Slaugenhaupt et al. 1995).

Klonovacie techniky, a ďalší výskum v štruktúre a farmakológii vysokoafinitných melatonínových receptorov umožnili identifikáciu viacerých izoform vysokoafinitného membránového receptora typu ML1. Takto boli rozlíšené receptory Mel1a (Slaugenhaupt et al. 1995), Mel1b (Reppert et al. 1995) a Mel1c (Reppert et al. 1995b). Dubocovich et al. (1995) identifikovali a charakterizovali množstvo melatonínových analógov, agonistov, čiastočných agonistov i antagonistov, ktoré vykazujú rozdielne afinitné vlastnosti a umožňujú tak farmakologické rozlíšenie receptorov Mel1a a Mel1b. Bežne dostupnými a v inhibičných štúdiách používanými bývajú 4-P-PDOT (~ 300 krát selektívnejší MT2/MT1) a luzindol (~ 15 – 20 krát selektívnejší MT2/MT1) (Dubocovich et al. 1997).

Pre zjednotenie názvoslovia melatonínových receptorov, bol podľa nomenklatury IUPHAR pomenovaný receptor Mel1a ako „mt1“, neskôr (súčasne používaný) MT1 a receptor Mel1b ako „mt2“, resp. MT2. IUPHAR nezahrňuje tretí receptor z rodiny ML1, ktorý sa nenachádza u cicavcov a naďalej je označovaný ako Mel1c

2.4.2.1.1. MT1 (=Mel1a) izoforma vysokoafinitného melatonínového receptora v CNS

Genómová analýza a charakterizácia odhalila lokalizáciu ľudského (chromozóm 4q35.1, Slaugenhaupt et al. 1995) i myšacieho (chromozóm 8, Slaugenhaupt et al. 1995) MT1 receptora. Identifikácia, určenie sekvencie i genómová lokalizácia, ako i overenie funkčnosti expresiou v COS-7 bunkovej línii bolo prevedené aj u myši (Roca et al. 1996).

Expresiu mRNA MT1 receptora metódou RT-PCR ukázali Mazzucchelli et al. (1996) v rôznych oddieloch mozgu. Semikvantitatívnym vyjadrením určili aj porovnanie v intenzite expresie: mozoček ≥ okcipitálny kortex ≥ parietálny kortex > temporálny kortex > talamus > frontálny kortex ≥ hipokampus. V prevažnej miere sa tento melatonínový receptor vyskytuje v centrálnej nervovej sústave, najmä v orgánoch podieľajúcich sa na sprostredkovaní cirkadiálnych rytmov a organizácii sezónneho správania. V ľudskom plode detekovali Weaver a Reppert (1996) expresiu mRNA MT1

receptoru v SCN hybridizačnou technikou. Rovnako v ľudskom plode Thomas et al. (2002) detekovali prítomnosť mRNA MT1, ako i väzbu 2-[¹²⁵I]-melatonínu v SCN, mozočku, talame, hypotalame a mozgovom kmeni, pričom nezaznamenali signál väzby ani expresie v hypofýze, vypovedajúc o tom, že v ľudskom plode je vývoj cirkadiánnych rytmov i väzbových miest v cieľových orgánoch ešte neukončený, a vyvíja sa aj na úrovni expresie receptorov. U myši bola mRNA receptoru detekovaná v SCN a pars tuberalis hypofýzy (Roca et al. 1996), u potkana v hypotalame (Sallinen et al. 2005), v SCN (Neu a Niles 1997, Hunt et al. 2001, Poirel et al. 2002) a v oblasti hipokampu (Musshoff et al. 2002).

Prítomnosť aj rytmus expresie mRNA MT1 receptoru ukázali u potkana v SCN Neu a Niles (1997) s píkum expresie v CT 5 – CT 7. Porovnaním so staršími výsledkami z daného laboratória (Tenn a Niles 1993) ukázali, že pík v hustote väzbových miest 2-[¹²⁵I]-melatonínu nasleduje niekoľko hodín po zvýšenej expresii mRNA, v CT 8 – CT 12. Hustota väzbových miest by tak zodpovedala reálnemu zastúpeniu proteínov MT1 receptoru, keď uvažujeme časový odstup medzi prepisom génu do mRNA a výslednou expresiou a lokalizáciou proteínu do membrány.

Rytmicitu v expresii MT1 mRNA a v hustote väzbových miest u potkanov na LD svetelnom režime stanovili v SCN Poirel et al. (2002). Avšak na rozdiel od predchádzajúcich štúdií (Neu a Niles 1997), maximum expresie mRNA bolo zaznamenané aj na začiatku temnej fázy dňa aj v strede svetelnej fázy. U zvierat chovaných v konštantnej tme (DD svetelný režim), sa v expresii objavili dva píky – na prechode svetlá/tmavá fáza (podobne ako u LD) a ďalší na prechode tmavá/svetlá fáza (žiadny takýto pík u LD). Následná analýza hustoty väzbových miest ukázala, že na svetelnom režime LD 12:12 bola hustota väzbových miest nižšia počas celej temnej fázy dňa oproti svetelnej fáze, naproti tomu u zvierat chovaných v konštantnej tme nedochádzalo k žiadnym zmenám v hustote väzbových miest 2-[¹²⁵I]-melatonínu. Z týchto zistení je možné vyvodit', že svetelné podnety majú zásadný vplyv na reguláciu hustoty väzbových miest, ale regulácia transkripcie nie je za tento efekt priamo zodpovedná, ale že sa proces regulácie odohráva na viacerých úrovniach a uplatňuje sa v ňom viaceré mechanizmov.

Rytmus v expresii mRNA MT1 v pars tuberalis namerali Guerrero et al. (2000). Maximum expresie bolo na prechode tmavá/svetlá fáza. Tento rytmus v expresii bol úplne zrušený u pinealektomovaných potkanov. Ak sa na pokusné zvieratá aplikoval svetelný pulz počas tmavej fázy, spôsobilo to zvýšenie expresie mRNA MT1 u intaktných zvierat,

ale žiadna zmena nenastala u pinealektomovaných. Podaný melatonín zrušil efekt zvýšenia expresie u intaktných zvierat. Z týchto výsledkov možno vyvodit', že expresia mRNA MT1 melatonínového receptora v pars tuberalis je regulovaná melatonínom.

Pri porovnaní tejto štúdie prevedenej na pars tuberalis a štúdie na SCN (Poirel 2002, Neu a Niles 1997) možno predpokladať odlišnú reguláciu expresie receptorov a väzbových miest melatonínu v týchto štruktúrach, a tým aj možnú odlišnú fyziologickú funkciu týchto súčastí CNS. Podobné rozdiely medzi SCN a pars tuberalis stanovili u škrečka Schuster et al. (2000), kde 1 hodinový svetelný pulz stimuloval expresiu MT1 mRNA v SCN i pars tuberalis, no hustota melatonínových receptorov nebola ovplyvnená v SCN, zatiaľ čo vykazovala prudký nárast v pars tuberalis.

2.4.2.1.2. MT1 (=Mella) izoforma vysokoafinitného melatonínového receptora na periférii

Melatonínové membránové receptory boli detekované a lokalizované na rôznej úrovni aj v rôznych periférnych orgánoch. V chvostovej artérii potkana bola ukázaná expresia mRNA MT1, pričom nebola detekovaná expresia MT2 (ani „nested“-PCR) (Ting et al. 1999). Podobne v ľudských koronárnych artériách bola zaznamenaná expresia na úrovni proteínu (Ekmekcioglu et al. 2001), kde bola aj variácia v hladine expresie proteínu počas 24 hodín, s minimom pred prechodom z tmavej do svetelnej fázy dňa a maximom po 13. hodine pretrvávajúcom do prostriedku tmavej fázy. V ranných hodinách tak koronárne artérie vykazovali najmenšiu citlivosť voči melatonínu a maximálnu v začiatku tmavej fázy, kedy stúpa hladina plazmatického melatonínu a zároveň sa zachováva vysoká hladina expresie proteínu. To môže súvisieť aj s potenciálnou úlohou melatonínu v regulácii krvného tlaku a priamym efektom na cievy.

V pečeni a obličke myši bola expresia mRNA detekovaná metódu RT-PCR (Naji et al. 2004), v tenkom čreve a retine potkana metódou real-time RT-PCR (Sallinen et al 2005).

V nezanedbateľnej miere bola expresia detekovaná v imunitnom systéme, a to v jednotlivých orgánoch súvisiacich s imunitným systémom ako i v populáciách imunitných buniek. U myši v týmuse i slezine na úrovni mRNA i proteínu (Carrillo-Vico et al. 2003), podobne u potkana v týmuse, slezine a populáciách T lymfocytov (CD4⁺, CD8⁺) i B lymfocytov (Pozo et al. 1997) a u človeka bunkách imunitného systému

(monocyty, B lymfocyty, T_H , T_C , NK-bunky) (Pozo et al. 2004). Hojná expresia naznačuje možné široké fyziologické pôsobenie melatonínu v imunitnom systéme, čo potvrdzujú štúdie popisujúce imunostimulačný i imunosupresívny účinok melatonínu (Srinivasan et al. 2005).

Lokalizácia expresie u potkana v endometriu maternice (Zhao et al. 2000) potvrdzuje funkciu melatonínu v regulácii reprodukcie nielen cez pôsobenie v rámci CNS, ale aj priamo na periférii.

U človeka bol MT1 detekovaný ešte v adipocytoch hnedého tuku (rovnako ako MT2) (Brydon et al. 2001) čo poukazuje na možnú úlohu v regulácii energetického metabolizmu.

2.4.2.1.3. Intracelulárne pôsobenie melatonínu cez MT1 receptor

Melatonínový receptor MT1 je spriahnutý s GTP-viažúcim proteínom (G-proteín). Ukázalo sa, že receptor môže byť spriahnutý s rôznymi typmi G-proteínov a aktivované podjednotky G-proteínu (α podjednotka, $\beta\gamma$ podjednotka) môžu ovplyvňovať rôzne intracelulárne signalizačné dráhy.

Na určenie signalizačných dráh, ktoré melatonín ovplyvňuje cez membránový receptor, boli uskutočnené viaceré štúdie. K inhibícii nárastu hladiny cAMP stimulovaného forskolínom alebo inými substanciami, dochádza po pôsobení melatonínu (Carlson et al. 1989, Vaněček a Vollrath 1990, Carlson et al. 1991, Wiechmann a Wirsig-Wiechmann 1993, Iuvone a Gan 1994, Garcia-Perganeda et al. 1999). Tento efekt melatonínu je sprostredkovaný receptorom spriahnutým s G-proteínom.

Bolo ukázané, že inhibícia akumulácie cAMP je sprostredkovaná G-proteínom senzitívnym k pertussis toxínu (Niles et al. 1991, Iuvone a Gan 1994, Garcia-Perganeda et al. 1999, Roth et al. 2001). Citlivosť G-proteínu na pertussis toxín v dráhe inhibície adenylát cyklázy melatonínom napovedá, že sa jedná o proteín z rodiny G_i , u ktorých aktivovaná α podjednotka G-proteínu inhibuje membránovú adenylát cyklázu.

Inhibícia adenylát cyklázy a pokles cAMP bývajú v prácach dokladované ako najčastejší efekt melatonínu cez MT1 receptor. G_i proteín sprostredkováva aj iné bunkové odpovede na melatonín a ovplyvňuje signalizačné dráhy stimuláciou MAP kináz (stimulácia JNK, ERK kinázy) (Chan et al. 2002), či moduláciou aktivity transkripčných faktorov (estrogénový receptor, glukokortikoidový receptor) (Kjeffer et al. 2005).

Brydon et al. (1999) ukázali, že MT1 receptor v HEK 293 bunkách endogénne exprimujúcich rôzne druhy G-proteínov (G_{i1} , G_{i2} , G_{i3} , $G_{q/11}$, G_z , G_p , G_{12} , G_s) môže byť štruktúrne i funkčne spriahnutý s G-proteínmi G_{i2} a G_{i3} , čo sú rovnako G-proteíny, kt. α podjednotka inhibuje adenylát cyklázu.

Melatonínový receptor môže byť spriahnutý aj s G-proteínom necitlivým k pertussis toxínu. V bunkovej kultúre melanómu, bol melatonín schopný stimulovať sekréciu proteínov cez receptor spriahnutý so stimulačným G-proteínom G_s , efekt bol znásobený zabránením GTP hydrolyze a tým udržaniu G_α podjednotky v trvale aktívnom stave (Bubis a Zisapel 1995). Domienky o možnom spriahnutí s proteínami G_{16} , G_{12} , G_{13} boli vyslovené pri hodnotení pokusov s aktiváciou JNK kinázy, kde stimulácia MT1 melatonínového receptora i stimulácia G_{16} , G_{12} , G_{13} viedli k aktivácii JNK kinázy (Chan et al. 2002).

To, že odpoveď na melatonín môže sprostredkovať G-proteín G_{16} keď je s ním spriahnutý melatonínový receptor MT1 resp. MT2, bolo ukázané akumuláciou inozitoltrifosfátu ako odpovedi na stimuláciu 2-I-melatonínom v bunkách COS-7 transfekovaných MT1 a MT2 (Lai et al. 2002). Napojenie MT1 receptora na fosfatidylinozitolovú dráhu podporila aj práca MacKenzie et al. (2000), keď v bunkovej línii ovárií, exprimujúcich MT1 receptor, ukázali po stimulácii nárast v hydrolyze fosfatidylinozitolu. Tento efekt bol zablokovaný pôsobením inhibítora 4-P-PDOT. Zároveň bola ukázaná schopnosť melatonínu inhibovať forskolínom stimulovaný nárast hladiny cAMP, čo svedčí o tom, že melatonínový receptor môže byť zapojený v dvoch odlišných intracelulárnych signalizačných dráhach.

Ovplyvnenie fosfatidylinozitolovej dráhy melatonínom cez receptor MT1 ukázali aj Brydon et al. (1999), keď koimunoprecipitáciou rôznych G-proteínov s proteínom MT1 receptora stanovili, že melatonínový receptor je spriahnutý aj s proteínom $G_{q/11}$. Po transfekcii HEK 293 buniek MT1 receptorom spriahnutým s $G_{q/11}$ bolo potvrdené funkčné spriahnutie, keď melatonín stimuloval vzostup koncentrácie $[Ca^{2+}]_i$.

Melatonínový receptor tak môže byť spriahnutý so širokým spektrom G-proteínov, čo umožňuje melatonínu účastniť sa v rôznych regulačných dráhach. Je pravdepodobné, že organizmus si takto zabezpečuje tkanivovo či bunkovo špecifický typ odpovede na melatonín.

2.4.2.1.4. MT2 (=Mel1b) izoforma vysokoafinitného melatonínového receptoru

Identifikovaná a naklonovaná izoforma vysokoafinitného receptoru označovaná ako MT2 (Mel1b) (Reppert et al. 1995) je rovnako ako MT1 s G-proteínom spriahnutý receptor. Vykazuje podobné väzbové, štruktúrne a sekvenčné (60 % homológie aminokyselínovej sekvencie) vlastnosti ako MT1 (Mel1a). V ľudskom chromozóme je lokalizovaný v lokuse 11q21-22 (Reppert et al. 1995).

Expresia v COS-1 bunkách preukázala väzbové vlastnosti 2-[¹²⁵I]-melatonínu s $K_d = 160 \pm 30$ pM a štúdie v línii buniek NIH 3T3 ukázali jeho funkčnú zviazanosť s adenylát cyklázou.

Expresia bola ukázaná v mozgu človeka (Reppert et al. 1995), v hipokampe a gyrus dentatus (Musshoff et al. 2002), v SCN (Hunt et al. 2001) a hypotalame (Sallinen et al. 2005) potkana

Silná expresia bola popísaná v retine človeka (Reppert et al. 1995), potkana (Sallinen et al. 2005) i *Xenopus leavis* (Wiechmann et al. 1999).

U myši bola expresia mRNA MT2 receptoru lokalizovaná v mozgu a pľúcach, pričom detekcia bola negatívna v obličkách, srdci a pečeni (Naji et al. 2004).

Na úrovni proteínu bol MT2 identifikovaný v týmuse myši (nie v slezine) (Carrillo-Vico et al. 2003). Naproti tomu, expresia mRNA nebola detekovaná v slezine ani týmuse potkana (Pozo et al. (1997).

V gastrointestinálnom trakte bol MT2 receptor detekovaný v tenkom čreve a pečeni potkana (Sallinen et al. 2005) a jeho expresia bola zistená i v adipocytoch v hnedom tukovom tkanive (Brydon et al. 2001).

Melatonínový receptor typu MT2 sa tak javí vo výskyte zriedkavejší v porovnaní s MT1 receptorom, ale jeho dominantná funkcia bola ukázaná v sprostredkovaní odpovedí v regulácii sezónnych zmien v organizme (Liu et al. 1997, McArthur et al. 1997, Hunt et al. 2001).

2.4.2.1.5. Intracelulárne pôsobenie melatonínu cez MT2 receptor

U MT2 receptoru boli ukázané podobné signalizačné dráhy ako u MT1 (pričom nie všetky preukázané aj u MT2). MT2 receptor je rovnako spriahnutý s viacerými

G-proteínmi, a jeho aktiváciou melatonín inhibuje membránovú adenylát cyklázu, a tým znižuje intracelulárnu hladinu stimulovaného cAMP (Reppert et al. 1995, Reppert et al. 1995b, Petit et al. 1999).

Podobne ako u MT1 bola u MT2 preukázaná účasť v stimulácii fosfatidylinozitolovej signalizačnej dráhy. Stimulácia hydrolýzy fosfatidylinozitolu ako i inhibícia forskolínom stimulovaného vzostupu koncentrácie intracelulárneho cAMP cez MT2 receptor bola ukázaná v bunkovej línii ovárii (MacKenzie et al. 2002). Funkčné napojenie na G_{16} proteín, a spriahnutie s fosfatidylinozitolovou dráhou bolo potvrdené stimuláciou tvorby inozitoltrisfosfátu Lai et al. (2002).

Zásadný rozdiel v intracelulárnom pôsobení medzi MT1 a MT2 je v schopnosti melatonínu cez receptor MT2 inhibovať stimulovanú hladinu cyklického GMP (cGMP), zatiaľ čo melatonínový receptor typu MT1 túto inhibíciu sprostredkovať nedokáže (Petit et al. 1999)

2.4.2.1.6. *Mel1c* izoforma vysokoafinitného melatonínového receptoru

V mozgu kurčat'a bola identifikovaná nová forma vysokoafinitného, s G-proteínom spriahnutého receptoru, ktorý vykazuje homológiu voči Mel1a i Mel1b a bol pomenovaný ako Mel1c (Reppert et al. 1995b). Melatonín je cez tento receptor schopný inhibovať stimulovanú hladinu cAMP i cGMP, čím sa funkčne viac podobá receptoru MT2 (Jockers et al. 1997). Nie je exprimovaný u cicavcov a jeho špecifická úloha u ostatných živočíchov nebola rozlíšená.

2.4.2.2. *Nízkoafinitné melatonínové receptory ML2 (= MT3)*

Na základe kinetických a farmakologických štúdií bola lokalizácia receptoru MT3 stanovená v mozgu škrečka. Afinita 2-[¹²⁵I]-melatonínu sa pohybovala v nanomolárnych koncentráciách (0,9 – 10 nM). Oproti skupine vysokoafinitným melatonínovým receptorom ML1, nie je MT3 regulovaný zmenami koncentrácie GTP, čo svedčí o tom, že nie je spriahnutý s G-proteínom. Typická afinita voči agonistom bola stanovená nasledovne: 2-I-melatonín > prazosín ~ NA-5-HT ~ 6-hydroxymelatonín ~ melatonín >> 5-HT (Dubocovich 1995). Purifikáciou z obličky škrečka sa ukázalo že ide o homológ

chinónovej reduktázy typu 2 (Nosjean et al. 2000). O uplatnení MT3 receptora vo fyziologickom pôsobení melatonínu je známe len veľmi málo.

2.4.2.3. *Jadrové receptory*

Pri štúdiu väzbových miest melatonínu a jeho analógu 2-[¹²⁵I]-melatonínu boli identifikované aj iné väzbové miesta ako membránové. Boli to väzbové miesta v jadrách buniek izolovaných z pečene potkana (Acuna-Castroviejo et al. 1994). Po pridaní proteínázy K a kyseliny trichlóroctovej väzbový efekt 2-[¹²⁵I]-melatonínu vymizol. Z toho plynie predpoklad, že väzbové miesto môže byť zviazané s jadrovým receptorom, alebo že je priamo jadrovým receptorom.

Identifikácia väzbových miest 2-[¹²⁵I]-melatonínu bola prevedená aj v jadrách izolovaných buniek mliečnej žľazy myši (Coto-Montes et al. 2003) a v jadrách purifikovaných buniek sleziny a týmusu potkana (Rafii-El-Idrissi et al. 1998). Jednalo sa o saturateľnú, vysokoafinitnú väzbu (K_d 70 – 100 pM). Identitu možných jadrových receptorov odhalili Wiesenberg et al. (1995), keď ukázali, že sa melatonín viaže na RZR $_{\alpha}$ i ROR $_{\alpha 1}$ s nanomolárnou afinitou a je schopný ovplyvniť ich transaktivačnú aktivitu. RZR/ROR sú tzv. „orphanové“ jadrové receptory, ktoré sú charakterizované, ale nie je u nich známy prirodzený ligand a často ani cieľové „response elementy“ na DNA.

Niekoľko štúdií poukazuje na to, že melatonín je jedným z ligandov niektorých podtypov týchto receptorov. Becker-Andre et al. (1994) ukázali, že melatonín je ligandom RZR $_{\beta}$, i keď nevedeli tento nález reprodukovať (Becker-Andre et al., Erratum 1997). Tiež Steinhilber et al. (1995) ukázali, že melatonín je prirodzeným ligandom RZR $_{\alpha}$ a RZR $_{\beta}$ v B lymfocytoch. Ukázali, že „response element“ génu 5-lipooxygenázy špecificky viaže RZR $_{\alpha}$ a ROR $_{\alpha 1}$ (nie ROR $_{\alpha 2}$ ani ROR $_{\alpha 3}$). Melatonín down-reguluje expresiu 5-lipooxygenázy v B lymfocytoch exprimujúcich RZR $_{\alpha}$, ale nemá vplyv na expresiu 5-lipooxygenázy v monocytoch a granulocytoch, ktoré RZR $_{\alpha}$ neexprimujú. To naznačuje, že melatonín je schopný cez jadrový receptor RZR $_{\alpha}$ ovplyvniť expresiu cieľových génov.

Boli objavené ďalšie „response elementy“ RZR/ROR receptorov, ktoré sú indukateľné melatonínom: sialoproteín v kosti potkana, myši gén pre Pep-2 proteín (Purkinje cell protein 2) a ľudský p21^{WAF1/CIP1} gén (Schrader et al. 1996). To, že melatonín viaže RZR $_{\alpha}$ aj jeho zstrihová variantu ROR $_{\alpha 1}$, ukázali vo svojej práci Wiesenberg et al. (1995). Identifikovali tiež nový syntetický ligand (tiazolidínión) CGP 52608, ktorý je ligandom RZR/ROR receptorov, ale neviaže sa na membránové

melatonínové receptory. Funkčnosť a špecificitu ligandu potvrdili aj iné štúdie (Garcia-Maurino et al. 1997, Rafii-El-Idrissi et al. 1998, Winczyk et al. 2001).

Expresia RZR/ROR receptorov a pôsobenie melatonínu cez tieto receptory bolo ukázané najmä na bunkách (Steinhilber et al. 1995, Garcia-Maurino et al. 1997, Guerrero et al. 2000b, Carrillo-Vico et al. 2003, Pozo et al. 2004) či orgánoch (Rafii-El-Idrissi et al. 1998) imunitného systému. Existuje tým možnosť, že melatonín špecificky pôsobí cez jadrové receptory práve v imunitnom systéme.

2.5. Melatonín v GIT

2.5.1. GIT – gastrointestinálny trakt

Gastrointestinálny systém vyšších stavovcov zohráva dôležitú úlohu v príjme potravy, spracovaní potravy, premene zdrojov na organizmom využiteľnú formu energie a zbavovanie sa metabolitov a nespracovateľných zvyškov. Takýto dôležitý systém podlieha prísny endokrinným, parakrinným i autokrinným reguláciám, ktoré uschopňujú organizmus vyvážené regulovať energetický metabolizmus a potreby organizmu v daných prírodných a fyziologických podmienkach v akých sa organizmus nachádza. Musí byť zabezpečený rozklad potravy, vstrebanie potrebných látok, vylúčenie nepotrebných a nespracovaných zvyškov potravy. GIT je zároveň jednou z hlavných bariér vstupu patogénov do organizmu, preto musí byť zabezpečená patričná imunitná ochrana pred patogénmi hojne sa vyskytujúcimi v potrave.

2.5.2. Rytmicita v GIT

Ako mnoho iných procesov, aj príjem a spracovanie potravy má rôzne typické variácie v priebehu dňa, ktoré bývajú rytmické. Rôzne mechanizmy trávenia fungujú inak počas spánku a inak počas aktivity. Svedčí o tom rytmická aktivita motorických komplexov svaloviny čreva odlišná počas dňa a noci (Auwerda et al. 2001, Keller et al. 2001), cirkadiánný rytmus expresie niektorých transportérov (GLUT5 – Castello et al. 1995, PEPT1 – Pan et al. 2002), ako i rytmus v sekrécii niektorých pankreatických enzýmov (Kelle a Layer 2002).

Tieto rytmy môžu byť ovplyvňované a regulované viacerými mechanizmami: centrálnym cirkadiánnym rytmom, kde hlavným efektorom je melatonín, vnútornými podmienkami (pokles glukózy v krvi, pocit hladu) alebo vonkajšími podmienkami (po príjme potravy sa naštartujú mechanizmy, ktoré vedú k spracovaniu potravy a ukladaniu energetických zásob). Široké spektrum signálov sa môže v rôznej miere vzájomne ovplyvňovať. Otázka úlohy centrálného pacemakeru v regulácii procesov v gastrointestinálnom trakte tak nie je zodpovedaná a dáva priestor a potrebu hľadania odpovedí. Výskyt melatonínu vo veľkom množstve a prítomnosť jeho receptorov v rôznych častiach tráviaceho systému hovoria pre možnú súvislosť a koordináciu centrálnej rytmicity s periférnou.

2.5.3. Melatonín a jeho receptory v GIT

Melatonín bol nájdený v rôznych častiach tráviaceho systému u rôznych organizmov a ako prví ho v GIT identifikovali Raikhlin et al. (1975) v enterochromafínných bunkách. Bubenik et al. (1977) lokalizovali melatonín pozdĺž celej tráviacej trubice potkana, so silnejším signálom v žalúdku, duodene (Lieberkühnove krypty, villi) a rekte, a slabším v slepom a hrubom čreve (Lieberkühnove krypty). V porovnaní s plazmatickou hladinou melatonínu sa ukazuje, že jeho obsah je v tkanive tráviaceho traktu prekvapivo niekoľkonásobne vyšší.

Messner et al (2001) namerali u človeka koncentráciu melatonínu v plazme 55 ± 38 pg/ml a v žlči 85 ± 45 pg/ml (radovo 10^{-10} M), pričom boli zaznamenané individuálne rozdiely v koncentrácii v plazme i žlči. Hodnoty však vzájomne korelovali a u jednotlivcov s vyššou plazmatickou hladinou bola vyššia aj hladina v žlči. U rovnakých probandov zistili v mukóznej vrstve žalúdka koncentráciu melatonínu 1360 ± 270 pg/g a v mukóze hrubého čreva 2430 ± 370 pg/g (radovo 10^{-9} M) (Messner et al. 2001). Melatonín v hrubom čreve človeka stanovili i Poon et al (1996) v koncentrácii 467 ± 99 pg/g a Vician et al. (1999) v koncentrácii $314,7 \pm 87,8$ pg/g. Bubenik a Brown (1997) namerali nasledujúce koncentrácie v tráviacej trubici potkana: ileum (542 pg/ml), jejunum (531 pg/ml), hrubé črevo (362 pg/ml), žalúdok (359 pg/ml) a ceacum (164 pg/ml). V rovnakom experimente bola plazmatická hladina melatonínu 37,5 pg/ml. Tieto výsledky poukazujú na radovo vyšší obsah melatonínu v gastrointestinálnom trakte ako v plazme, u človeka i potkana.

Gastrointestinálny trakt vtákov podobne vykazuje prítomnosť melatonínu, čo ukázali Herichová a Zeman (2000), keď identifikovali melatonín v duodene, jejunu a pankrease kurčatá, a Lee et al. (1995), keď našli melatonín u kačice v rôznych segmentoch tráviacej trubice (oesophagus, duodenum, jejunum, ileum, caecum, hrubé črevo).

Pre pravdepodobnú fyziologickú funkciu melatonínu v tráviacej sústave nehovorí len jeho vysoká koncentrácia, ale aj lokalizácia väzbových miest a expresia mRNA i proteínov membránových a jadrových receptorov.

Väzbové štúdie rádioaktívne značeného 2-[¹²⁵I]-melatonínu ukázali, že melatonín má svoje väzbové miesta v rôznych orgánoch tráviaceho systému, ako i pozdĺž tráviacej trubice, s prevažnou lokalizáciou v mukóznej, resp. epitelovej vrstve. Hustota väzbových miest v tráviacej trubici kačice podľa jednotlivých segmentov bola nasledovná: najvyššia v ileum a jejunum, nižšia v duodenum a hrubom čreve, najnižšia v caecum a oesophagus. (B_{\max} 1 – 3,5 fmol/mg proteínu; K_d 25 – 35 pmol/l) (Lee et al. 1995). Väzba 2-[¹²⁵I]-melatonínu v myších hepatocytoch vykazovala hustotu $B_{\max} \sim 2,9$ fmol/mg proteínu a disociačnú konštantu $K_d \sim 10$ pmol/l (Poon et al. 2001).

Expresia mRNA MT1 aj MT2 receptorov bola ukázaná v nádorovej bunkovej línii hrubého čreva (Karasek et al. 2002) i v tenkom čreve potkana (Sallinen et al. 2005). Naproti tomu, expresia mRNA len izoformy MT2 bola zaznamenaná v myších hepatocytoch (Poon et al. 2001) a v pečeni potkana (Sallinen et al. 2005).

Expresia melatonínových receptorov je do veľkej miery kolokalizovaná s väzbovými miestami zistenými štúdiami väzby 2-[¹²⁵I]-melatonínu. To nasvedčuje tomu, že tieto väzbové miesta sú skutočným fyziologickým miestom pôsobenia melatonínu a zodpovedajú funkčným melatonínovým receptorom.

Prítomnosť melatonínu a jeho receptorov v tráviacom trakte kladie dve základné otázky. Či melatonín vzniká priamo v bunkách tráviaceho systému (Raikhlin et al. 1975) alebo je bunkami (enterochromafinné bunky, Raikhlin et al. 1975) a tkanivami len vychytávaný a jeho vznik je v centrálnej nervovej sústave. Druhou otázkou je jeho funkcia vo fyziologických procesoch. Prítomnosť tak veľkého množstva melatonínu a prítomnosť jeho receptorov napovedajú jasne, že fyziologickú regulačnú alebo mediátorovú úlohu zohrávať bude.

2.5.4. Pôvod melatonínu v GIT

Nie je jednoznačný dôkaz, že melatonín je skutočne syntetizovaný v gastrointestinálnom trakte. Existuje však niekoľko nepriamych indícií. Na zistenie pôvodu gastrointestinálneho melatonínu bolo prevedených niekoľko experimentov. Po pinealektómii potkanov sa znížila nočná hladina melatonínu v plazme (z 20,1 pg/ml na 8,6 pg/ml), pričom hladiny melatonínu v GIT (žalúdok, jejunum, ileum, cecum, hrubé črevo) ostali nezmenené a odstránenie epifýzy tak nemalo vplyv na gastrointestinálny melatonín (Bubenik a Brown 1997), čo dokazuje to, že epifýza nie je jediným zdrojom melatonínu a existujú aj iné miesta tvorby.

To, že ním môže byť aj gastrointestinálny trakt naznačuje ukázaná expresia kľúčových enzýmov tvorby melatonínu, AA-NAT i HIOMT (Ribelayga et al. 1999), v čreve a v žalúdku (v menšej miere v pečeni) (Stefulj et al. 2001).

Zaznamenaný bol aj efekt perorálne podávaného L-tryptofánu (150–300 mg/kg), ktorý spôsobil signifikantné zvýšenie nielen plazmatickej hladiny, ale rovnako i hladiny gastrointestinálneho melatonínu s maximom v duodene (Huether et al. 1992), čo rovnako môže vypovedať o možnej syntéze melatonínu gastrointestinálnym traktom.

Jednoznačne preukázaná tvorba melatonínu v GIT nebola, ale vypovedajú o tom mnohé nepriame dôkazy.

2.6. Účinky melatonínu v GIT

2.6.1. Stimulácia Cl⁻ sekrécie

Melatonín stimuluje sekréciu chloridových iónov v bunkovej línii hrubého čreva. Na modeli bunkovej línie T₈₄, ktorej bunky exprimujú na svojom povrchu chloridový kanál a vykazujú Cl⁻ sekréciu, bol sledovaný metódou napätového zámku regulovaný iónový transport. Bolo ukázané, že melatonín stimuluje zmenu I_{sc} koncentračne závisle (EC₅₀ ~ 100 μM) (Chan et al. 1998). Pri použití média, ktoré neobsahovalo Cl⁻ anióny, bol efekt melatonínu veľmi výrazne potlačený, čo potvrdzuje, že melatonín skutočne v danom experimente stimuloval sekréciu Cl⁻. Potvrdzuje to aj zrušenie, resp. oslabenie efektu melatonínu po podaní blokátorov Cl⁻ kanálov (difenylamín-2,2'-dikarboxylová kyselina, resp. 4,4'-diizotiocyanozilbén-2,2'-disulfonová kyselina). Keďže amilorid

(blokátor Na^+ kanálov), nemal vplyv na melatonínom stimulované zvýšenie I_{sc} , chloridová sekrécia nebola v tomto prípade sprevádzaná sodíkovou absorpciou a veľkosť zmeny skratovacieho prúdu, ktorý je odrazom elektrogénneho transportu, vyjadruje mieru chloridovej sekrécie.

Melatonín pôsobí najčastejšie cez melatonínové receptory spriahnuté s G-proteínom, citlivé na pertussis toxín (PTX). Inkubácia rovnakej bunkovej línie s PTX, s inhibítorom fosfolipázy C, ani s inhibítorom adenylát cyklázy, nemala žiadny signifikantný vplyv na zmenu I_{sc} vyvolaného melatonínom. Melatonín tak v tomto prípade nepôsobil cez žiadnu z uvedených signálnych dráh. Analógy melatonínu (6-hydroxymelatonín, 2-I-melatonín), poskytovali podobnú odpoveď v zmene I_{sc} , čo svedčí o pravdepodobnom pôsobení melatonínu cez membránový receptor, i keď nie cez PTX-senzitívny.

Je potrebné mať na zreteli koncentráciu melatonínu, ktorá bola v experimente účinná. EC_{50} dosiahla hodnotu 10^{-4} M, čo je vysoká hodnota, ktorá radovo presahuje plazmatickú (10^{-10} M) či tkanivovú (10^{-9} M) koncentráciu. Takéto vysoké dávky sú farmakologické. Do úvahy však musíme brať aj to, že pri autokrinnej a parakrinnej regulácii nepoznáme lokálnu koncentráciu v blízkom okolí buniek, z ktorých je melatonín uvoľňovaný, a tá môže celkovú priemernú koncentráciu v tkanive, mnohonásobne prevyšovať. Interpretáciu fyziologického účinku melatonínu na chloridovú sekrécia je tak nutné vyslovovať s opatrnosťou.

2.6.2. Regulácia HCO_3^- sekrécie

Sekrécia HCO_3^- do lumen doudena sprostredkovaná enterocyty zohráva dôležitú protektívnu úlohu. Do duodena prichádza trávenina zo žalúdka, kde žalúdočná kyselina (HCl) udržuje nízke pH vhodné na trávenie, rozvoľňuje väčšie kusy potravy a zohráva aj ochrannú úlohu pred patogénmi, ktoré mohli vstúpiť s potravou. Zároveň je to vhodné prostredie pre žalúdočné enzýmy. Oproti žalúdku, epitel duodena nie je tak dokonale vystlaný mucínom, ochrannou vrstvou proti HCl, preto je potrebné neutralizovať vstupujúcu tráveninu a zároveň pripraviť vhodné pH pre činnosť duodenálnych enzýmov. Túto úlohu plní HCO_3^- anión sekretovaný do lumen doudena. Sekrécia je regulovaná na úrovni nervovej (CNS i črevný nervový systém) aj humorálnej

(tyreotropný hormón) a môže byť sprostredkovaná rôznymi mediátormi (acetylcholin, vazoaktívny intestinálny peptid, prostaglandíny).

Bolo ukázané, že melatonín má priamy vplyv na sekréciu HCO_3^- a rovnako sprostredkováva niektoré stimuly nervovej sústavy.

Intraarteriálne podanie melatonínu (v blízkosti duodena) spôsobilo signifikantný nárast bazálnej sekrécie HCO_3^- do lumen duodena, pričom tento efekt bol výrazne oslabený, ak sa pred podaním melatonínu aplikoval luzindol, inhibítor MT2/MT1 membránových receptorov (Sjoblom et al. 2001). Luzindol podaný samostatne neovplyvnil bazálnu sekréciu HCO_3^- do lumen duodena, svedčiac tak o tom, že melatonín sa neúčastní bazálnej sekrécie cez membránové receptory. Avšak môže sa uplatňovať v regulačných procesoch v duodene a sprostredkovať odpoveď na rôzne stimuly.

Bola preskúmaná i možná účasť melatonínu v sprostredkovaní nervovej stimulácie HCO_3^- sekrécie. Ukázaný bol stimulačný efekt intracerebroventrikulárne podaného fenylepinefrínu (agonistu $\alpha 1$ adrenoreceptorov) na duodenálnu HCO_3^- sekréciu, ktorý bol úplne zrušený, ak bol pokusnému zvierat'u najprv intraarteriálne aplikovaný luzindol (Sjoblom et al. 2001), alebo ak mu boli preťaté nervy (prebiehajúce vedľa karotíd) v sublingválnej oblasti. Nasvedčuje to účasti melatonínu a jeho receptorov v sprostredkovaní odpovede nervového stimulačného signálu.

Z týchto dát vyplýva, že melatonín skutočne môže mať priamy efekt na sekréciu HCO_3^- , ako i plniť úlohu mediátora v nervovej regulácii protektívnej HCO_3^- sekrécie do duodena. Nielen melatonín pochádzajúci z krvi sa môže v daných reguláciách uplatňovať, ale i luminálne podaný melatonín v koncentrácii $1 \mu\text{M}$, bol schopný stimulácie HCO_3^- sekrécie, pričom tento efekt bol plne blokovaný luzindolom, svedčiac tak o uplatnení melatonínových receptorov MT2, resp. MT1 v odpovedi na melatonín (Sjoblom a Flemstrom 2003).

Ovplyvnenie luminálne podaným melatonínom vypovedá o pravdepodobnom priamom efekte na epitelové bunky. Nemožno však vylúčiť zapojenie aj iných regulačných dráh. Napr. hexametonium (antagonista nikotínových receptorov) čiastočne inhiboval sekréciu stimulovanú luminálnym melatonínom, svedčiac o čiastočnom uplatnení nervového systému v luminálnom efekte melatonínu (Sjoblom a Flemstrom 2003). Pri intraarteriálnom podaní môžeme uvažovať aj o zapojení hlbších vrstiev bohato

prekrveného črevného tkaniva a predpokladu účasti viacerých regulačných krokov vo výslednej sekrečnej odpovedi.

Z výsledkov vyplýva, že melatonín sa neúčastní bazálnej sekrécie HCO_3^- , avšak je potrebné mať na zreteli, že experimenty boli prevádzané v denných hodinách, kedy je hladina koncentrácie plazmatického melatonínu nízka. Zároveň zvieratá boli počas pokusu po 24 hodinovom hladovaní, preto neboli ovplyvňované možnými signálmi napr. v podobe potravy alebo v podobe hormónov uvoľňujúcich sa pri trávení.

Základným fyziologickým stimulom pre sekréciu HCO_3^- je znížené pH, spôsobené HCl prichádzajúca zo žalúdka spolu s tráveninou. Preto bola podrobená analýze možná účasť melatonínu v sprostredkovaní odpovede sekrécie na stimul zníženého pH. Potkanom bola stimulovaná sekrécia HCO_3^- znížením pH v duodene na pH 2. Rápidny vzostup sekrécie po znížení pH bol čiastočne redukovaný podaním luzindolu intravenózne (Sjoblom a Flemstrom 2003), čo svedčí o uplatnení melatonínových membránových receptorov v sprostredkovaní odpovede na nízke pH, ale melatonín pravdepodobne nie je jediný, ktorý sa v tejto odpovedi uplatňuje, keďže luzindol nezrušil odpoveď úplne.

Z hľadiska rozlíšenia uplatnenia izoform melatonínového membránového receptoru v stimulácii duodenálnej sekrécie sa zdá, že významnejšiu úlohu by mohla zohrávať izoforma MT2, keďže väčšina efektov melatonínu bola blokována antagonistom selektívnejším voči MT2, než voči MT1. Miera selekcie luzindolu však nie je veľká, luzindol je voči MT2 selektívnejší 15 – 20 krát (Dubocovich et al. 1995). Preto nemožno jednoznačne vyvodzovať, ktorá izoforma sa do akej miery v odpovediach uplatňuje, lebo na vyvolanie rovnakého efektu by postačovala 20 krát vyššia hustota MT1 než MT2 receptoru.

Melatonín sa tak ukazuje ako potentná stimulačná substancia HCO_3^- duodenálnej sekrécie, či už exogénne podaný, alebo ako endogénny fyziologický mediátor uplatňujúci sa v sprostredkovaní nervovej i chemickej stimulácie sekrécie HCO_3^- .

2.6.3. Stimulácia intracelulárneho Ca^{2+}

Jedným z mechanizmov účinku melatonínu na bunkovej úrovni je modulácia intracelulárnej hladiny Ca^{2+} . Na izolovaných zhlukoch bunkovej populácie (30-50 buniek) duodenálnych enterocytov zisťovali Sjoblom et al. (2003) efekt melatonínu na

$[Ca^{2+}]_i$. Melatonín v koncentráciách 1-100 nM signifikantne zvyšoval bazálnu hladinu Ca^{2+} dvojnásobne až štvornásobne (bazálna hladina $[Ca^{2+}]_i \sim 100$ nM). Zvýšenie trvalo 2 až 5 minút a bolo koncentračne závislé ($EC_{50} \sim 17$ nM). Zdá sa tak, že vápniková intracelulárna dráha sa môže uplatňovať aj v melatonínom stimulovanej sekrécie HCO_3^- do lumen duodena (Sjoblom a Flemstrom 2003) a melatonín v danom prípade pravdepodobne pôsobí priamo na duodenálne enterocyty.

Nie všetky testované zhluky duodenálnych enterocytov reagovali na melatonín úplne rovnako. U niektorých sa prejavila desenzitizácia a pri vyšších koncentráciách (1000, 1500 nM) bola odpoveď nižšia alebo rovnaká ako pri nižších. So zvyšujúcou sa koncentráciou pôsobiaceho melatonínu sa zvyšoval počet zhlukov odpovedajúcich na melatonín, pričom niektoré zhluky na melatonín neodpovedali ani pri jeho najvyšších koncentráciách. Bol zaznamenaný aj typ odpovede, kde melatonín v koncentráciách 10 a 100 nM podaný po dobu 3 minút (následne odplavený), spôsobil dlhotrvajúce, pomalé a cyklické oscilácie vo vápnikovej intracelulárnej koncentrácii. Pri pozorovaní jednotlivých buniek zhluku bola vypozerovaná jednotnosť v dobe objavenia sa pík. To môže byť dokladom medzibunkovej komunikácie.

Na zistenie pôvodu stimulovaného $[Ca^{2+}]_i$, bol vápnik odstránený z perfuzátu obmývajúceho bunky. Po aplikácii melatonínu bol pozorovaný krátky pík vzostupu intracelulárnej koncentrácie. Ten však trval veľmi krátko a chýbala mu mierna plató fáza, aká bola pozorovaná u najčastejšieho typu odpovede, kde bol extracelulárny Ca^{2+} prítomný. Z tohto pozorovania možno vyvodit', že $[Ca^{2+}]_i$ pochádza jednak z intracelulárnej zásoby (endoplazmatické retikulum) a nezanedbateľnú úlohu zohráva aj Ca^{2+} extracelulárny.

Agonisty melatonínu 2-I-melatonín a 2-I-N-butanoyl-5-metoxytryptamín vyvolali podobné typy odpovede ako samotný melatonín čo spolu s faktom, že pridaný luzindol nemal efekt na bazálnu hladinu $[Ca^{2+}]_i$ a úplne zrušil melatonínom stimulovaný vzostup koncentrácie $[Ca^{2+}]_i$, svedčí o pôsobení melatonínu výhradne cez receptory MT1 resp. MT2.

Potenciácia efektu iných látok na vzostup $[Ca^{2+}]_i$ melatonínom bola ukázaná, keď melatonín spôsobil posilnenie vzostupu koncentrácie $[Ca^{2+}]_i$ vyvolaného karcholom a CCK-8 (oktapeptid cholecystokinínu). Pôsobenie oboch látok súčasne (melatonín + karchol; melatonín + CCK-8) bolo väčšie než súčet samotne pôsobiacich (Sjoblom et al. 2003). To svedčí o výraznom modulačnom vplyve melatonínu na iné substancie.

Tieto objavy sú dôležité z niekoľkých hľadísk. Bol dokázaný priamy efekt melatonínu na epitelové bunky (neprítomnosť spodných vrstiev tkaniva vylučuje pôsobenie hlbších vrstiev). Hladina $[Ca^{2+}]_i$ je dôležitým signálom uplatňujúcim sa v mnohých signalizačných dráhach v bunke. Týmto sa ukázalo, že jedným z mechanizmov melatonínového pôsobenia v GIT na bunkovej úrovni môže byť spriahnutie G-proteínových receptorov s fosfatidylinozitolovou dráhou. Dôležitou je aj koncentrácia melatonínu, na ktorú bunky odpovedali. Používaná nanomolárna koncentrácia je oveľa bližšia fyziologickej, než mikro-, či milimolárna koncentrácia používaná na vyvolanie efektu v niektorých prácach (Legris et al. 1982, Chan et al. 1998).

2.6.4. Inhibícia amilorid-senzitívnej absorpcie Na^+

Reabsorpcia Na^+ je dôležitým procesom udržovania iónovej rovnováhy a dostatočnej zásoby minerálov v organizme. Prebieha o.i. najmä v kanálikoch obličiek a v čreve a je sprostredkovaná rôznymi transportérmi a kanálmi. Výraznú úlohu v čreve hrá v podmienkach zníženého príjmu Na^+ v potrave, príp. umelo vyvolaného zvýšeného vylučovania Na^+ . Vtedy sa vo zvýšenej miere uplatňuje elektrogénny amilorid-senzitívny Na^+ transport.

Naindukovaný elektrogénny sodíkový transport v hrubom čreve, meraný ako skratovací prúd metódou napätového zámku, bol inhibovaný o 90 % luminálne pridaným amiloridom ($IC_{50} \sim 0.5 \mu M$). Ako účinné inhibítory Na^+ absorpcie sa ukázali aj serotonin ($IC_{50} \sim 8 mM$), melatonín ($IC_{50} \sim 6 mM$) a harmalín ($IC_{50} \sim 3 mM$), podávané luminálne (Legris et al. 1982). Inhibícia amiloridom a indolamínmi nebola účinná v prípade odstránenia Na^+ z roztoku na luminálnej strane hrubého čreva, čo je potvrdením, že meraný prúd zodpovedá Na^+ absorpcii. Inhibícia indolamínmi je pravdepodobne možná vďaka ich vzájomnej štrukturálnej podobnosti s amiloridom. Je však potrebné mať na zreteli veľmi vysoké použité koncentrácie indolov, ktoré sú niekoľko rádov vzdialené od fyziologických ($10^{-10} - 10^{-9} M$). Nemožno však vylúčiť reálne uplatnenie daných koncentrácií v kolonocytoch ležiacich v tesnej blízkosti buniek, produkujúcich vo zvýšenej miere indolamíny a účastniacich sa v parakrinnej regulácii sodíkovej absorpcie.

2.6.5. Modulácia sekrécie pankreatických enzýmov

Intraduodenálne podávaný melatonín (1, 5, 25 mg/kg) a jeho prekursor L-tryptofán (10, 50, 250 mg/kg) ovplyvnil hladinu sekretovanej pankreatickej amylázy a plazmatickú hladinu cholecystokinínu (CCK) (Leja-Szpak et al. 2004). Po aplikácii oboch indolov bol nameraný koncentračne závislý nárast sekrécie pankreatickej amylázy. Tento efekt melatonínu a L-tryptofánu bol úplne zrušený u skupiny pokusných zvierat, ktorým bola vopred zablokovaná aferentná inervácia neurotoxínom kapsaicínom. Toto poukazuje na účasť neurálneho systému v prijímaní, sprostredkovaní a interpretácii melatonínového signálu z duodena.

Ak sa pred podaním melatonínu (resp. L-tryptofánu) aplikoval antagonist CCK pankreatického receptora – tarazepid, došlo k potlačeniu melatonínom stimulovanej sekrécie amylázy na kontrolnú hladinu. Tento výsledok vypovedá o úlohe CCK v sprostredkovaní odpovede na melatonín. Melatonín spôsobí nárast uvoľnenia CCK (pravdepodobne aj za účasti senzorických nervov) a CCK stimuluje samotnú sekréciu amylázy. Keďže melatonín a jeho receptory boli v pankrease identifikované aj v intaktnom tkanive (Herichová a Zeman 2000, Kemp et al. 2002), je pravdepodobné, že sa na reguláciách sekrécie pankreatických enzýmov účastní aj endogénny melatonín.

2.6.6. Vplyv na sekréciu inzulínu

Exogénne podávaný melatonín, má vplyv na glukózou stimulovanú sekréciu inzulínu β -bunkami izolovaných Langerhansových ostrovčekov. Aplikovaný melatonín (v dávkach 10 nM - 5 μ M) inhiboval sekréciu inzulínu vyvolanú podaním glukózy (Peschke et al. 1997). Samotný melatonín (aplikovaný v koncentrácii 5 μ M), resp. serotonín nemali priamy efekt na bazálnu sekréciu inzulínu.

Z hľadiska možnej úlohy melatonínu v regulácii sekrécie inzulínu bola preskúmaná súvislosť hladiny melatonínu, resp. expresie melatonínových receptorov u pacientov s cukrovkou. Peschke et al. (2006) namerali zníženú hladinu plazmatického melatonínu u pacientov s diabetes mellitus typu II. Na potkaniom modeli diabetes mellitus typu II (potkany Goto Kakizaki) namerali zvýšenú expresiu mRNA MT1 receptorov v pankrease, pričom u týchto potkanov zároveň namerali zníženú expresiu inzulínového receptora v epifýze a zníženú aktivitu epifyzárnej AA-NAT. Nižšia aktivita epifyzárnej AA-NAT korelovala so zníženou hladinou plazmatického melatonínu.

Ukazuje sa preto možná funkčná spätosť melatonínu a inzulínu, ako i možný súvis redukcie hladiny plazmatického melatonínu so vznikom cukrovky.

2.6.7. Vplyv na črevnú motilitu

Úloha melatonínu bola popísaná aj v regulácii motility čreva. Elektrofyziológickými meraniami myoelektrickej aktivity *migrujúcich motorických komplexov* (MMC) v tenkom čreve, bolo stanovené, že po podaní antagonistu melatonínových receptorov S 22153 (N-[2-(5-etylbenzo[b]tien-3-yl)etyl]acetamid), bola nočná aktivita motorických komplexov (líšiaca sa od denných) približovaná denným (Merle et al. 2000). Ak bol S 22153 podaný cez deň, profil aktivity MMC sa nezmenil. To naznačuje fyziologické pôsobenie endogénneho melatonínu v rámci regulácie črevnej motility, ako i možnú spätosť centrálného pacemakera (ktorého efektorom je rytmizujúca hladina plazmatického melatonínu) a periférie, keďže bol ukázaný efekt antagonistu melatonínu v noci, v čase vysokej hladiny plazmatického melatonínu a žiaden efekt počas dňa, kedy je hladina plazmatického melatonínu niekoľkokrát nižšia.

Exogénne podaný melatonín (1 mg/kg) navodzoval zmeny aktivity motorických komplexov aj v závislosti od príjmu potravy (pred príjmom, počas príjmu, v stave nasýtenia). Modulačný efekt melatonínu na spontánne kontrakcie svaloviny slepého čreva bol ukázaný u prepelice (Poon et al. 2002), keď podaný melatonín zvyšoval frekvenciu i mohutnosť kontrakcií v závislosti od koncentrácie aplikovaného melatonínu (EC₅₀ ~ 16 nM) a tento efekt bol zrušený antagonistami MT₂/MT₁ receptorov, luzindolom i 4-P-PDOT.

Ukázalo sa, že melatonín má vplyv na motilitu aj vyjadrením rýchlosti prechodu tráveniny črevom (Drago et al. 2002). Priechodnosť tráveniny bola meraná 1 hodinu po intraperitoneálnom podaní melatonínu (1 – 1000 µg/kg). Zaujímavý je protichodný efekt u rozdielnych koncentrácií aplikovaného melatonínu. Nižšie dávky (1 µg/kg, 10 µg/kg) zrýchlili prechod tráveniny črevom v porovnaní s potkanmi, ktorým bol aplikovaný fyziologický roztok. Luzindol zrušil efekt melatonínu (1 a 10 µg/kg). Odlišne pôsobil melatonín podaný vo vysokých dávkach (100 µg/kg, 1000 µg/kg), kedy došlo k spomaleniu prechodu tráveniny v porovnaní s kontrolami. Ukazuje sa tak, že melatonín môže mať aj protichodný účinok, a pravdepodobne ovplyvňuje súčasne rozdielne signalizačné dráhy a dôležitým faktorom je koncentrácia.

2.6.8. Antioxidačný účinok

Melatonín svojou chemickou podstatou umožňuje reakciu s kyslíkovými resp. hydroxylovými radikálmi, a je tak potenciálnym antioxidantom, ktorý môže zlepšovať patologické stavy spôsobené nežiadúcimi voľnými radikálmi. Jeho úloha bola preukázaná v ochrane pred tvorbou žalúdočných vredov na zvieracom modeli s indukovanou tvorbou vredov (Bandyopadhyay et al. 2002). Potkanom bola chladovým stresom naindukovaná tvorba žalúdočných vredov, pričom sa rapídne zvýšil obsah hydroxylových radikálov v stene žalúdka. Po aplikácii melatonínu intraperitoneálne došlo k zníženiu obsahu radikálov, pričom bol efekt koncentračne závislý a maximálna redukcia – o 90% – bola dosiahnutá pri dávke melatonínu 60 mg/kg. V porovnaní s klinicky používanými liečivami, bol melatonín účinnejší ako ranitidín a menej účinný ako omeprazol a pri spolupôsobení liečiva a melatonínu, bol efekt vyšší ako súčet samostatne pôsobiacich látok (Bandyopadhyay et al. 2002)

Pri aplikácii melatonínu bola redukovaná miera peroxidácie lipidov a karbonylácie proteínov, čo sú indikátory stupňa oxidácie voľnými radikálmi. Zároveň sa zdvihla hladina glutatiónu na hladinu rovnakú ako u kontrolných zvierat, u ktorých nebola chladom indukovaná ulceróza a bola zaznamenaná znížená aktivita žalúdočnej peroxidázy a stimulácia aktivity mitochondriálnej superoxid dizmutázy, čo svedčí aj o nepriamom benefičnom účinku melatonínu v ochrane proti oxidačnému stresu.

Podobne efektívny v odstraňovaní hydroxylových radikálov bol melatonín aj *in vitro*. V koncentrácii 100 mM znížil hladinu hydroxylových radikálov o 80% (Bandyopadhyay et al. 2000).

Melatonín sa vo svetle týchto zistení ukazuje ako účinná protektívna substancia proti negatívnym účinkom voľných radikálov. Jednak priamymi antioxidačnými účinkami ako scavenger hydroxylových radikálov i nepriamo, ovplyvnením aktivity peroxidáz a superoxididismutázy.

Používané dávky a koncentrácie sú vysoké, a tak je možné uvažovať o benefičnom farmakologickom účinku, avšak rovnaká funkcia a miera uplatnenia endogénneho melatonínu je v týchto procesoch v organizme za fyziologických podmienok otázná.

2.6.9. Antikancerogénny a proapoptotický účinok

Melatonín bol v vo viacerých prácach ukázaný ako molekula s proapoptotickým účinkom, a to najmä u buniek imunitného a nervového systému ako i v nádorových bunkách (Sainz et al. 2003). Antiproliferatívny účinok melatonínu a jeho analógu UCM 386 (N-[(4-metoxy-1H-indol-2-yl)metyl]propanamid) u adenokarcinómu hrubého čreva u myši ukázali Karasek a Pawlikowski (1999). Tento efekt neskôr potvrdili na bunkách rakovinej línie hrubého čreva.

Melatonín je tak schopný benefičného účinku proti nádorovému bujneniu potlačovaním bunkového delenia a tým vo výsledku znížením intenzity delenia buniek nádoru, ako aj proapoptotickým účinkom, zvýšením počtu buniek, u ktorých došlo k programovanej bunkovej smrti (Winczyk et al. 2001, Winczyk et al. 2002).

Benefičný efekt bol ukázaný aj v klinickej štúdii u pacientov trpiacich rakovinou (rakovina prsníka, nádory v gastrointestinálnom trakte, nádory v oblasti hlavy), keď u skupiny pacientov u ktorých bol vedľa chemoterapie podávaný perorálne melatonín (20 mg/deň) bolo viac pacientov, ktorý prežili aspoň 1 rok od začiatku štúdie ako u skupiny pacientov, ktorí boli liečení iba chemoterapiou (Lissoni et al. 1999). Navyše u skupiny ktorej bol podávaný melatonín dochádzalo k zriedkavejšiemu objavovaniu sa vedľajších príznakov spojených s chemoterapiou.

Melatonín tak môže zohrávať prirodzenú ochranu organizmu a je potenciálne možné aj jeho farmakologické uplatnenie v spomaľovaní nádorového bujnenia.

3. Ciele diplomovej práce

Ako vyplýva z literárneho prehľadu, jednoznačná úloha melatonínu v gastrointestinálnom trakte nebola stanovená, napriek jeho vysokému výskytu. Podrobnejšie bol ukázaný vplyv melatonínu na transportné procesy v duodene. Chýbajú však poznatky možného vplyvu na transportné procesy v intaktnom hrubom čreve.

Podobne bol ukázaný výskyt melatonínových receptorov v tkanive gastrointestinálneho traktu, ale chýba podrobná štúdia detailného rozloženia a množstva v rámci tráviacej trubice.

Preto bolo naším cieľom preštudovať úlohu melatonínu v regulácii transportu v hrubom čreve a podrobne stanoviť expresiu melatonínových receptorov v rámci rostro-kaudálnej i serózne-mukóznej osi za fyziologických podmienok a preskúmať vplyv zmeny fyziologických podmienok na distribúciu melatonínových receptorov.

Stanovili sme ciele:

- 1) Určiť úlohu melatonínu v regulácii transportu v distálnom hrubom čreve.
- 2) Stanoviť miesta pôsobenia melatonínu podrobnou lokalizáciou a kvantifikáciou melatonínových receptorov v horizontálnej a vertikálnej osi čreva.
- 3) Určiť či sa pri zmene fyziologických podmienok môže expresia receptorov meniť.

4. Materiál a Metódy

4.1. *Použité zvieratá*

Potkany kmeňa Wistar boli chované za štandardných podmienok s príjmom potravy a vody *ad libitum*. V experimentálnych podmienkach hladovania bol potkanom zamedzený prístup ku potrave po dobu 48 hodín, resp. 7 dní, za zachovania príjmu vody *ad libitum*. Svetelný režim bol nastavený na 12 hodín svetla a 12 hodín tmy (LD 12:12).

Potkany boli usmrčované vo veku 60 – 90 dní. Boli dekapitované po cervikálnej dislokácii v 3. až 8. hodine subjektívneho dňa. Po usmrtení boli odobraté vzorky tkaniva ihneď spracované, alebo uskladnené v tekutom dusíku pre neskoršie spracovanie.

Potkany použité v pokuse na stanovenie 24 hodinového profilu expresie boli chované v režime LD 12:12. Samotný odber začal počiatkom subjektívneho dňa, celý odber (počas 24 hodín) prebiehal v tme za použitia slabého červeného svetla.

Vzorka myenterického plexu získaná od prof. Dienera (viď. kapitola 4.6.1.1) bola izolovaná z mláďaťa potkana kmeňa Wistar vo veku 6 dní.

4.2. *Použité chemikálie*

- Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

D-manitol, L-glutamín, β -hydroxybutyrát, melatonín

- Lachema (Brno, ČR)

NaCl, NaHCO₃, KH₂PO₄, K₂HPO₄, MgCl₂, CaCl₂, D-glukóza

- Technoplyn-Linde (Praha, ČR)

pneumoxid (95% O₂ + 5% CO₂)

- Top-Bio (Praha, ČR)

RNAblue, agaróza, MgCl₂, PPP PCR Master Mix bez MgCl₂, etídiumbromid

- Biotika (Slovenská Ľupča, SR)

injekčná H₂O

- Invitrogen, Inc

5x First Standard Buffer, RNase OUT (Ribonuclease Inhibitor), SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase, dithiothreitol (DTT), Random Primers

- Roche Applied Science (Basel, Schweiz)
LC-FastStart DNA Master SYBR Green I (LC-FastStart Reaction Mix 10x, MgCl₂, PCR grade H₂O), PCR DeoxyNucleotide Mix
- Fermentas, Inc
6x Loading Dye Solution, Gene Ruler DNA ladder mix
- Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
QuantiTect™ SYBR® Green PCR Master Mix
- M.G.P. (Zlín, ČR)
PGE₂

4.3. Použité přístroje:

- Ing. Mussler (Aachen, Deutschland)
aparátúra napät'ového zámku
- Eppendorf (Hamburg, Deutschland):
Mastercycler personal, Thermomixer comfort, Biophotometer
- SIGMA Laborzentrifugen GmbH (Osterode am Harz, Deutschland):
laboratórna centrifuga
- Roche Applied Science (Basel, Schweiz):
Lightcycler®
- KINEMATICA AG (Littau, Schweiz):
Polytron® PT 3000
- Cole-Parmer Instrument Company (Illinois, USA)
Ultrasonic processor
- Carl Zeiss GmbH (Jena, Deutschland):
Spekol 210
- IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland):
Minishaker MS2
- Sartorius AG (Göttingen, Deutschland):
analytické váhy

4.4. Použitý software:

- vclamp (Počítačový program komunikujúci s aparátúrou napät'ového zámku) (Ing. Mussler, Aachen, Deutschland)
- BLAST (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)
- DNASTAR (Lasergene)

4.5. Metóda napät'ový zámok (voltage-clamp)

4.5.1. Odobratie tkaniva

Po usmrtení zvieraťa bola vypreparovaná distálna časť hrubého čreva. Črevo bolo premyté fyziologickým roztokom a pozdĺžne rozstrihnuté a následne prevedený tzv. „partial stripping” – zo seróznej strany odstránenie vrstvy serózy a logitudinálnej svaloviny s myenterickým plexom. Zachované ostávajú vrstva epiteliálnych buniek na lamina propria so submukózou a submukóznym plexom a cirkulárna svalovina. Takto stiahnutý kus distálneho čreva je vnesený do Ussingovej komôrky v aparátúre napät'ového zámku pre meranie transepitelového transportu.

4.5.2. Aparatúra napät'ového zámku

Aparatúru tvorí Ussingova komôrka (obr. 4), ktorú tvoria dve nádobky s objemom 5 ml, spojené otvorom o ploche 9.6 mm^2 , ktorý pri meraní vyplňuje črevné tkanivo zasadené do otvoru „na tesno” tak, aby jediný možný prechod prúdu, resp. prenášaných látok bol cez črevné tkanivo. Komôrky boli premývané Krebs-Ringerovým roztokom (viď Zloženie Krebs-Ringerovho roztoku) o teplote $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a prebublávané pneumoxidom ($95\% \text{ O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$). Na každej strane komôrky je v roztoku napät'ová a prúdová elektróda. Napät'ové elektródy merajú napätie vznikajúce medzi oboma polovicami komôrky a prúdové elektródy následne vysielajú tzv. kompenzačný prúd (skratovací prúd, I_{sc}), čo je prúd vysielaný o takej veľkosti, aby sa udržal na obidvoch stranách črevného tkaniva nulový transepitelový potenciál. Veľkosť skratovacieho prúdu je tak vyjadrením miery elektrogénneho transportu cez črevný epitel.

Po umiestnení črevného tkaniva, inkubačného roztoku a elektród dochádza 20 – 30 min. k ustáľovaniu a stabilizovaniu vypreparovaného črevného tkaniva v aparátúre a inkubačnom roztoku, ako i k ustáleniu bazálnej hladiny transportu, ktorá môže prirodzene prebiehať. K takto stabilizovanému črevu v aparátúre, môžeme pridaním substancií sledovať akú zmenu v elektrogénnom transporte pridaná substancia vyvolá, sledovaním zmeny I_{sc} . V prípade skúmania modulačného účinku jednej substancie na druhú, sa prvá pridá niekoľko minút pred aplikáciou druhej.

Zloženie Krebs-Ringerovho roztoku:

140,5 mM Na^+

5,4 mM K^+

1,2 mM Ca^{2+}

1,2 mM Mg^{2+}

119 mM Cl^-

21 mM HCO_3^-

0,6 mM $H_2PO_4^-$

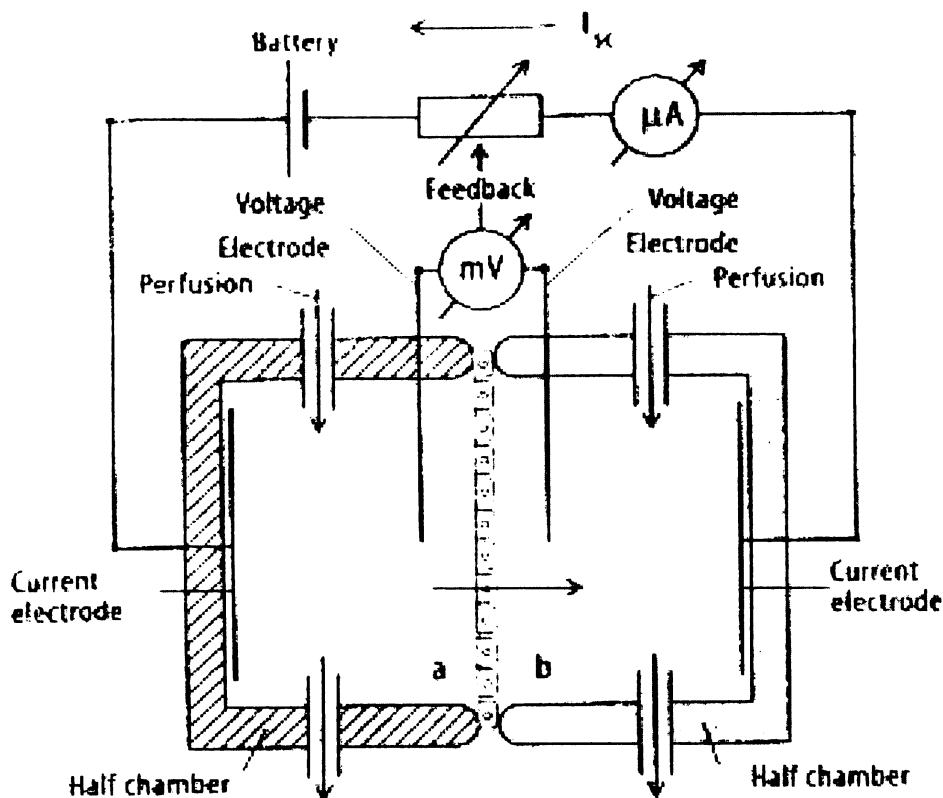
2,4 mM HPO_4^{2-}

10 mM D-manitol

10 mM D-glukóza

2,5 mM L-glutamín

0,5 mM β -hydroxybutyrát



[Greger/Windhorst, Comprehensive Human Physiology, Vol. 2, Springer-Verlag Heidelberg 1996]

Obr. 4. Ussingova komôrka v aparátúre napät'ového zámku. Črevné tkanivo je vmedzerené na tesno v presne definovanej ploche. Črevný epitel je tak jediným priechodným kontaktom dvoch strán Ussingovej komôrky. I_{sc} – skratovací prúd, Voltage electrode – napät'ová elektróda, Current electrode – prúdová elektróda, Perfusion – smer prúdenia premývacieho roztoku. Napät'ové elektródy merajú napätie vznikajúce medzi črevom spojenými polovicami Ussingovej komôrky, prístroj následne vysiela prúdovými elektródami kompenzačný prúd o takej veľkosti, aby bolo udržované nulové napätie. Veľkosť vynaloženého skratovacieho prúdu vypovedá o miere elektrogénneho transportu cez črevný epitel.

4.6. Metóda real-time RT-PCR

4.6.1. Odobratie tkaniva

Po usmrtení zvierat'a bola otvorená brušná dutina a vybraté črevo. Črevo bolo prepláchnuté a vystrihnutý 4 – 6 cm úsek duodena, jejuna, ilea a hrubého čreva. Črevo bolo pozdĺžne nastrihnuté a umiestnené seróznou stranou na gumovú podložku. Špachtličkou bola jemne zoškrabnutá mukózna vrstva. Táto vzorka bola označená ako 'epitel'. Následne bola mukózna a submukózna vrstva zoškrabaná čo najdokonalejšie a zvyšok črevného tkaniva, obsahujúci zvyšky submukózy, pozdĺžnu a cirkulárnu svalovinu, myenterický plexus a serózu, bol označený ako 'subepitel'.

Vedľa črevných vzorkov boli potkanom odoberané vzorky týmusu a hypofýzy, spracovávané ďalej rovnako ako vzorky črevné.

Všetky vzorky sa odoberali približne v množstve 100 mg, ak bolo množstvo materiálu dostatočné, v opačnom prípade bolo odobraté maximálne možné množstvo.

4.6.1.1. Špecificky izolované tkanivo myenterického plexu

Tkanivo izolovaného črevného myenterického plexu z mláďaťa potkana vo veku 6 dní, bolo získané z laboratória prof. Dr. Martina Dienera (Institut für Veterinär-Physiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, Deutschland). Histologický preparát prevedený v laboratóriu prof. Dienera, potvrdzuje, že sa jedná o sieť neuronálnych ganglií. Na tomto vzorku bola po izolácii celkovej RNA prevedená reverzná transkripcia a analýza prítomnosti transkriptu melatonínového receptora MT1.

4.6.2. Izolácia RNA

Zo vzoriek odoberaných tkanív bola vyizolovaná celková RNA. RNA bola izolovaná za pomoci komerčne dodávaného roztoku *RNA Blue* (reagens na rýchlu prípravu čistej a nedegradovanej RNA). K 100 mg tkaniva bolo okamžite pridané 1 ml *RNA blue*. Nasledovala homogenizácia na homogenizátore *Polytron* po dobu 1 minúty a vzorka sa nechala 5 minút inkubovať pri laboratórnej teplote. Zhomogenizovaná vzorka bola prenesená do mikroskúmavky. Ku vzorke bolo pridané 0,2 ml chloroformu a dôkladne sa pretrepala po dobu 15 sekúnd a nechala 5 minút inkubovať. Nasledovala centrifugácia pri 12 000 x g, 10 min., 4 °C. Vrchná vodná fáza bola prenesená do novej skúmavky a pridaním 0,5 ml izopropylalkoholu sa RNA vyprecipitovala. Následne sa vzorka inkubovala 10 minút pri 4 °C a bola centrifugovaná pri 12 000 x g, 10 min., 4 °C. Bol odstránený supernatant a k sedimentu pridaný 1 ml 75% etanolu. Skúmavka bola dôkladne pretrepaná a RNA sedimentovaná centrifugáciou pri 12 000 x g, 5 min., 4 °C. Supernatant bol odsatý vákuovou odsávačkou a peleta vysušená pri 37 °C v prístroji *Thermomixer*. Následne bola RNA rozpustená v 20 – 50 µl RNA-free H₂O (množstvo H₂O odhadnuté podľa veľkosti pelety). Koncentrácia a čistota RNA boli určené spektrofotometricky prístrojom *Biophotometer*. RNA bola uskladnená pri –80 °C a pripravená na reverznú transkripciu.

4.6.3. Reverzná transkripcia

Reverznou transkripciou sa vyizolovaná RNA prepíše enzýmom reverznej transkriptázy do stabilnejšej DNA formy. Výsledná DNA vzniknutá prepisom RNA sa označuje ako cDNA.

Do tenkostennej 200 μ l mikroskúmavky bola zmiešaná zmes:

0,5 μ l dNTP mix (10 mM zásobný roztok, 0,5 mM výsledná koncentrácia)

0,5 μ l zmesi degenerovaných primerov (random hexamers) (1 μ g/ μ l zásobný roztok, 50 ng/ μ l výsledná koncentrácia)

0,5 μ l reverzného špecifického primeru (5' TGC CAC AGC TAA ACT CAC CAC AAA T 3') (2 μ M zásobný roztok, 100 nM výsledná koncentrácia)

RNA (v príslušnom množstve podľa koncentrácie nariadená tak, aby do reakcie prišlo ~ 2 μ g RNA)

H₂O (doplnenie objemu podľa objemu pridávanej RNA).

Celkový objem RNA + H₂O bol 4 μ l.

***Pozn.** Pridaný špecifický primer bol v reakcii použitý na zvýšenie účinnosti reverznej transkripcie a vyšších výťažkov cDNA (keďže prítomnosť sledovaných mRNA nie je vysoká), ako vyplynulo z optimalizačných pokusov.*

Táto zmes v skúmavke bola zahriata na 70 °C na dobu 5 minút na prístroji *Mastercycler personal* a následne prudko schladená na teplotu 4 °C.

K tejto zmesi bolo pridané 4,5 μ l zmesi master-mixu nasledujúceho zloženia:

2 μ l 5 x First Standard Buffer (5 x riedený zásobný roztok)

1 μ l injekčnej H₂O

0,5 μ l DTT

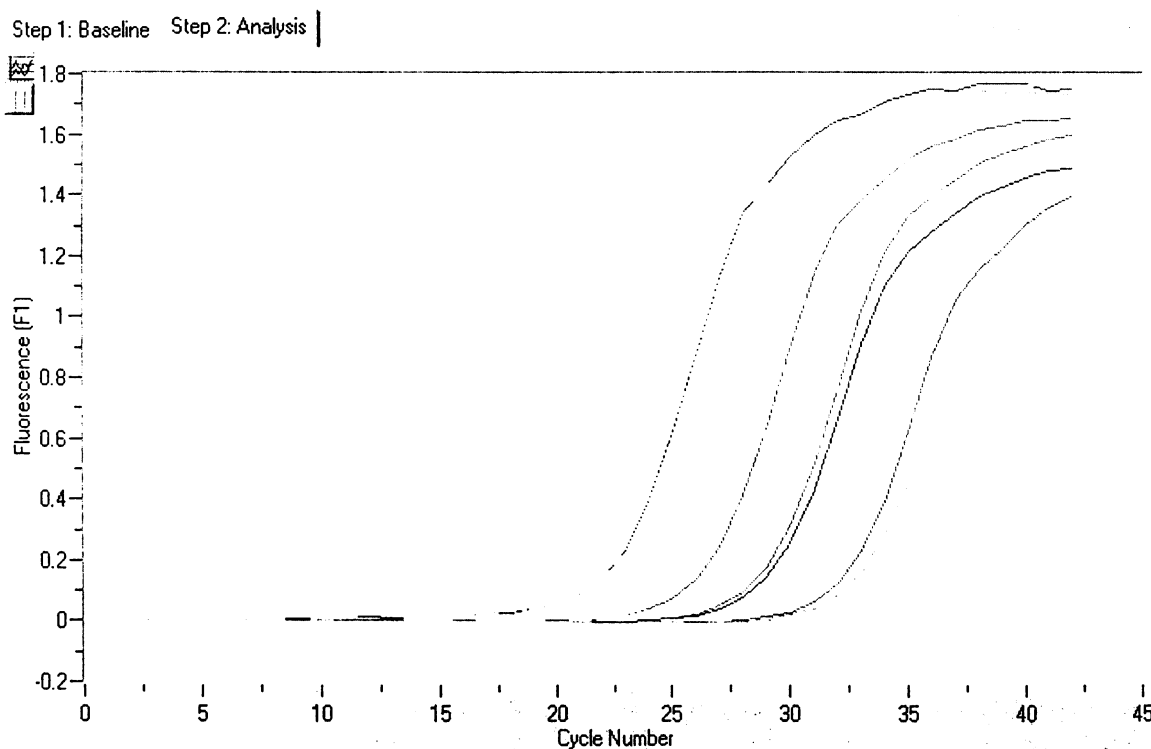
0,5 μ l RNase OUT (inhibítor RNáz)

0,5 μ l SuperScript II

Zmes bola následne inkubovaná na prístroji *Mastercycler personal* 10 minút pri 25 °C, 50 minút pri 45 °C. Reakcia bola ukončená následnou denaturáciou 2 minúty pri 95 °C. Výsledná zmes cDNA bola schladená na 4 °C pripravená na ďalšie použitie, resp. na uskladnenie pri -20 °C.

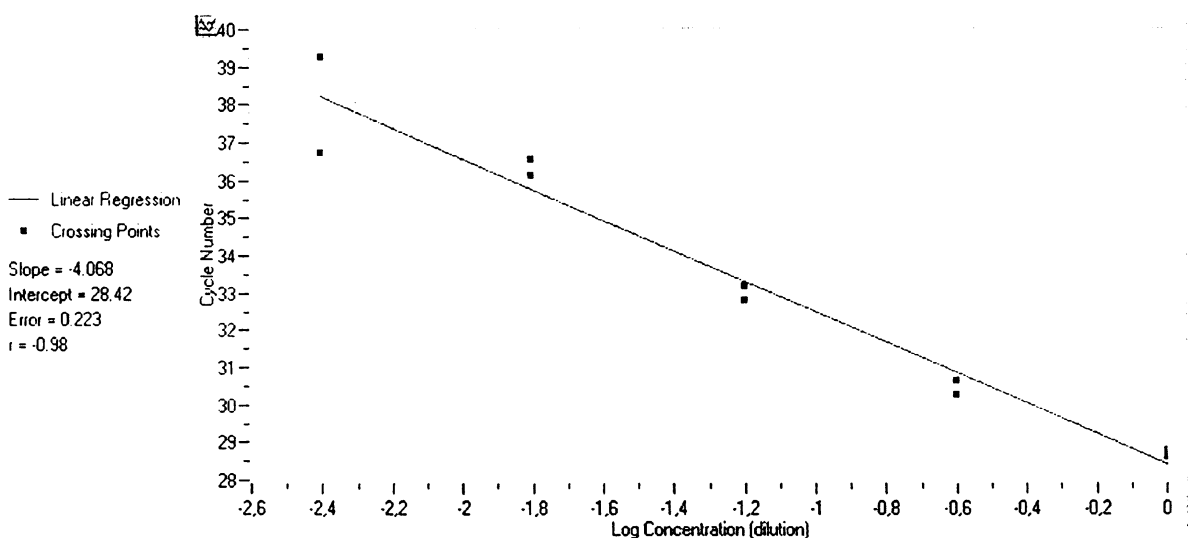
4.6.4. Kvantifikácia cDNA

Bol použitý systém s fluorescenčným farbivom *SYBR Green I*, ktorého intenzita fluorescence vypovedá o množstve prítomnej dvojreťazcovej DNA. Samotná PCR reakcia a meranie bolo prevádzané na prístroji *Lightcycler*[®]. V každom cykle PCR bolo zmerané množstvo dvojreťazcovej DNA. Následne bola určená tzv. Ct hodnota (threshold cycle) pre každú vzorku. Hodnota Ct vypovedá o množstve špecifickej templátovej cDNA, ktorá bola vložená do reakcie na začiatku. Ct odpovedá cyklu, v ktorom začala koncentrácia produktu lineárne stúpať (obr. 5). Tento cyklus bol určený druhou deriváciou krivky zobrazujúcej fluorescenčný signál v čase.



Obr. 5. Určenie Ct (threshold cycle). Výstup z merania fluorescence počas PCR na prístroji *Lightcycler*[®]. Jednotlivé vzorky reprezentujú riediacu radu kalibračnej krivky.

V každej sérii merania bola určená kalibračná krivka (obr. 6) pre rôzne riedenia. Použitá bola vzorka hypofýzy 10x riedenej cDNA. Jej relatívna koncentrácia bola priradená jednej. Následne bola vzorka nariedená 4x, 16x, 64x a 256x (riedenia zodpovedajú relatívnym koncentráciám 1, $2,5 \cdot 10^{-1}$, $6,25 \cdot 10^{-2}$, $1,56 \cdot 10^{-2}$, $3,91 \cdot 10^{-3}$). Hodnoty Ct boli logaritmicke vynesené v závislosti na relatívnej koncentrácii. Pri exponenciálnom množení a rovnakej účinnosti PCR reakcie nezávislej na množstve templátu, je výslednou krivkou logaritmickeho výnosu priamka. Smernica priamky zodpovedá miere účinnosti PCR reakcie. V každej jednotlivej sérii merania bola meraná aj vzorka tvorená zmesou rôznych vzoriek, použitá ako interný štandard, na relevantné porovnanie jednotlivých sérii. Ako referenčný gén na normalizáciu bol použitý β -aktín (overenie vhodnosti použitia β -aktínu vid' kapitola 1.6.6). Výsledná relatívna koncentrácia bola vyjadrená ako pomer špecifického génu (MT1) a β -aktínu. Každá meraná vzorka bola do reakcie pridávaná ako 10x riedená cDNA.



Obr. 6. Kalibračná priamka. Riediaca rada vzorky hypofýzy, použitá na výpočet účinnosti PCR reakcie, a následne podľa nej spočítané relatívne koncentrácie jednotlivých vzoriek.

Výsledok PCR bol overený na gelovej elektroforéze v 1,5% agarózovom gele v TAE pufre, špecificita produktu bola overená sekvenáciou.

Pozn. Na kvantifikáciu boli použité kity od dvoch rôznych dodávateľov, z ekonomických dôvodov i vyššej citlivosti, ktoré sa ukázali v priebehu experimentov. V rámci skupiny experimentov ktorých výsledky boli vzájomne porovnávané bol použitý vždy rovnaký kit.

4.6.4.1. *Kvantifikácia MT1 pomocou Roche Lightcycler FastStart DNA Master*

PCR reakcia bola prevádzaná v sklenených kapilárach (Roche) v objeme 10 μ l.
Reakčná zmes:

1,2 μ l 25mM MgCl₂ (výsledná koncentrácia 4 mM, pre β -aktín) resp. 0,8 μ l 25mM MgCl₂ (výsledná koncentrácia 3 mM, pre MT1)

0,2 μ l 25 μ M primer forward (výsledná koncentrácia 0,5 μ M)

0,2 μ l 25 μ M primer reverse (výsledná koncentrácia 0,5 μ M)

1 μ l LightCycler FastStart Reaction Mix SYBR Green I

doplnené PCR H₂O do 9 μ l

1 μ l 10 x riedeného cDNA templátu

Podmienky PCR reakcie pre MT1:

primer forward: 5' AGG CGG CGG GGA AAT AAG 3'

primer reverse: 5' TGC CAC AGC TAA ACT CAC CAC AAA T 3'

koncentrácia Mg²⁺ 3mM

1. preinkubácia

95 °C 7 minút

2. PCR cyklus 45x

a) denaturácia 95 °C 10 sekúnd

b) aníling 56 °C 10 sekúnd

c) elongácia 72 °C 6 sekúnd

d) meranie fluorescencie 85 °C 3 sekundy

3. analýza teploty topenia produktov

kontinuálne meranie fluorescencie pri zvyšujúcej sa teplote (72 °C – 97 °C s krokom 0,1 °C)

dĺžka PCR produktu: 178 bp

teplota topenia produktu (určená analýzou): 87 °C

Podmienky PCR reakcie pre β -aktín:

primer forward: 5' TAC AAC CTC CTT GCA GCT CC 3'

primer reverse: 5' TTC TGA CCC ATG CCC ACC A 3'

koncentrácia Mg^{2+} 4mM

1. preinkubácia

95 °C 7 minút

2. PCR cyklus 45x

a) denaturácia 95 °C 15 sekúnd

b) aníling 54 °C 10 sekúnd

c) elongácia 72 °C 7 sekúnd

d) meranie fluorescencie 89 °C 3 sekundy

3. analýza teploty topenia produktov

kontinuálne meranie fluorescencie pri zvyšujúcej sa teplote (72 °C – 97 °C s krokom 0,1 °C)

dĺžka PCR produktu: 203 bp

teplota topenia produktu (určená analýzou): 92 °C

Podmienky PCR reakcie pre 18S rRNA:

primer forward: 5' GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT 3'

primer reverse: 5' CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG 3'

koncentrácia Mg^{2+} 4mM

1. preinkubácia

95 °C 7 minút

2. PCR cyklus 45x

a) denaturácia 95 °C 15 sekúnd

b) aníling 52 °C 10 sekúnd

c) elongácia 72 °C 8 sekúnd

d) meranie fluorescencie 82 °C 3 sekundy

3. analýza teploty topenia produktov

kontinuálne meranie fluorescencie pri zvyšujúcej sa teplote (72 °C – 97 °C s krokom 0,1 °C)

dĺžka PCR produktu: 151 bp

teplota topenia produktu (určená analýzou): 85,5 °C

4.6.4.2. Kvantifikácia MT1 pomocou Qauntitect SYBR Green Master mix

PCR reakcia bola prevádzaná v sklenených kapilárach (Roche) v objeme 10 µl.

Reakčná zmes:

3,6 µl PCR H₂O

0 µl MgCl₂ (výsledná koncentrácia 2,5 mM)

0,2 µl 25µM primer forward (výsledná koncentrácia 0,5 µM)

0,2 µl 25µM primer reverse (výsledná koncentrácia 0,5 µM)

1 µl Quantitect™ SYBR Green Master mix

1 µl 10 x riedeného cDNA templátu

Podmienky PCR reakcie pre MT1:

primer forward: 5' AGG CGG CGG GGA AAT AAG 3'

primer reverse: 5' TGC CAC AGC TAA ACT CAC CAC AAA T 3'

koncentrácia Mg²⁺ 2,5mM

1. preinkubácia

95 °C 15 minút

2. PCR cyklus 55x

a) denaturácia 94 °C 15 sekúnd

b) aníling 56 °C 15 sekúnd

c) elongácia 72 °C 10 sekúnd

d) meranie fluorescencie 80 °C 5 sekúnd

3. analýza teploty topenia produktov

kontinuálne meranie fluorescencie pri zvyšujúcej sa teplote (72 °C – 97 °C s krokom 0,1 °C)

dĺžka PCR produktu: 178 bp

teplota topenia produktu (určená analýzou): 85,5 °C

Podmienky PCR reakcie pre β -aktín:

primer forward: 5' TAC AAC CTC CTT GCA GCT CC 3'

primer reverse: 5' TTC TGA CCC ATG CCC ACC A 3'

koncentrácia Mg^{2+} 2,5 mM

1. preinkubácia

95 °C 15 minút

2. PCR cyklus 45x

a) denaturácia 94 °C 15 sekúnd

b) aníling 56 °C 15 sekúnd

c) elongácia 72 °C 10 sekúnd

d) meranie fluorescencie 89 °C 5 sekúnd

3. analýza teploty topenia produktov

kontinuálne meranie fluorescencie pri zvyšujúcej sa teplote (72 °C – 97 °C s krokom 0,1 °C)

dĺžka PCR produktu: 203 bp

teplota topenia produktu (určená analýzou): 89 °C

4.6.4.3. Kvantifikácia MT2 pomocou *Qauntitect SYBR Green Master mix*

PCR reakcia bola prevádzaná v sklenených kapilárach (Roche) v objeme 10 μ l.

Reakčná zmes:

3,6 μ l PCR H_2O

0 μ l $MgCl_2$ (výsledná koncentrácia 2,5 mM (Mastermix už obsahuje Mg^{2+}))

0,2 µl 25µM primer forward (výsledná koncentrácia 0,5 µM)

0,2 µl 25µM primer reverse (výsledná koncentrácia 0,5 µM)

1 µl Quantitect™ SYBR Green Master mix

1 µl 10 x riedeného cDNA templátu

Podmienky PCR reakcie pre MT2:

primer forward: 5' GAC TTC GTG GGG AAC CTG CTT GTG A 3'

primer reverse: 5' CGG TTG ATG GCA ATG GCT GTG ATG T 3'

koncentrácia Mg²⁺ 2,5mM

1. preinkubácia

95 °C 15 minút

2. PCR cyklus 55x

- | | | |
|--------------------------|-------|-----------|
| a) denaturácia | 94 °C | 15 sekúnd |
| b) aníling | 58 °C | 15 sekúnd |
| c) elongácia | 72 °C | 10 sekúnd |
| d) meranie fluorescencie | 72 °C | 1 sekunda |

3. analýza teploty topenia produktov

kontinuálne meranie fluorescencie pri zvyšujúcej sa teplote (72 °C – 97 °C s krokom 0,1 °C)

dĺžka PCR produktu: 254 bp

teplota topenia produktu (určená analýzou): 85 °C

4.6.5. „Nested“-PCR

Pre analýzu expresie mRNA MT2 receptorov v črevných tkanivách, nebola nami prevádzaná metóda real-time RT PCR dostatočne citlivá. Preto bola na kvalitatívnu analýzu jednotlivých črevných vzoriek použitá metóda „nested“-PCR, kedy použitím dvoch párov primerov prebehnú dve reakcie PCR. V prvej PCR reakcii sa použijú vonkajšie primery, v druhej PCR reakcii sa ako templát použije produkt z prvej PCR reakcie a primery navrhnuté na vznikajúci produkt z prvej reakcie. Pôvodný signál sa tak rapidne zosilní, a týmto spôsobom je možné detekovať a namnožiť fragment, ktorý sa

v pôvodnej templátovej cDNA vyskytoval vo veľmi malom počte kópii a po prvej PCR reakcii nebol na gelovej elektroforéze detekovateľný.

4.6.5.1. Podmienky reakcie

Zloženie reakčnej zmesi:

12,5 µl Master-mix PPP 2x

2,5 µl 25 mM MgCl₂ (výsledná koncentrácia 2,5 mM)

0,25 µl 25µM primer forward (výsledná koncentrácia 0,25 µM)

0,25 µl 25µM primer reverse (výsledná koncentrácia 0,25 µM)

templát: 8 µl 10x ried. cDNA (v prípade 1. PCR), resp. 2,5 µl templátu z 1. PCR (v prípade 2. PCR)

doplnenie iH₂O do výsledného objemu reakcie 25 µl

primer-vonkajší-forward: 5' ATC TGT CAC AGT GCG ACC TAC C 3'

primer-vonkajší-reverse: 5' TTC TCT CAG CCT TTG CCT TC 3'

primer-vnútorý-forward: 5' AGC CTC ATC TGG CTT CTC AC 3'

primer-vnútorý-reverse: 5' TTG GAA GGA GGA AGT GGA TG 3'

Dĺžka výsledného produktu po 2. PCR (použití vnútorných primerov): 154 bp.

4.6.6. Analýza a vyjadrenie dát

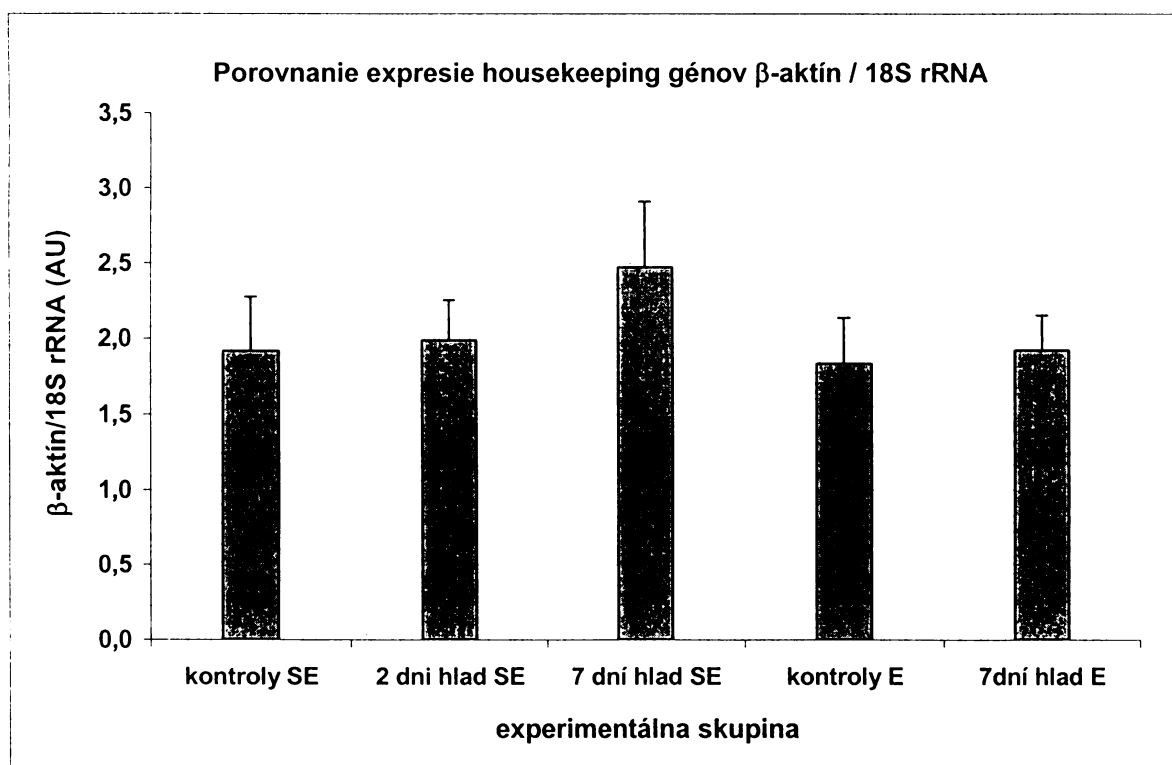
Na vyjadrenie relatívnej kvantifikácie MT1 ku β-aktínu bol použitý matematický model podľa Pfaffla (Pfaffl 2001):

$$\text{pomer MT1}/\beta\text{-aktín} = [E_{\text{MT1}}^{\Delta\text{Ct}_{\text{MT1}}(\text{štandard-vzorka})}] / [E_{\beta\text{-aktín}}^{\Delta\text{Ct}_{\beta\text{-aktín}}(\text{štandard-vzorka})}],$$

kde E je účinnosť PCR reakcie určená z kalibračnej priamky ($E = 10^{(-1/\text{smernica})}$) a ΔCt je rozdiel hodnoty cycle treshold interného štandardu a konkrétnej vzorky (Pfaffl 2001). Interný štandard, pridaný do každého merania, bol použitý na korigovanie rozdielov v účinnosti PCR reakcie medzi jednotlivými meraniami.

Pre skorigovanie rozdielov v množstve pridávaného templátu a v účinnosti reverzných transkripcií u rôznych vzoriek, boli dáta normalizované, aby mohli byť porovnávané. Pre normalizáciu dát bol použitý gén β -aktín (tzv. housekeeping gén), ktorého expresia sa považuje konštantne stabilnú. Pre naše experimentálne podmienky to bolo overené, keď boli porovnané expresie dvoch housekeeping génov (β -aktín a 18S rRNA) u vzoriek jednotlivých experimentálnych skupín (kontroly subepitel, 2 dni hladujúce subepitel, 7 dní hladujúce subepitel, kontroly epitel, 7 dní hladujúce epitel). Rozdiely medzi skupinami neboli dosiahnuté (ANOVA, $p > 0,05$) (Graf 1). Ukázali sme tak, že nie je signifikantný rozdiel podielu expresie 18S rRNA/ β -aktínu medzi našimi experimentálnymi skupinami.

Pre potvrdenie vhodnosti použitia β -aktínu ako housekeeping génu zároveň hovorí zistenie, že absolútne hodnoty Ct pre β -aktín u jednotlivých vzoriek sa vzájomne výrazne nelíšili (variabilita medzi vzorkami $< 5\%$).



Graf 1. Relatívna expresia housekeeping génov β -aktínu a 18S rRNA. Pomer expresie β -aktínu a 18S rRNA sa medzi jednotlivými experimentálnymi skupinami signifikantne nelíši, čo potvrdzuje vhodnosť použitia β -aktínu ako housekeeping génu v tejto štúdii. SE – subepitel, E – epitel.

4.7. Štatistika

4.7.1. Hodnotenie výsledkov meraní napät'ovým zámkom

Inhibičná konštanta IC_{50} , resp. jej dekadický logaritmus pIC_{50} , boli vypočítané z rovnice $I_{sc} = I_{sc_{min}} + (I_{sc_{max}} - I_{sc_{min}})/(1 + \exp(-k * (\log C - \log IC_{50})))$ podľa Elmhursta et al. (1997). Touto rovnicou bola fitovaná závislosť účinku PGE_2 na ΔI_{sc} pri vzrastajúcej koncentrácii melatonínu, pri čom bola vylúčená odľahlá hodnota (koncentrácia 10^{-6} M). Stredná chyba odhadu a koeficient mnohonásobnej korelácie sú uvedené vo výsledkovej časti spolu s hodnotou pIC_{50} .

4.7.2. Štatistika výsledkov analýzy real-time RT-PCR

4.7.2.1. Analýza bazálnych hladín expresie v jednotlivých tkanivách

Prezentované dáta sú vyjadrené ako priemery \pm SEM (stredná chyba priemeru). Odľahlé hodnoty boli vyradené Grubbsovým testom. Následne bola prevedená dvojfaktoriálna ANOVA s opakovaním. Skúmané boli dva faktory: „rosto-kaudálny“ (duodenum, jejunum, ileum, hrubé črevo) a „mukózne-serózný“ (epitel vs. subepitel). Rozdiely boli post hoc stanovené Newman-Keuls testom. Vo všetkých prípadoch bol za signifikantne významný rozdiel považovaný výsledok pri dosiahnutej hladine významnosti $p < 0,05$.

4.7.2.2. Analýza cirkadiálneho rytmu expresie

Možný rytmus v expresii receptorov v rámci 24 hodín bol podrobený tzv. kosínorovej analýze (Klemfuss a Clopton 1993). Dáta boli lineárnou regresiou aproximované ku kosínusovej krivke vyjadrenej rovnicou $Y = a + b_1 * \cos(2\pi * t) + b_2 * \sin(2\pi * t)$, kde y je aktuálna hodnota miery expresie, a je mezor určený regresiou, koeficienty b_1 , resp. b_2 určené regresiou, t je čas pre konkrétne Y , určený ako podiel aktuálneho času periódy ku celkovému trvaniu periódy (τ). Dosiahnutá hladina významnosti bola určená z kritickej hodnoty analýzy rozptylu daného testu.

4.7.2.3. *Analýza hladín expresie po experimentálnom hladovaní*

Vplyv hladovania na expresiu bol hodnotený Kruskal-Wallisovým testom. Na stanovenie rozdielov medzi experimentálnymi skupinami v jednotlivých segmentoch, týmuse a hypofýze bol prevedený post hoc Mann-Whitneyho test .

5. Výsledky a diskusia

5.1. Určenie vplyvu melatonínu na transepitelový transport v distálnom hrubom čreve

Dali sme si za úlohu preskúmať vplyv melatonínu na elektrogénne transportné procesy v hrubom čreve meraním zmien skratovacieho prúdu (Isc) na aparátúre napät'ového zámku. Z prvotných pokusov pôvodne vyplývalo, že melatonín spôsobuje kladnú zmenu Isc, pričom efekt melatonínu na Isc stúpá so zvyšujúcou sa koncentráciou. S pribúdajúcimi meraniami však postupne vyplynulo, že melatonín nespôsobuje nárast Isc vo všetkých prípadoch, ale že v niektorých prípadoch nespôsobí zmenu vôbec, prípadne spôsobí pokles Isc. Z tohoto hľadiska vyhodnocujeme vplyv melatonínu podávaného v koncentrácii 10^{-5} M, na elektrogénny transport v pomere frekvencií jednotlivých odpovedí (kladná zmena Isc, záporná zmena Isc, žiadna zmena Isc) na podaný melatonín a rozdiel v odpovedí v závislosti na strane, z ktorej bol melatonín podaný (mukózna, serózna, mukózna aj serózna).

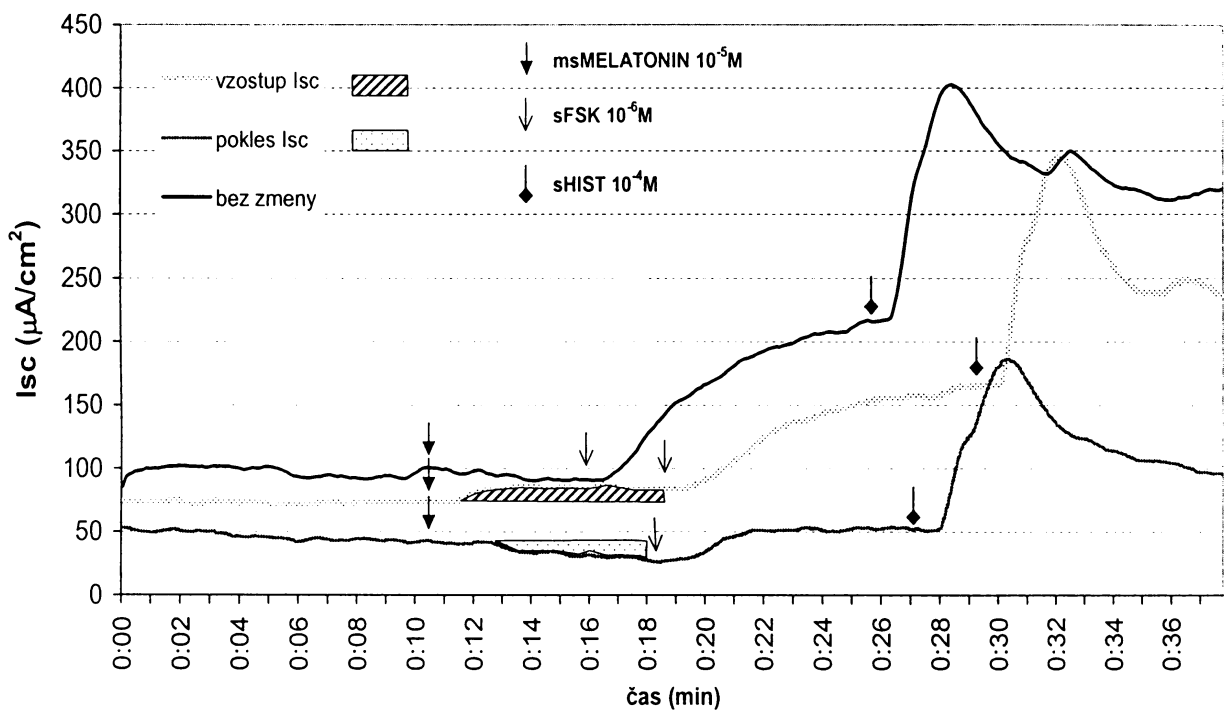
Modelová ukážka so všetkými typmi odpovedí na melatonín je na grafe 2. Melatonín bol v zobrazených prípadoch pridávaný v koncentrácii 10^{-5} M zároveň z mukóznej aj seróznej strany. Pre kontrolu viability čreva a schopnosti adekvátne reagovať na podnety, boli následne pridané forskolín (serózne) a histamín (serózne) a bola sledovaná odpoveď vyjadrená zmenou Isc. Forskolín a histamín sú silne prosekretorické substancie, ktoré vyvolávajú zvýšenie Isc, ak je črevo životaschopné. To, že histamín je schopný vyvolať odpoveď aj po saturovaní forskolínom, svedčí o rôznych signalizačných dráhach vyvolávajúcich sekréciu (forskolín – cAMP, histamín – Ca^{2+}).

Na grafe 2 je vidieť nepomer medzi veľkosťami zmeny Isc ako odpovedí na forskolín, histamín a melatonín. Melatonín tak síce spôsobuje zmeny Isc, tie sú však nízke a nejednotné, v čom môže hrať úlohu viacero faktorov.

Môže to svedčať o nižšej významnosti priameho pôsobenia melatonínu na elektrogénny transport v reálnych fyziologických procesoch v organizme, ako i možnosť, že melatonín stimuluje neelektrogénny transport, ktorý nie je možné zmerať metódou napät'ového zámku. Stimulačný vplyv melatonínu na sekréciu HCO_3^- bol podrobne ukázaný v duodene (Sjoblom a Flemstrom 2003), kde lumenálne podaný melatonín

v koncentrácii 10^{-6} M stimuloval sekréciu HCO_3^- do lumen duodena. Melatonín tak pravdepodobne zohráva úlohu v regulácii transportu. V distálnom hrubom čreve však prednostne prebiehajú úplne iné transportné procesy ako v duodene, a tak sa môže rôzne uplatňovať aj melatonín. V duodene ukázali Sjoblom et al. (2001) aj funkciu melatonínu v sprostredkovaní nervového signálu na sekréciu HCO_3^- ako mediátora. Podobnú funkciu nemožno vylúčiť ani v hrubom čreve.

Trojčaká odpoveď zmeny I_{sc} na priame pôsobenie melatonínu



Graf 2. Rôzne odpovede distálneho hrubého čreva na aplikovaný melatonín. FSK – forskolín, HIST – histamín, ms – mukózná aj serózná aplikácia, s – serózná aplikácia.

Pri mukóznej aj seróznej aplikácii melatonínu (msMELATONIN , 10^{-5} M) bola frekvencia nulových odpovedí 70%, kladných odpovedí (tj. po aplikácii melatonínu nasledoval vzostup I_{sc}) 20% a záporných odpovedí (tj. po aplikácii melatonínu nasledoval pokles I_{sc}) 10% pri celkovom počte meraní 58.

Paralelne boli prevádzané pokusy s aplikáciou melatonínu výhradne zo seróznej strany (sMELATONIN , 10^{-5} M) a výhradne z mukóznej strany (mMELATONIN , 10^{-5} M). Výsledky týchto pokusov naznačujú, že účinok melatonínu na elektrogénny iónový transport sa môže líšiť v závislosti od miesta aplikácie. Melatonín podaný len z mukóznej strany črevného epitelu zvyšoval I_{sc} (50 % prípadov) resp. nespôsobil žiadne zmeny (50 % prípadov), zatiaľ čo melatonín podaný zo seróznej strany znižoval I_{sc} resp.

nespôsoboval žiadne zmeny. Tento poznatok však musí byť interpretovaný so zreteľom na nevysoký počet uskutočnených pokusov (11 u mukóznej strany, 10 u seróznej). Z týchto výsledkov vyplýva, že účinok melatonínu na elektrogénne transportné procesy v distálnom hurbom čreve nie je jednoznačný.

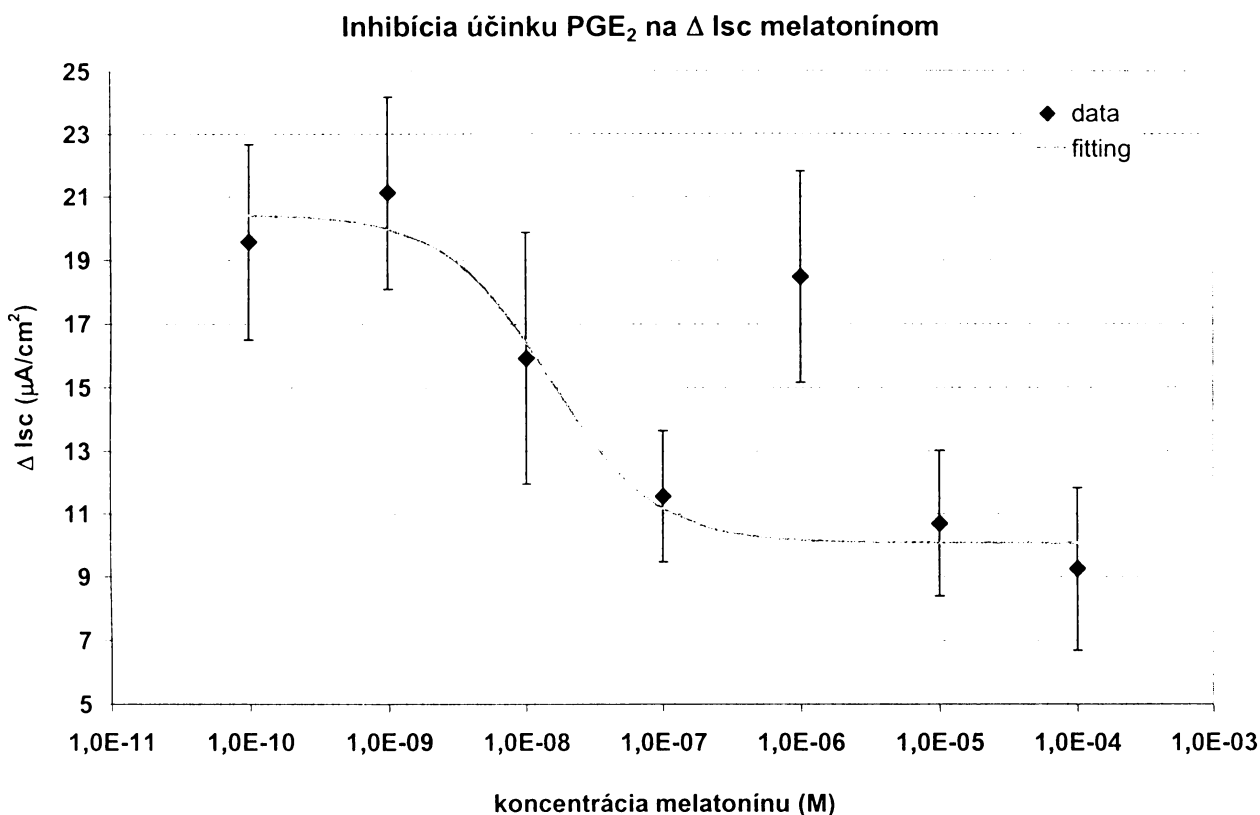
Je tak možné predpokladať, že melatonín môže pôsobiť na elektrogénny transport vo viacerých stupňoch regulácie i v odlišných procesoch a je možné, že reguluje iné dráhy z luminálnej strany, a iné dráhy zo seróznej strany. V takomto prípade by bolo možné aj odlišné pôsobenie melatonínu z rôznych zdrojov (priamo z epitelových buniek, resp. z hlbších vrstiev čрева, či uplatnení nervových dráh). Do úvahy je potreba brať aj možné individuálne rozdiely pokusných zvierat v citlivosti na melatonín, možný rôzny fyziologický status i rôzny subjektívny cirkadiánný čas priebehu pokusu (experimenty boli prevádzané v istom časovom rozmedzí, ale nebolo možné technicky zabezpečiť rovnakú hodinu prevádzania pokusu).

5.2. Inhibičný vplyv melatonínu na PGE₂ stimulovaný vzostup Isc

Modulačný vplyv melatonínu na niektoré neuroendokrinné substancie (GnRH, PACAP) bol pozorovaný v CNS (Vaněček 1998). Je teda možné, že melatonín sa v podobných reguláciách môže uplatňovať aj v čreve. Z rady látok, s ktorých pôsobením na črevnú sekréciu by mohol melatonín interferovať, sme preskúmali vplyv na stimuláciu vzostupu Isc prosekretorickou signálnou molekulou prostaglandínom E₂ (PGE₂). PGE₂ stimuluje sekréciu na črevnom epiteli s uplatnením intracelulárnej signalizačnej dráhy, kde dochádza k vzostupu koncentrácie druhého posla – cAMP. V CNS bol ukázaný inhibičný vplyv melatonínu na vzostup intracelulárnej koncentrácie cAMP, preto sme sa rozhodli preskúmať či sa podobný efekt uplatňuje aj v črevnom epiteli.

Previedli sme preto analýzu vplyvu melatonínu na PGE₂ stimulovaný nárast Isc v závislosti od podanej koncentrácie melatonínu. Výsledky sú zobrazené na grafe 3. Ukázali sme inhibičný účinok melatonínu na PGE₂ stimulovaný vzostup Isc. Zároveň aplikácia rôznych koncentrácií melatonínu pred podaním PGE₂ odhalila, že melatonín inhibuje vplyv PGE₂ koncentračne závisle. Na určenie inhibičnej konštanty IC₅₀ sme nameranú závislosť účinku PGE₂ od rastúcej koncentrácie melatonínu fitovali sigmoidálnou krivkou (viď metódy, kapitola 4.7.1). Zistená hodnota IC₅₀ je 1,5·10⁻⁸ M (pri koeficiente mnohonásobnej korelácie 0,971 a pri strednej chybe odhadu 1,319). Je to

koncentrácia veľmi blízka fyziologickým hodnotám, a tak možno predpokladať reálne fyziologické uplatnenie melatonínu v modulačnom vplyve na prosekretorický mediátor PGE₂.



Graf 3. Inhibičný vplyv melatonínu na sekréciu stimulovanú PGE₂. Melatonín koncentračne závisle inhiboval PGE₂ stimulovanú sekréciu v hrubom čreve. Namerané hodnoty sú fitované ku sigmoidálnej krivke, pri čom bola vylúčená hodnota pri koncentrácii 10⁻⁶ M ako odľahlá. IC₅₀ = 1,5 · 10⁻⁸ M.

Z uvedených výsledkov pokusov je zrejmé, že melatonín môže zohrávať úlohu v regulácii črevného transportu v hrubom čreve priamym vplyvom na elektrogénny transport, ako i moduláciou účinku prosekretorickej substancie PGE₂. Pôsobenie melatonínu je v tomto prípade s veľkou pravdepodobnosťou podmienené membránovými receptormi, keďže zmeny sú okamžité (sekundy až minúty) a odpoveď na prípadnú stimuláciu jadrových receptorov, by bola pri odpovedi ako je expresia špecifickej mRNA a následne proteínu, pozorovateľná s dlhodobším časovým odstupom. Podrobne sme sa preto v ďalších experimentoch venovali štúdiu expresie melatonínových receptorov MT1 a MT2 v čreve.

5.3. Stanovenie hladiny expresie mRNA MT1 receptoru v epitelovej a subepitelovej vrstve jednotlivých segmentov čreva

V jednotlivých segmentoch čreva (duodenum, jejunum, ileum, hrubé črevo) sme stanovili mieru expresie mRNA melatonínového receptoru MT1 (graf 4). Expressiu sme pozorovali vo všetkých segmentoch. V horizontálnej osi čreva bola v duodene nameraná vyššia expresia oproti ostatným segmentom.

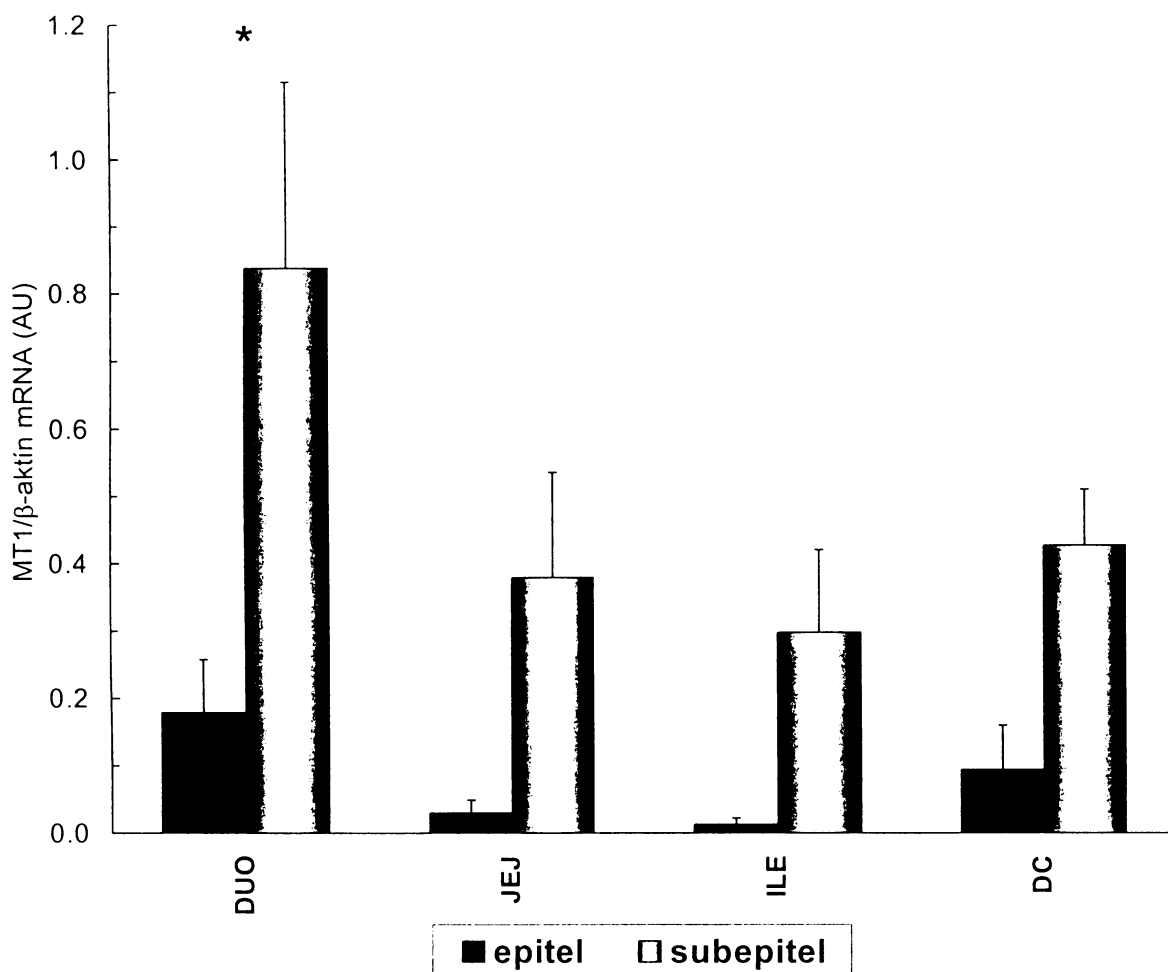
Pri hodnotení distribúcie MT1 receptoru v mukózne-seróznej ose čreva sme zistili, že expresia vo vrstve zbanej epitelových buniek je signifikantne vyššia ako vo vrstve epitelu vo všetkých sledovaných segmentoch.

Vo všetkých sledovaných segmentoch čreva, bola vo vrstve epitelových buniek zaznamenaná expresia mRNA MT1 receptoru, ale u jednotlivých vzoriek bola v mnohých prípadoch pod úrovňou detekcie nami prevádzanej metódy. Expresia v takýchto vzorkách bola považovaná za nulovú. Vyvodzujeme z toho, že melatonínový receptor typu MT1 je v epitelových bunkách exprimovaný, avšak vo veľmi malom množstve. Je tiež možné, že receptor sa hojne exprimuje len v niektorých špecializovaných bunkách črevného epitelu a v niektorých vôbec, no pri odbere mukózne vrstvy ako celku nie je možné rozdiely v jednotlivých bunkách stanoviť.

Málo podrobných štúdií bolo prevedených na zistenie distribúcie melatonínových receptorov v horizontálnej osi čreva. V čreve kačky stanovili Lee et al. (1995) väčšiu hustotu väzbových miest 2-[¹²⁵I]-melatonínu v mukózne vrstve črevných segmentov v porovnaní s hustotou v cirkulárnej i longitudinálnej svalovine. Expresia mRNA MT1 receptoru však nepredstavuje všetky väzbové miesta pre melatonín, rovnako ako nemusí byť rovnaká distribúcia receptorov u odlišných druhov (cicavec vs. vták).

Z pohľadu tu experimentálne ukázaných i v literatúre dokladovaných efektov melatonínu na transepitelový transport (na intaktnom tkanive v duodene modulácia sekrécie HCO₃⁻, Sjoblom et al. 2001, Sjoblom et al. 2003, Sjoblom a Flemstrom 2003), je zaujímavé zistenie, že v hlbších vrstvách čreva je vyššia expresia melatonínových receptorov typu MT1. Efekt sekrécie epitelovými bunkami, môže byť vyvolaný viacerými dráhami. Môžeme uvažovať prípad priameho ovplyvnenia epitelových buniek mediátorom či inou aktívnou substanciou cez receptor prítomný priamo na membráne, rovnako však je možné ovplyvnenie z okolitých či hlbších vrstiev sprostredkované črevným nervovým systémom i parakrinnými mediátormi.

Expresia mRNA MT1 v epiteli vs. subepiteli



[Soták et al. 2006. J Pineal Res.]

Graf 4. Expresia mRNA MT1 v jednotlivých segmentoch v epitlovej a subepitlovej vrstve.

DUO – duodenum, JEJ – jejunum, ILE – ileum, DC – distálne hrubé črevo, HPF – hypofýza.

V subepitlovej vrstve expresia vyššia ako v epitlovej vrstve, $p < 0,05$

* rozdiel DUO oproti ostatným segmentom, $p < 0,05$

Nemôžeme tvrdiť, že hlavným účinkom melatonínu v črevnom tkanive je modulácia transportných procesov, hoci je tento efekt dokladovaný (Sjoblom et al. 2001, Sjoblom et al. 2003, Sjoblom a Flemstrom 2003, Legris et al. 1982, Chan et al. 1998), ale musíme brať do úvahy aj nezanedbateľný vplyv melatonínu na črevnú motilitu a ovplyvnenie činnosti motorických komplexov svaloviny čreva (Merle et al. 2000, Poon et al. 2002, Drago et al. 2002). V tomto prípade, by bola vysvetlená prítomnosť melatonínových receptorov MT1 v hlbších vrstvách čreva, ktoré obsahujú cirkulárnu i longitudinálnu svalovinu, ktoré sa aktívne podieľajú na výslednej motorike čreva.

Ďalším možným vysvetlením relatívne nízkej expresie MT1 receptorov v epitelových bunkách by bola prednostná prítomnosť receptorov typu MT2. Na podporu by hovorili poznatky z funkčných štúdií sledujúcich transportné procesy ovplyvnené melatonínom, kde bolo použitím čiastočne selektívnych antagonistov predikované, že pôsobenie melatonínu je sprostredkované prednostne receptorom typu MT2 (Sjoblom et al. 2001, Sjoblom et al. 2003, Sjoblom a Flemstrom 2003). Použitý inhibítor, luzindol, je však len približne 15 - 20 krát selektívnejší na MT2 receptore ako na receptore MT1 (Dubocovich et al. 1997). Je to veľmi malý rozdiel na to, aby bolo možné presne špecifikovať typ receptoru. Stačila by nadmerná expresia MT1 receptoru na dosiahnutie rovnakého efektu antagonistom. Pre takúto možnosť hovoria aj naše výsledky (viď nižšie) s určením miery expresie mRNA melatonínového receptoru MT2, keď sme detekovali len veľmi nízku expresiu MT2 receptoru.

Pri porovnaní miery expresie mRNA MT1 receptoru v epitelovej i subepitelovej vrstve jednotlivých segmentov čreva oproti expresii v hypofýze (priemerná relatívna miera expresie MT1/ β -aktín 6,65 – pre porovnanie viď graf 4 a graf 6) je badateľne niekoľkonásobne vyššia expresia v hypofýze. A tak, aj keď bol ukázaný výskyt samotného melatonínu v gastrointestinálnom trakte v relatívne veľmi vysokej koncentrácii (Messner et al. 2001), zdá sa, že miera expresie melatonínových receptorov v GIT nepresahuje mieru expresie receptorov v centrálnej nervovej sústave.

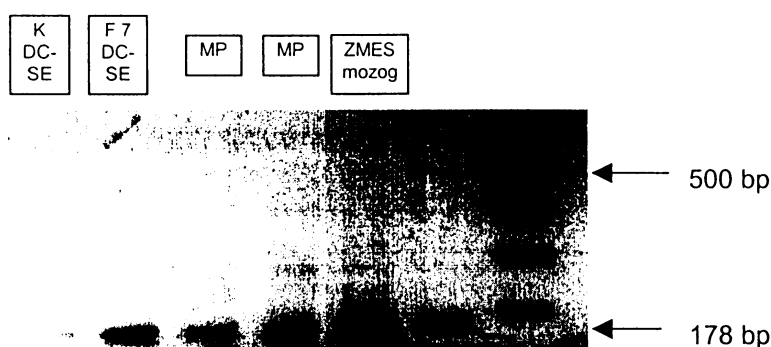
Nameraná nižšia expresia v črevnom tkanive v porovnaní s hypofýzou môže vznikáť aj v dôsledku toho, že boli odoberané homogenáty čreva obsahujúce vrstvy, štruktúry a bunky, v ktorých môže byť nerovnomerná distribúcia melatonínových receptorov, a je tak možný vysoký výskyt receptoru v špecializovaných štruktúrach.

Nutné je však zdôrazniť, že pri porovnávaní kvantity expresie medzi rozdielnymi orgánmi, treba brať do úvahy možnosť skreslenia informácie použitým housekeeping génom pre normalizáciu dát. Použitie β -aktínu bolo overené medzi experimentálnymi skupinami, epitelom a subepitelom u črevných vzoriek, nie však u mozgových vzoriek, a je tak možné, že relatívna expresia MT1 voči β -aktínu mohla dosiahnuť vyšších hodnôt nielen vďaka vyššej expresii samotného génu MT1 receptoru, ale aj nižšou expresiou housekeeping génu. No i pri porovnávaní absolútnych hodnôt Ct (bez normalizácie na housekeeping gén) dosahovali vzorky hypofýzy oproti väčšine črevných vzoriek oveľa nižších hodnôt Ct, hovoriacich pre vysoký obsah MT1 transkriptu vo vzorkách hypofýzy.

5.4. Stanovenie expresie mRNA MT1 receptoru v neurónoch myenterického plexu

Podrobnejšie sme lokalizovať pôvod transkriptu v subepitelových vzorkách do konkrétnejších štruktúr črevných vrstiev. Účasť melatonínu ako mediátora v sprostredkovaní nervovej odpovede bola ukázaná v duodene pri stimulácii sekrécie (Sjoblom et al. 2001). Tak sme overili, či sa melatonínové receptory exprimujú aj v neurónoch myenterického plexu, a tak boli potenciálnym miestom pôsobenia melatonínu, a či sa tu exprimujú vo zvýšenej miere a sú zodpovedné za hladinu určenú v celkových subepitelových vzorkách.

Na vzorke izolovaných neurónov myenterického plexu z potkana vo veku 6 dní, sme previedli analýzu expresie mRNA MT1 receptoru metódu real-time RT-PCR. Kvôli obmedzenému množstvu materiálu nemohla byť prevedená dostatočne podrobná kvantitatívna analýza. V dostupných vzorkách sa kvantita vyjadredná ako MT1/ β -aktín rovnakou metódou ako ostatné črevné vzorky (vid'. kapitola 4.6.6) pohybovala na relatívnej hodnote 0,06 (pre porovnanie s hodnotami črevných vzoriek vid' graf 4), čo vypovedá o nižšej expresii ako v celkovom subepitelovom tkanive. Z obmedzeného počtu vzoriek nemôžeme robiť ďalekosiahle závery o kvantite, môžeme však tvrdiť, že sme preukázali prítomnosť expresie mRNA melatonínového receptoru MT1 v bunkách črevného nervového systému. a potvrdili že črevný nervový systém je potenciálnou cieľovou štruktúrou melatonínu.



Obr. 7. PCR produkt MT1 receptoru analyzovaný na gelovej elektroforéze. K DC-SE – subepitel distálneho hrubého čreva kontrolného zvierat'a, F7 DC-SE – subepitel distálneho hrubého čreva 7 dní hladujúceho zvierat'a. MP – myenterický plexus. ZMES mozog – zmesná vzorka mozgových štruktúr. Špecifický produkt o dĺžke 178 bp a marker o dĺžke 500 bp sú vyznačené šipkou.

Zároveň je potreba mať na zreteli, že dané nervové tkanivo myenterického plexu pochádza zo šest'denného mláďaťa potkana, u ktorého sú centrálny i periférny cirkadiánny rytmy podobne ako produkcia melatonínu a funkčnosť melatonínových receptorov v ontogenetickom vývine (Seron-Ferre et al. 2002). Je tak možné, že expresia MT1 receptoru je u dospelého jedinca odlišná. Rovnako musíme uvažovať o možnosti, že nervové bunky exprimujú nami použitý housekeeping gén v odlišnej miere ako ostatné súčasti čreva.

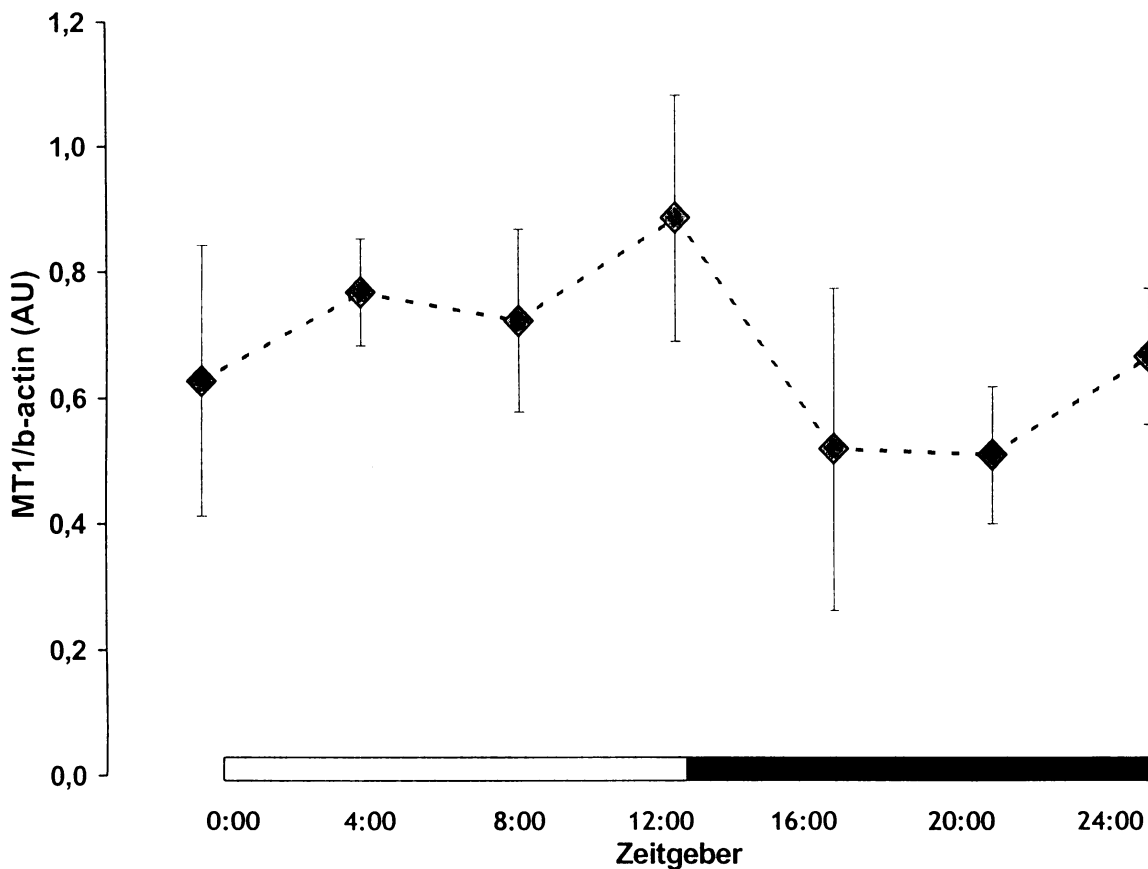
5.5. Stanovenie 24 hodinového profilu expresie mRNA MT1 receptoru v subepiteli distálneho hrubého čreva

V prácach popisujúcich expresiu melatonínových receptorov bolo ukázané, že expresia môže byť regulovaná a ovplyvňovaná cirkadiánnym rytmom. Cirkadiánne zmeny v miere expresie MT1 receptoru boli popísané v CNS i koronárnych artériách (Guerrero et al. 2000, Poirel et al. 2002, Ekmekcioglu et al. 2001). Položili sme si preto otázku, či aj expresia v črevnom tkanive vykazuje rytmicitu, ktorá by bola ovplyvňovaná svetlom, resp. plazmatickým melatonínom. Preskúmali sme mieru expresie počas 24 hodín v štandardných podmienkach svetla a tmy (LD 12:12) v subepitelovom tkanive, keďže tam sme namerali prevažnú mieru expresie MT1. Tento experiment sme previedli na tkanive distálneho hrubého čreva, keďže v ňom sme skúmali a ukázali vplyv melatonínu na elektrogénny transepitelový transport.

Expresia počas 24 hodín, zaznamenávaná každé 4 hodiny, je ukázaná na grafe 5. Podľa kosínorovej analýzy, kde sú namerané hodnoty preložené kosínusovou funkciou, nebol rytmus expresie signifikantný. K ovplyvneniu expresie MT1 receptorov centrálnym cirkadiánnym rytmom tak v distálnom hrubom čreve nedochádza.

Na študovanie rytmu a zmien expresie melatonínových receptorov v črevných segmentoch bolo prevedených len málo štúdií. Naše namerané výsledky sú v súlade so zisteniami Sallinen et al. (2005), kde rovnako metódou real-time RT-PCR merali mieru expresie mRNA MT1 v tenkom čreve. Meranie uskutočnili len v dvoch bodoch denno-nočného cyklu, uprostred svetelnej fázy a uprostred tmavej fázy. Nameraná expresia MT1 receptoru medzi jednotlivými časovými bodmi nevykazovala signifikantný rozdiel. Zároveň však ukázali rozdielnú mieru expresie mRNA MT1 medzi prostriedkom svetelnej fázy a prostriedkom tmavej fázy v hypotalame.

Expresia MT1 receptoru v subepiteli distálneho hrubého čreva



[Soták et al. 2006. *J Pineal Res.*]

Graf 5. Expresia mRNA MT1 receptoru v subepiteli distálneho hrubého čreva v rámci 24 hodín. Expresia je vyjadrená ako pomer expresie MT1/ β -aktín. Svetelná fáza ZT 0 – 12, tmavá fáza ZT 12 – 24. Hodnoty predstavujú priemer \pm SEM (každý bod je reprezentovaný 6-7 hodnotami).

Naše výsledky absencie rytmu v expresii MT1 receptoru sú v súlade so zisteniami Lee et al. (1995), kde podobne nenamerali signifikantné zmeny v rôznych časových bodoch dňa v hustote väzbových miest 2-[¹²⁵I]-melatonínu v rôznych častiach tráviacej trubice (oesophagus, duodenum, jejunum, ileum, caecum, hrubé črevo) u kačice. Naproti tomu v niektorých orgánoch zmeny v hustote väzby 2-[¹²⁵I]-melatonínu popísané boli.

Z periférnych orgánov bola variácia ukázaná v obličke (Song et al. 1992), ale dominantne bola zaznamenaná v CNS (Gauer et al. 1993, Tenn a Niles 1993, Poirel et al. 2002), čo je v súlade so zistenou silnou denno-nočnou variáciou v expresii mRNA MT1 melatonínového receptora v CNS. V SCN potkana bola pozorovaná cirkadiánná variácia v miere expresie s maximom uprostred svetelnej fázy (Neu a Niles 1997, Poirel et al. 2002).

Na periférii sa podarilo cirkadiánnu rytmicitu v expresii mRNA MT1 receptoru ukázať v koronárnych artériách u človeka (Ekmekcioglu et al. 2001), kde minimum expresie bolo dosahované v okolí 02:00 hod a maximum pretrvávajúce od 13:00 do 0:00.

Narozdiel od expresie v CNS, kde fotoperiódou reguluje expresiu melatonínových receptorov i hustotu funkčných väzbových miest (Poirel et al. 2002) sa zdá, že na periférii nie je expresia ovplyvňovaná fotoperiódou a môže vykazovať inú rytmicitu a plazmatický melatonín nemusí hrať rozhodujúcu úlohu v regulácii expresie. Zaujímavé by bolo porovnať prítomnosť hladiny samotného melatonínu v jednotlivých črevných segmentoch a porovnať s mierou expresie. Niekoľko prací s nesúrodými výsledkami bolo vypracovaných na vtáčích modeloch, keď Herichová a Zeman (1999) zaznamenali vyššiu hladinu melatonínu v duodene a jejune kurčat'a v strede tmavej fázy oproti hladine v strede svetlej fázy fotoperiódou. Naproti tomu, u kačice v jednotlivých črevných segmentoch žiadne variácie nezaznamenali Lee et al. (1995).

Možno tak súdiť, že melatonín môže byť v gastrointestinálnom trakte do istej miery nezávislý na plazmatickom melatoníne (Bubenik a Brown 1997), rovnako ako aj expresia jeho receptorov. Zmeny v koncentrácii melatonínu i expresii jeho receptorov však môžu byť ovplyvňované inými fyziologickými zmenami priamo súvisiacimi s gastrointestinálnym traktom, napríklad rytmom v príjme potravy, krátkodobým i dlhodobým hladovaním a pood. (Bubenik et al. 1996).

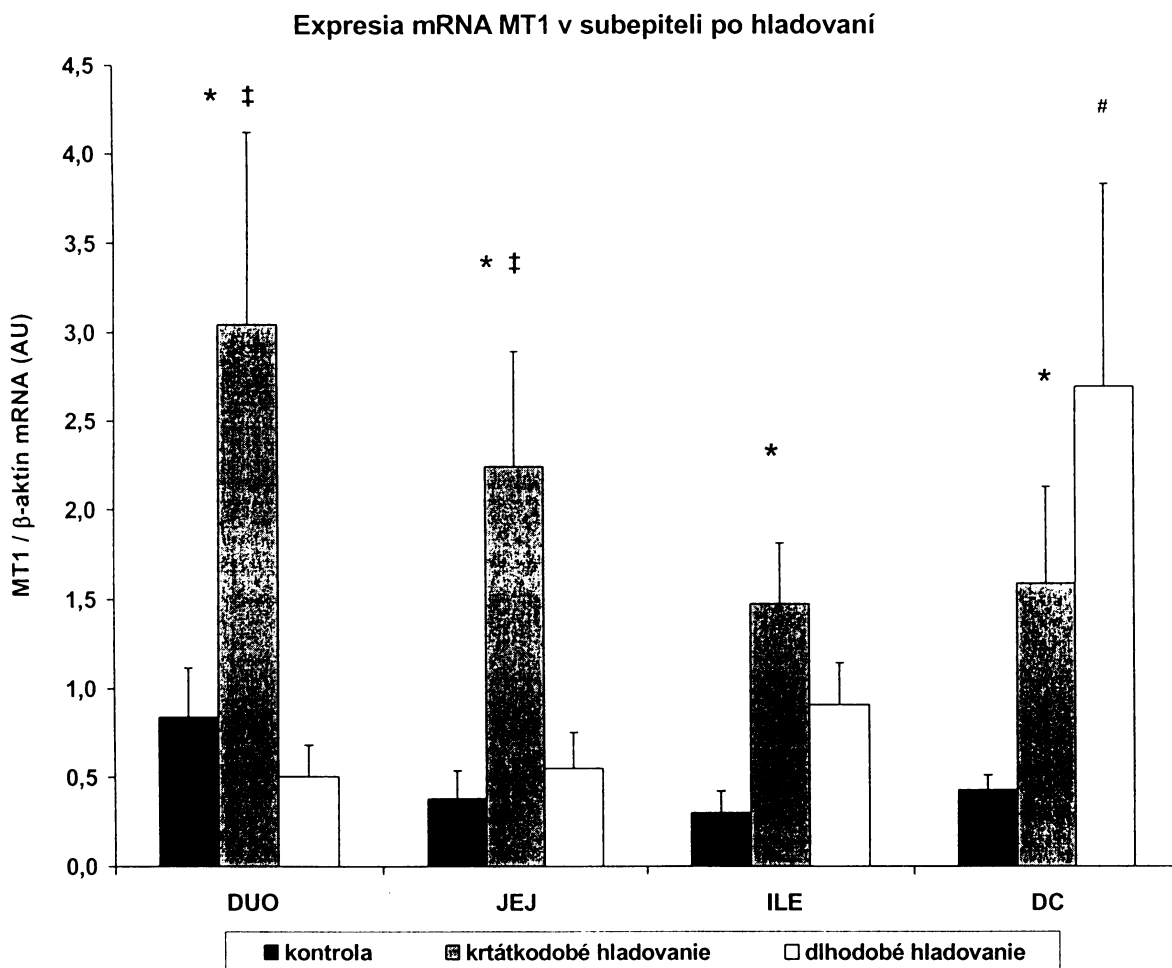
5.6.Sledovanie zmien expresie mRNA MT1 receptoru pri zmene fyziologických podmienok

Príjem potravy a hladovanie sú procesy a podmienky, ktoré v organizme do veľkej miery ovplyvňujú procesy absorpcie a sekrécie látok i iónov, rovnako ako peristaltiku a činnosť motorických komplexov, imunitné procesy i rad ďalších procesov na rôznej úrovni. Vo všetkých spomínaných procesoch môže melatonín zohrávať svoju úlohu.

Preskúmali sme preto vplyv hladovania na expresiu mRNA MT1 receptoru v subepitelovom tkanive jednotlivých segmentov čreva, ako i týmusu, orgánu funkčne spätého s imunitným systémom a hypofýzy, známym miestom expresie MT1 receptoru.

5.6.1. Stanovenie zmien expsie mRNA MT1 receptoru v subepitelovom tkanive črevných segmentov za podmienok hladovania

Vzhľadom k zisteniam, že expresia MT1 receptorov v epitelovej vrstve bola veľmi nízka, efekt hladovania sme skúmali na subepitelovej vrstve. Expresia MT1 receptorov bola preskúmaná v duodene, jejune, ileu a hrubom čreve, ako i v týmuse a hypofýze. Pokusné zvieratá boli vystavené krátkodobému (2 dni) a dlhodobému (7 dní) hladovaniu. Hodnoty expsie v subepiteli jednotlivých črevných segmentov sú zobrazené na grafe 6.



Graf 6. Expresia mRNA MT1 receptoru v subepitelovom tkanive jednotlivých črevných segmentov po krátkodobom a dlhodobom hladovaní. Hodnoty predstavujú priemer \pm SEM (každý stĺpec je reprezentovaný 5-7 hodnotami). DUO – subepitel duodena, JEJ – subepitel jejuna, ILE – subepitel ilea, DC – subepitel distálneho hrubého čreva.

* rozdiel 2 dni hladujúcich oproti kontrole, $p < 0,05$.

‡ rozdiel 2 dni hladujúcich oprot 7 dní hladujúcim, $p < 0,05$.

rozdiel 7 dní hladujúcich oproti kontrole, $p < 0,05$.

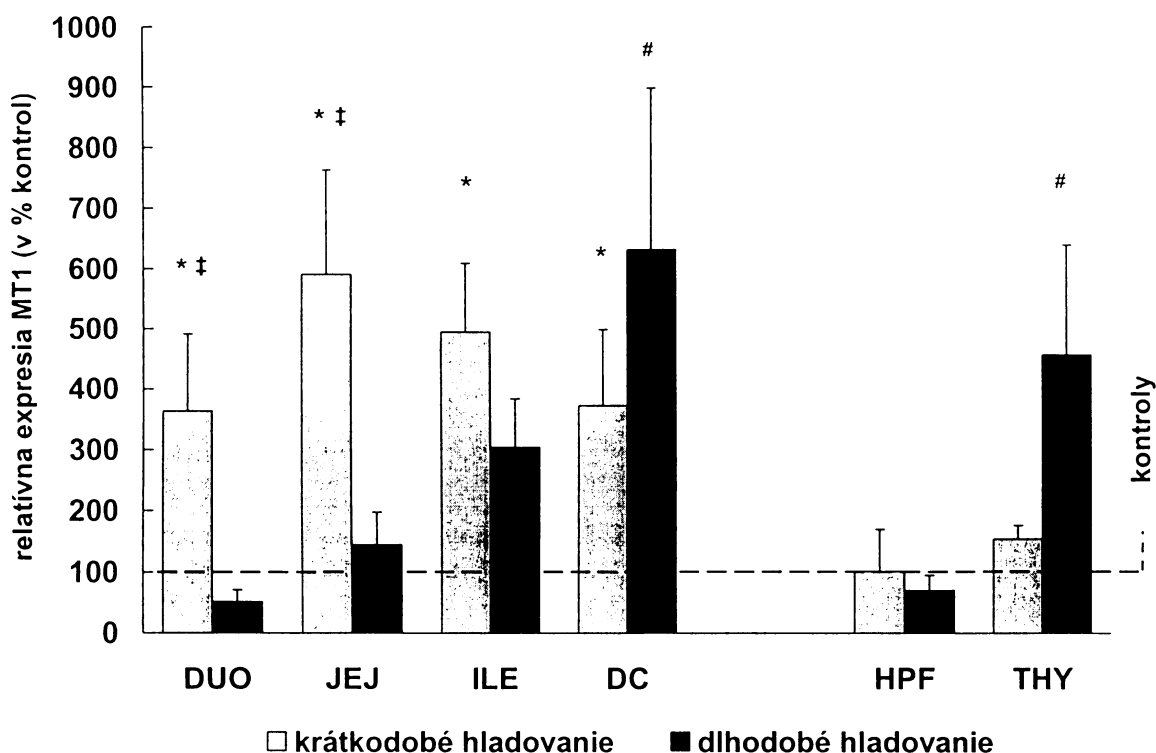
Po dvojdennom hladovaní expresia mRNA melatonínových receptorov MT1 prudko stúpa v subepitelovom tkanive vo všetkých sledovaných črevných segmentoch (duodenum, jejunum, ileum a hrubé črevo), pričom najvyššia expresia je zaznamenaná v duodene a mierne klesá smerom k distálnym segmentom. Rovnako zaujímavý je stav miery expresie po dlhodobom hladovaní. V proximálnych segmentoch (duodenum a jejunum) došlo k úplnému vymiznutiu zvýšenej expresie pozorovanej po dvojdennom hladovaní. V ileu došlo po siedmich dňoch hladu len k miernemu, nesignifikantnému poklesu oproti 2 dni hladujúcim, a v distálnom segmente hrubého čreva došlo po siedmich dňoch k ďalšiemu zvýšeniu expresie, a hladina expresie po siedmich dňoch bola signifikantne odlišná od kontrolných hodnôt. Zdá sa tak, ako keby zvýšená expresia postupovala s predlžujúcim sa hladovaním od proximálnych segmentov k distálnym.

Relatívna miera zvýšenia expresie pre každý segment voči kontrolám je percentuálne vyjadrené na grafe 7, kde 100% je kontrolná hladina pre každý segment osobitne. Zároveň je vyjadrená aj relatívna zmena v expresii po hladovaní v týmuse a hypofýze. Pri tomto hodnotení je vidieť, že krátkodobé hladovanie spôsobilo približne rovnakú relatívnu mieru nárastu vo všetkých študovaných črevných segmentoch a predĺženie hladovania spôsobilo prudký rast v distálnych segmentoch, čo podporuje popis zvýšenia expresie receptoru MT1 vo forme vlny zvýšenia expresie, ktorá začne v proximálnych segmentoch a postupne sa presúva a umocňuje na intenzite v segmentoch distálnych.

Pri hladovaní nedochádzalo k žiadnym zmenám expresie MT1 receptoru v hypofýze, ktorá vykazovala stabilnú mieru expresie. Fyziologický stimulus v podobe hladovania, tak pravdepodobne nemá zásadný vplyv na reguláciu melatonínových receptorov v CNS.

Vzostup v expresii mRNA MT1 sme zaznamenali po dlhodobom hladovaní v týmuse, čo môže svedčiť o účasti imunitného systému v priebehu hladovania, najmä po hladovaní, keď sa zdravotný stav zvierat mohol zhoršovať. (Napriek tomu, aj po dlhodobom hladovaní bola úmrtnosť experimentálnych zvierat 0 %, a zvieratá nevykazovali zjavné poruchy v správaní ani fyziologickom stave. Zmena oproti kontrolám bola v redukcii hmotnosti.)

Percentuálne vyjadrenie expsie MT1 hladujúcich voči kontrolám



[Soták et al. 2006. J Physiol Res.]

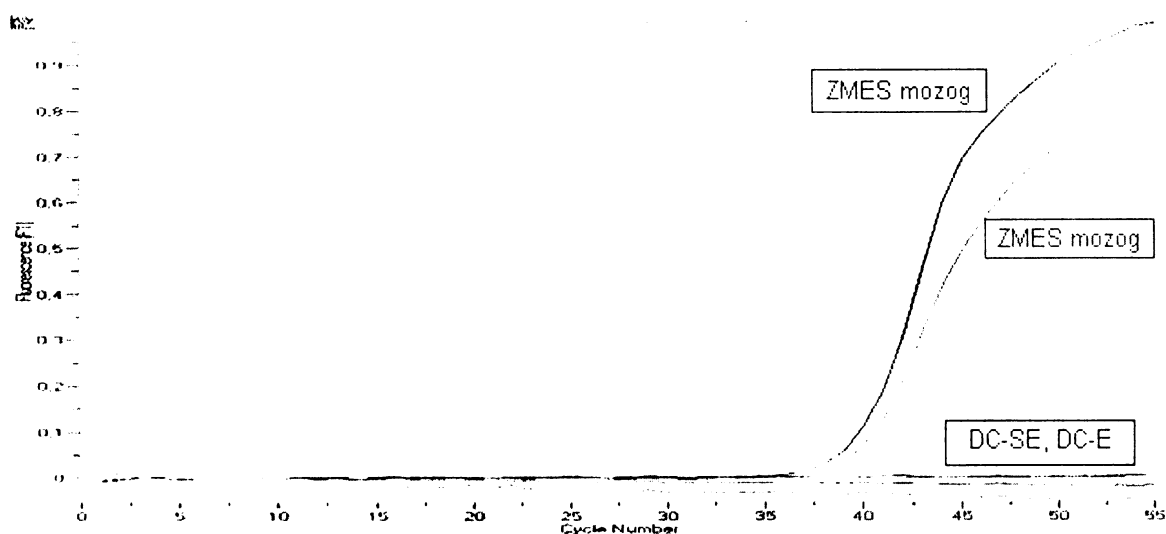
Graf 7. Percentuálne vyjadrenie expsie mRNA MT1 receptoru po krátkodobom (2 dni) a dlhodobom (7 dní) hladovaní v subepiteli jednotlivých segmentov. Zmena expsie v každom segmente je vyjadrená percentuálne voči kontrolám (100%). DUO – duodenum, JEJ – jejunum, ILE – ileum, DC – distálne hrubé črevo, HPF – hypofýza, THY - týmus.

- * rozdiel 2 dni hladujúcich oproti kontrole, $p < 0,05$.
- ‡ rozdiel 2 dni hladujúcich oprot 7 dní hladujúcim, $p < 0,05$.
- # rozdiel 7 dní hladujúcich oproti kontrole, $p < 0,05$.

Expresiu MT1 melatonínových receptorov sme ukázali aj na lymfocytoch CD4 a CD8 (predbežné, neprezentované výsledky), a tak potvrdili pravdepodobnú účasť melatonínu v imunitných procesoch, ktorá už bola ukázaná na rôznych úrovniach, prítomnosťou melatonínu a melatonínových receptorov v rôznych populáciách imunitných buniek i v orgánoch súvisiacich s imunitným systémom (Pozo et al. 1997, Carrillo-Vico et al. 2003, Srinivasan et al. 2005). A tak zvýšená expresia v týmuse môže svedčať o nepriamej úlohe imunitného systému v podmienkach hladovania, ale môže mať i priamy súvis so zvýšením citlivosti na melatonín. Zároveň je možné, že k z zvýšenej miere expsie MT1 receptoru prispievajú imunitné bunky zvýšenou infiltráciou do črevného tkaniva za podmienok hladovania.

5.7. Stanovenie expresie mRNA MT2 receptoru v črevných segmentoch

Expresiu MT2 receptoru sme sa rovnako snažili detekovať metódou real-time RT-PCR. MT2 transkript sa však v črevných tkanivách nachádza v obmedzenom množstve. Pri optimalizácii sme vyskúšali mnoho párov primerov, a len málo z nich bolo schopných detekcie mRNA MT2 v črevnom tkanive. Metódou real-time RT-PCR sme detekovali mRNA len v mozgových štruktúrach, ale nie črevných (obr. 8).



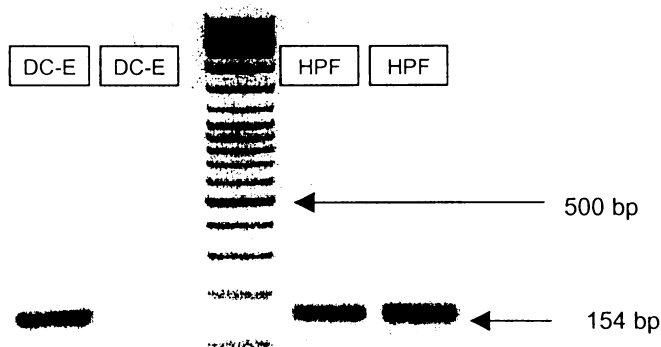
Obr. 8. Záznam fluorescenčného signálu zobrazujúcu amplifikáciu MT2 mRNA v mozgových a črevných vzorkách. ZMES mozog – zmesná vzorka z rôznych mozgových štruktúr. DC-SE – subepitel distálneho hrubého čreva. DC-E – epitel distálneho hrubého čreva.

Metódou real-time RT-PCR sme nedetekovali expresiu mRNA MT2 receptoru v čreve, čo je v rozpore so zistením Sallinen et al. (2005), ktorí v tenkom čreve detekovali expresiu mRNA MT2. Vysvetliť by to bolo možné používaním rôznych prístupov real-time RT-PCR. Zatiaľ čo my sme na detekciu používali SYBR Green, Sallinen et al. (2005) vo svojej práci používali Taq-man próby. Je tak možné, že citlivosť prôb je väčšia a dokáže zachytiť aj transkript, ktorý je v templátovej vzorke v malom množstve. Rozdiel môže byť spôsobený aj použitím rozdielného kmeňa potkanov. Zatiaľ čo Sallinen et al. používali kmeň Sprague-Dawley, my sme používali kmeň Wistar.

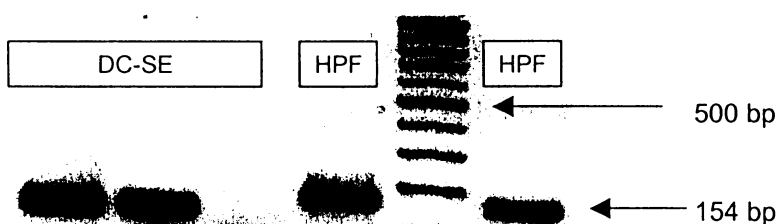


Obr. 9. Elektroforetická analýza produktu MT2 receptora po real-time RT-PCR. Zmes mozog – zmesná vzorka mozgových štruktúr, DC-E – epitel distálneho hrubého čreva, DC-SE – subepitel distálneho hrubého čreva, + DNase I – vzorky treatované DNasou I. Špecifický produkt je o dĺžke 254 bp. Dĺžka vyznačeného markera je 500 bp.

Použili sme preto na kvalitatívnu detekciu metódu „nested-PCR“, dvoch po sebe idúcich PCR, kde templát pre druhú PCR je produkt z prvej PCR. Takto sa nám podarilo stanoviť expresiu mRNA MT2 receptora v distálnom hrubom čreve v epitelových (obr. 10) a subepitelových vzorkách (obr. 11).



Obr. 10. Elektroforetická detekcia špecifického produktu transkriptu MT2 receptora metódou „nested“-PCR. Elektroforetická analýza po 2. PCR reakcii. DC-E – epitel distálneho hrubého čreva, DC-SE – subepitel distálneho hrubého čreva, HPF – hypofýza. Špecifický produkt je dlhý 154 bp, označený marker je dlhý 500 bp.



Obr. 11. Detekcia produktu PCR MT2 receptora v distálnom hrubom čreve. Prítomnosť špecifického signálu závisí aj od použitého master-mixu pre PCR. Rôzny master-mix bol použitý pre každú zobrazenú vzorku DC-SE. DC-E – epitel distálneho hrubého čreva, DC-SE – subepitel distálneho hrubého čreva, HPF – hypofýza. Špecifický produkt je o dĺžke 154 bp, označený marker je dlhý 500 bp.

Z prezentovaných elektroforetických gelov je patrné, že sme detekovali prítomnosť transkriptu mRNA MT2 receptora v epitelových i subepitelových vzorkách čreva. Danou metódou však nebolo možné výsledky 100% reprodukovať. Detekcia závisela aj od použitých chemikálií a enzýmov od rôznych výrobcov (neprezentované výsledky). Vypovedá to, rovnako ako nutnosť použitia „nested“-PCR na zachytenie signálu, o veľmi nízkej expresii mRNA MT2 receptora v črevných vzorkách a o uplatňovaní sa stochastických javov pri opakovaní jednotlivých reakcií so striedajúcim sa pozitívnym a negatívnym výsledkom. Je možné, že transkriptu je tak málo, že sa nerozdeľuje do skúmaviek zo zásobnej cDNA rovanke, a primery sa naň chytajú so stochastickou pravdepodobnosťou.

Zhrnutím možno povedať, že sa nám na kvalitatívnej úrovni podarilo detekovať mRNA MT2 melatonínového receptora v epiteli a subepiteli distálneho hrubého čreva. Expresia tohto receptora je však prítomná v minimálnej miere.

6. Záver

V tejto práci sme sa venovali vplyvu melatonínu na transportné procesy v hrubom čreve a distribúcii melatonínových receptorov v tráviacej trubici.

1. Ukázali sme vplyv melatonínu na elektrogénny transport v hrubom čreve. V distálnom hrubom čreve melatonín koncentračne závisle inhiboval prostaglandínom E₂ stimulovanú črevnú sekréciu. Melatonín tak môže zohrávať úlohu v regulácii transportu v hrubom čreve.
2. Určili sme distribúciu melatonínových receptorov izoformy MT1 v tráviacej trubici v rostro-kaudálnej i mukózne-seróznej osi stanovením expresie mRNA v epiteli a subepiteli duodena, jejuna, ilea a hrubého čreva. MT1 receptor je exprimovaný v prevažnej miere v subepitelovej vrstve čreva, ktorá zahrňuje vrstvy svaloviny, myenterický plexus a serózu. V epitelovej vrstve je expresia MT1 receptorov nízka. V jednotlivých črevných segmentoch je expresia podobná s náznakom vyššej expresie v duodene. Expresiu MT1 sme preukázali aj v nervových bunkách myenterického plexu, čo potvrdzuje možnú úlohu melatonínu ako sprostredkovateľa odpovedí nervových stimulov.
3. Ukázali sme, že svetelné podnety a rytmické kolísanie koncentrácie plazmatického melatonínu nemajú výrazný vplyv na expresiu MT1 receptoru v subepiteli distálneho hrubého čreva a v podmienkach fotoperiódy s 12 hodinami svetla a 12 hodinami tmy nevykazuje expresia MT1 receptoru cyklické zmeny.
4. Silné zmeny expresie sme však zistili po navodení zmeny fyziologických podmienok, keď zvieratá boli vystavené krátkodobému a dlhodobému hladovaniu. Po krátkodobom hladovaní expresia prudko stúpila v subepitelovej vrstve vo všetkých sledovaných segmentoch. Po dlhodobom hladovaní zvýšenie vymizlo v proximálnych segmentoch (duodenum a jejunum) a prehĺbilo sa v distálnych (distálne hrubé črevo). Expresia v hypofýze sa u rovnakých pokusných zvierat za podmienok hladovania nemenila, v týmuse sme zaznamenali nárast po dlhodobom hladovaní.

5. Oproti MT1 receptoru sme zistili obmedzenú mieru expresie receptoru MT2. Jeho expresiu sme detekovali v epitelovej a subepitelovej vrstve hrubého čreva.

Môžeme tak zhrnúť, že melatonín sa môže uplatňovať ako modulátor fyziologických funkcií v čreve.

7. Zoznam použitej literatúry

- Acuna-Castroviejo D, Reiter RJ, Menendez-Pelaez A, Pablos MI, Burgos A.**
Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver.
J Pineal Res. 1994 Mar;16(2):100-12.
- Adam CL, Archer ZA, Miller DW.**
Leptin actions on the reproductive neuroendocrine axis in sheep.
Reprod Suppl. 2003;61:283-97. Review.
- Auwerda JJ, Bac DJ, Schouten WR.**
Circadian rhythm of rectal motor complexes.
Dis Colon Rectum. 2001 Sep;44(9):1328-32.
- Ayre EA, Wang ZP, Brown GM, Pang SF.**
Localization and characterization of [¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in duck gonads.
J Pineal Res. 1994 Aug;17(1):39-47.
- Baler R, Coon S, Klein DC.**
Orphan nuclear receptor RZRbeta: cyclic AMP regulates expression in the pineal gland.
Biochem Biophys Res Commun. 1996 Mar 27;220(3):975-8.
- Bandyopadhyay D, Biswas K, Bandyopadhyay U, Reiter RJ, Banerjee RK.**
Melatonin protects against stress-induced gastric lesions by scavenging the hydroxyl radical.
J Pineal Res. 2000 Oct;29(3):143-51. Erratum in: J Pineal Res 2000 Nov;29(4):248.
- Bandyopadhyay D, Bandyopadhyay A, Das PK, Reiter RJ.**
Melatonin protects against gastric ulceration and increases the efficacy of ranitidine and omeprazole in reducing gastric damage.
J Pineal Res. 2002 Aug;33(1):1-7
- Barrenetxe J, Delagrangre P, Martinez JA.**
Physiological and metabolic functions of melatonin.
J Physiol Biochem. 2004 Mar;60(1):61-72. Review.
- Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C.**
Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily.
J Biol Chem. 1994 Nov 18;269(46):28531-4. Erratum in: J Biol Chem 1997 Jun 27;272(26):16707.
- Besharse JC, Iuvone PM.**
Circadian clock in Xenopus eye controlling retinal serotonin N-acetyltransferase.
Nature. 1983 Sep 8-14;305(5930):133-5.
- Bittman EL, Weaver DR.**
The distribution of melatonin binding sites in neuroendocrine tissues of the ewe.
Biol Reprod. 1990 Dec;43(6):986-93.
- Boer GJ, van Esseveldt LE, Rietveld WJ.**
Cellular requirements of suprachiasmatic nucleus transplants for restoration of circadian rhythm.
Chronobiol Int. 1998 Sep;15(5):551-66. Review.
- Borjigin J, Wang MM, Snyder SH.**
Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland.
Nature. 1995 Dec 21-28;378(6559):783-5.

Brydon L, Roka F, Petit L, de Coppet P, Tissot M, Barrett P, Morgan PJ, Nanoff C, Strosberg AD, Jockers R.

Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins.

Mol Endocrinol. 1999 Dec;13(12):2025-38.

Brydon L, Petit L, Delagrance P, Strosberg AD, Jockers R.

Functional expression of MT2 (Mel1b) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes.

Endocrinology. 2001 Oct;142(10):4264-71.

Bubenik GA, Brown GM, Grota LJ.

Immunohistological localization of melatonin in the rat digestive system.

Experientia. 1977 May 15;33(5):662-3.

Bubenik GA, Pang SF.

The role of serotonin and melatonin in gastrointestinal physiology: ontogeny, regulation of food intake, and mutual serotonin-melatonin feedback.

J Pineal Res. 1994 Mar;16(2):91-9.

Bubenik GA, Pang SF, Hacker RR, Smith PS.

Melatonin concentrations in serum and tissues of porcine gastrointestinal tract and their relationship to the intake and passage of food.

J Pineal Res. 1996 Nov;21(4):251-6.

Bubenik GA, Brown GM.

Pinealectomy reduces melatonin levels in the serum but not in the gastrointestinal tract of rats.

Biol Signals. 1997 Jan-Feb;6(1):40-4.

Bubis M, Zisapel N.

Facilitation and inhibition of G-protein regulated protein secretion by melatonin.

Neurochem Int. 1995 Aug;27(2):177-83.

Buff PR, Morrison CD, Ganjam VK, Keisler DH.

Effects of short-term feed deprivation and melatonin implants on circadian patterns of leptin in the horse.

J Anim Sci. 2005 May;83(5):1023-32.

Calvo JR, Ráfii-el-Idrissi M, Pozo D, Guerrero JM.

Immunomodulatory role of melatonin: specific binding sites in human and rodent lymphoid cells.

J Pineal Res. 1995 Apr;18(3):119-26. Review.

Carlson LL, Weaver DR, Reppert SM.

Melatonin signal transduction in hamster brain: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein.

Endocrinology. 1989 Nov;125(5):2670-6.

Carlson LL, Weaver DR, Reppert SM.

Melatonin receptors and signal transduction during development in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*).

Brain Res Dev Brain Res. 1991 Mar 18;59(1):83-8.

Carrillo-Vico A, Garcia-Perganeda A, Naji L, Calvo JR, Romero MP, Guerrero JM.

Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system.

Cell Mol Life Sci. 2003 Oct;60(10):2272-8.

Castello A, Guma A, Sevilla L, Furriols M, Testar X, Palacin M, Zorzano A.

Regulation of GLUT5 gene expression in rat intestinal mucosa: regional distribution, circadian rhythm, perinatal development and effect of diabetes.

Biochem J. 1995 Jul 1;309 (Pt 1):271-7.

Cogburn LA, Wilson-Placentra S, Letcher LR.

Influence of pinealectomy on plasma and extrapineal melatonin rhythms in young chickens (*Gallus domesticus*).

Gen Comp Endocrinol. 1987 Dec;68(3):343-56.

Coon SL, Zarazaga LA, Malpaux B, Ravault JP, Bodin L, Voisin P, Weller JL, Klein DC, Chemineau P.

Genetic variability in plasma melatonin in sheep is due to pineal weight, not to variations in enzyme activities.

Am J Physiol. 1999 Nov;277(5 Pt 1):E792-7.

Coto-Montes AM, Rodriguez-Colunga MJ, Tolivia D, Menendez-Pelaez A.

Immunocytochemical localization of melatonin in the harderian gland of Syrian hamster.

Anat Rec. 1996 May;245(1):13-6.

Coto-Montes A, Tomas-Zapico C, Escames G, Leon J, Rodriguez-Colunga MJ, Tolivia D, Acuna-Castroviejo D.

Specific binding of melatonin to purified cell nuclei from mammary gland of swiss mice: day-night variations and effect of continuous light.

J Pineal Res. 2003 May;34(4):297-301.

Cozzi B, Stankov B, Viglietti-Panzica C, Capsoni S, Aste N, Lucini V, Fraschini F, Panzica GC.

Distribution and characterization of melatonin receptors in the brain of the Japanese quail, *Coturnix japonica*.

Neurosci Lett. 1993 Feb 19;150(2):149-52.

Drago F, Macaudo S, Salehi S.

Small doses of melatonin increase intestinal motility in rats.

Dig Dis Sci. 2002 Sep;47(9):1969-74.

Dubocovich ML, Takahashi JS.

Use of 2-[125I]iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Jun;84(11):3916-20.

Dubocovich ML.

Melatonin receptors: are there multiple subtypes?

Trends Pharmacol Sci. 1995 Feb;16(2):50-6. Review.

Dubocovich ML, Masana MI, Iacob S, Sauri DM.

Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1997 Mar;355(3):365-75.

Ebisawa T, Karne S, Lerner MR, Reppert SM.

Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jun 21;91(13):6133-7.

Edgar DM, Martin CE, Dement WC.

Activity feedback to the mammalian circadian pacemaker: influence on observed measures of rhythm period length.

J Biol Rhythms. 1991 Fall;6(3):185-99.

Ehret M, Pevet P, Maitre M.

Tryptophan hydroxylase synthesis is induced by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate during circadian rhythm in the rat pineal gland.

J Neurochem. 1991 Nov;57(5):1516-21.

Ekmekcioglu C, Haslmayer P, Philipp C, Mehrabi MR, Glogar HD, Grimm M, Thalhammer T, Marktl W.

24h variation in the expression of the mt1 melatonin receptor subtype in coronary arteries derived from patients with coronary heart disease.

Chronobiol Int. 2001 Nov;18(6):973-85.

Elmhurst JL, Betti PA, Rangachari PK.

Intestinal effects of isoprostanol: evidence for the involvement of prostanoid EP and TP receptors.

J Pharmacol Exp Ther. 1997 Sep;282(3):1198-205.

Garbarino-Pico E, Carpentieri AR, Contin MA, Sarmiento MI, Brocco MA, Panzetta P, Rosenstein RE, Caputto BL, Guido ME.

Retinal ganglion cells are autonomous circadian oscillators synthesizing N-acetylserotonin during the day.

J Biol Chem. 2004 Dec 3;279(49):51172-81.

Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Ráfii-El-Idrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R, Guerrero JM.

Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes.

J Immunol. 1997 Jul 15;159(2):574-81.

Garcia-Perganeda A, Guerrero JM, Ráfii-El-Idrissi M, Paz Romero M, Pozo D, Calvo JR.

Characterization of membrane melatonin receptor in mouse peritoneal macrophages: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein.

J Neuroimmunol. 1999 Mar 1;95(1-2):85-94.

Gauer F, Masson-Pevet M, Skene DJ, Vivien-Roels B, Pevet P.

Daily rhythms of melatonin binding sites in the rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei; evidence for a regulation of melatonin receptors by melatonin itself.

Neuroendocrinology. 1993 Jan;57(1):120-6.

Gern WA, Ralph CL.

Melatonin synthesis by the retina.

Science. 1979 Apr 13;204(4389):183-4.

Greger R, Windhorst U.

Epithelial transport and Gastrointestinal Physiology

Comprehensive Human Physiology, Vol. 2, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1996.

Guerrero HY, Gauer F, Schuster C, Pevet P, Masson-Pevet M.

Melatonin regulates the mRNA expression of the mt(1) melatonin receptor in the rat Pars tuberalis.

Neuroendocrinology. 2000 Mar;71(3):163-9.

Guerrero JM, Pozo D, Garcia-Maurino S, Osuna C, Molinero P, Calvo JR.

Involvement of nuclear receptors in the enhanced IL-2 production by melatonin in Jurkat cells.

Ann N Y Acad Sci. 2000b ;917:397-403.

Hannibal J.

Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract.

Cell Tissue Res. 2002 Jul;309(1):73-88. Epub 2002 May 29. Review.

Hannibal J, Fahrenkrug J.

Melanopsin: a novel photopigment involved in the photoentrainment of the brain's biological clock?

Ann Med. 2002;34(5):401-7. Review.

Hattori A, Migitaka H, Iigo M, Itoh M, Yamamoto K, Ohtani-Kaneko R, Hara M, Suzuki T, Reiter RJ.

Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates.

Biochem Mol Biol Int. 1995 Mar;35(3):627-34.

Herichová I, Zeman M.

Rytmičké, zmeny melatonínu v cirkulácii v niektorých orgánoch brojlerových kurčiat.

Vet Med Czech. 1999;44(9):263-267.

Herichová I, Zeman M.

Effect of pinealectomy on melatonin levels in the gastrointestinal tract of birds

Melatonin after Four Decades, edited by James Olcese, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 2000.

Honma K, Hashimoto S, Endo T, Honma S.

Light and plasma melatonin rhythm in humans.

Biol Signals. 1997 Jul-Dec;6(4-6):307-12. Review.

Huether G, Poeggeler B, Reimer A, George A.

Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract.

Life Sci. 1992;51(12):945-53.

Hunt AE, Al-Ghoul WM, Gillette MU, Dubocovich ML.

Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock.

Am J Physiol Cell Physiol. 2001 Jan;280(1):C110-8.

Chan AS, Lai FP, Lo RK, Voyno-Yasenetskaya TA, Stanbridge EJ, Wong YH.

Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins.

Cell Signal. 2002 Mar;14(3):249-57.

Chan HC, Lui KM, Wong WS, Poon AM.

Effect of melatonin on chloride secretion by human colonic T84 cells.

Life Sci. 1998;62(23):2151-8.

Illnerová H, Vaněček J.

Entrainment of the circadian rhythm in the rat pineal N-acetyltransferase activity by prolonged periods of light.

J Comp Physiol [A]. 1987 Aug;161(3):495-510.

Itoh MT, Hattori A, Sumi Y, Suzuki T.

Day-night changes in melatonin levels in different organs of the cricket (*Gryllus bimaculatus*).

J Pineal Res. 1995 Apr;18(3):165-9.

Itoh MT, Ishizuka B, Kudo Y, Fusama S, Amemiya A, Sumi Y.

Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activities in rat ovary.

Mol Cell Endocrinol. 1997 Dec 31;136(1):7-13.

Iuvone PM.

Development of melatonin synthesis in chicken retina: regulation of serotonin N-acetyltransferase activity by light, circadian oscillators, and cyclic AMP.

J Neurochem. 1990 May;54(5):1562-8.

Iuvone PM, Gan J.

Melatonin receptor-mediated inhibition of cyclic AMP accumulation in chick retinal cell cultures.

J Neurochem. 1994 Jul;63(1):118-24.

Jáč M, Sumová A, Illnerová H.

c-Fos rhythm in subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus under artificial and natural photoperiods.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2000 Dec;279(6):R2270-6.

James K, Skene DJ, Lucini V, Stankov B, Arendt J.

Characterisation of melatonin binding sites in the eye of the Japanese quail (*Coturnix japonica*).

Gen Comp Endocrinol. 1995 Nov;100(2):188-96.

Jin X, Shearman LP, Weaver DR, Zylka MJ, de Vries GJ, Reppert SM.

A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock.

Cell. 1999 Jan 8;96(1):57-68.

Jin X, von Gall C, Pieschl RL, Gribkoff VK, Stehle JH, Reppert SM, Weaver DR.

Targeted disruption of the mouse Mel(1b) melatonin receptor.

Mol Cell Biol. 2003 Feb;23(3):1054-60.

Jockers R, Petit L, Lacroix I, de Coppet P, Barrett P, Morgan PJ, Guardiola B, Delagrangé P, Marullo S, Strosberg AD.

Novel isoforms of Mel1c melatonin receptors modulating intracellular cyclic guanosine 3',5'-monophosphate levels.

Mol Endocrinol. 1997 Jul;11(8):1070-81.

Karasek M, Pawlikowski M.

Antiproliferative effects of melatonin and CGP 52608.

Biol Signals Recept. 1999 Jan-Apr;8(1-2):75-8.

Karasek M, Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Winczyk K, Pawlikowski M.

Expression of melatonin MT(1) and MT(2) receptors, and ROR alpha(1) receptor in transplantable murine Colon 38 cancer.

Neuro Endocrinol Lett. 2002 Apr;23 Suppl 1:55-60.

Keller J, Groger G, Cherian L, Gunther B, Layer P.

Circadian coupling between pancreatic secretion and intestinal motility in humans.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001 Feb;280(2):G273-8.

Keller J, Layer P.

Circadian pancreatic enzyme pattern and relationship between secretory and motor activity in fasting humans.

J Appl Physiol. 2002 Aug;93(2):592-600.

Kemp DM, Ubeda M, Habener JF.

Identification and functional characterization of melatonin Mel 1a receptors in pancreatic beta cells: potential role in incretin-mediated cell function by sensitization of cAMP signaling.

Mol Cell Endocrinol. 2002 Jun 14;191(2):157-66.

Kennaway DJ, Hugel HM, Rowe SA.

Characterization of the chicken brain melatonin-binding protein using iodinated and tritiated ligands.

J Pineal Res. 1994 Oct;17(3):137-48.

Kiefer TL, Lai L, Yuan L, Dong C, Burow ME, Hill SM.

Differential regulation of estrogen receptor alpha, glucocorticoid receptor and retinoic acid receptor alpha transcriptional activity by melatonin is mediated via different G proteins.

J Pineal Res. 2005 May;38(4):231-9.

Klein DC, Weller JL.

Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase.

Science. 1970 Sep 11;169(950):1093-5.

Klemfuss H, Clopton PL.

Seeking tau: A comparison of six methods.

J Interdisciplin Cycle Res 1993; 24:1-16.

Lai FP, Mody SM, Yung LY, Kam JY, Pang CS, Pang SF, Wong YH.

Molecular determinants for the differential coupling of Galpha(16) to the melatonin MT1, MT2 and Xenopus Melle receptors.

J Neurochem. 2002 Mar;80(5):736-45.

Lee PP, Shiu SY, Chow PH, Pang SF.

Regional and diurnal studies of melatonin and melatonin binding sites in the duck gastrointestinal tract.

Biol Signals. 1995 Jul-Aug;4(4):212-24.

Legris GJ, Will PC, Hopfer U.

Inhibition of amiloride-sensitive sodium conductance by indoleamines.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 Mar;79(6):2046-50.

Leja-Szpak A, Jaworek J, Nawrot-Porabka K, Palonek M, Mitis-Musiol M, Dembinski A, Konturek SJ, Pawlik WW.

Modulation of pancreatic enzyme secretion by melatonin and its precursor: L-tryptophan. Role of CCK and afferent nerves.

J Physiol Pharmacol. 2004 Jul;55 Suppl 2:33-46.

Lisoni P, Barni S, Mandala M, Ardizzoia A, Paolorossi F, Vaghi M, Longarini R, Malugani F, Tancini G.

Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status.

Eur J Cancer. 1999 Nov;35(12):1688-92.

MacKenzie RS, Melan MA, Passey DK, Witt-Enderby PA.

Dual coupling of MT(1) and MT(2) melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure.

Biochem Pharmacol. 2002 Feb 15;63(4):587-95.

Mazzucchelli C, Pannacci M, Nonno R, Lucini V, Frascini F, Stankov BM.

The melatonin receptor in the human brain: cloning experiments and distribution studies.

Brain Res Mol Brain Res. 1996 Jul;39(1-2):117-26.

McArthur AJ, Hunt AE, Gillette MU.

Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn.

Endocrinology. 1997 Feb;138(2):627-34.

McLeod SD, Cairncross KD.

A distinct diurnal rhythm in hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) activity in the male albino rat.

Gen Comp Endocrinol. 1993 Feb;89(2):214-9.

Merle A, Delagrance P, Renard P, Lesieur D, Cuber JC, Roche M, Pellissier S.

Effect of melatonin on motility pattern of small intestine in rats and its inhibition by melatonin receptor antagonist S 22153.

J Pineal Res. 2000 Sep;29(2):116-24.

Messner M, Huether G, Lorf T, Ramadori G, Schworer H.

Presence of melatonin in the human hepatobiliary-gastrointestinal tract.

Life Sci. 2001 Jun 22;69(5):543-51.

Middleton B, Arendt J, Stone BM.

Human circadian rhythms in constant dim light (8 lux) with knowledge of clock time.

J Sleep Res. 1996 Jun;5(2):69-76.

Middleton B, Arendt J, Stone BM.

Complex effects of melatonin on human circadian rhythms in constant dim light.
J Biol Rhythms. 1997 Oct;12(5):467-77.

Morgan PJ, Lawson W, Davidson G, Howell HE.

Guanine nucleotides regulate the affinity of melatonin receptors on the ovine pars tuberalis.

Neuroendocrinology. 1989 Sep;50(3):359-62.

Mrosovsky N, Salmon PA.

A behavioural method for accelerating re-entrainment of rhythms to new light-dark cycles.

Nature. 1987 Nov 26-Dec 2;330(6146):372-3.

Musshoff U, Riewenherm D, Berger E, Fauteck JD, Speckmann EJ.

Melatonin receptors in rat hippocampus: molecular and functional investigations.

Hippocampus. 2002;12(2):165-73.

Naji L, Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Calvo JR.

Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs.

Life Sci. 2004 Mar 19;74(18):2227-36.

Neu JM, Niles LP.

A marked diurnal rhythm of melatonin ML1A receptor mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus.

Brain Res Mol Brain Res. 1997 Oct 3;49(1-2):303-6.

Niles LP, Ye M, Pickering DS, Ying SW.

Pertussis toxin blocks melatonin-induced inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in the chick brain.

Biochem Biophys Res Commun. 1991 Jul 31;178(2):786-92.

Nonno R, Capsoni S, Lucini V, Moller M, Fraschini F, Stankov B.

Distribution and characterization of the melatonin receptors in the hypothalamus and pituitary gland of three domestic ungulates.

J Pineal Res. 1995 May;18(4):207-16.

Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrangre P, Canet E, Boutin JA.

Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2.

J Biol Chem. 2000 Oct 6;275(40):31311-7.

Pan X, Terada T, Irie M, Saito H, Inui K.

Diurnal rhythm of H⁺-peptide cotransporter in rat small intestine.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2002 Jul;283(1):G57-64.

Peschke E, Peschke D, Hammer T, Csernus V.

Influence of melatonin and serotonin on glucose-stimulated insulin release from perfused rat pancreatic islets in vitro.

J Pineal Res. 1997 Oct;23(3):156-63.

Peschke E, Frese T, Chankiewicz E, Peschke D, Preiss U, Schneyer U, Spessert R, Muhlbauer E.

Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status.

J Pineal Res. 2006 Mar;40(2):135-43.

Petit L, Lacroix I, de Coppet P, Strosberg AD, Jockers R.

Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway.

Biochem Pharmacol. 1999 Aug 15;58(4):633-9.

Pevet P.

Melatonin: from seasonal to circadian signal.
J Neuroendocrinol. 2003 Apr;15(4):422-6. Review.

Pfaffl MW.

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
Nucleic Acids Res. 2001 May 1;29(9):e45.

Pickering DS, Niles LP.

Pharmacological characterization of melatonin binding sites in Syrian hamster hypothalamus.

Eur J Pharmacol. 1990 Jan 3;175(1):71-7.

Poirel VJ, Masson-Pevet M, Pevet P, Gauer F.

MT1 melatonin receptor mRNA expression exhibits a circadian variation in the rat suprachiasmatic nuclei.

Brain Res. 2002 Aug 9;946(1):64-71.

Poirel VJ, Cailotto C, Streicher D, Pevet P, Masson-Pevet M, Gauer F.

MT1 melatonin receptor mRNA tissular localization by PCR amplification.

Neuro Endocrinol Lett. 2003 Feb-Apr;24(1-2):33-8.

Pontoire C, Bernard M, Silvain C, Collin JP, Voisin P.

Characterization of melatonin binding sites in chicken and human intestines.

Eur J Pharmacol. 1993 Oct 15;247(2):111-8.

Poon AM, Liu ZM, Tang F, Pang SF.

Cortisol decreases 2[125I]iodomelatonin binding sites in the duck thymus.

Eur J Endocrinol. 1994 Mar;130(3):320-4.

Poon AM, Choy EH, Pang SF.

Modulation of blood glucose by melatonin: a direct action on melatonin receptors in mouse hepatocytes.

Biol Signals Recept. 2001 Nov-Dec;10(6):367-79.

Poon AMS, Kravtsov GM, Pang SF.

Receptor-mediated modulation of avian caecal muscle contraction by melatonin: role of tyrosine protein kinase.

J Pineal Res. 2002;32:199-208.

Pozo D, Delgado M, Fernandez-Santos JM, Calvo JR, Gomariz RP, Martin-Lacave I, Ortiz GG, Guerrero JM.

Expression of the Mel1a-melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen.

FASEB J. 1997 May;11(6):466-73.

Pozo D, Garcia-Maurino S, Guerrero JM, Calvo JR.

mRNA expression of nuclear receptor RZR/RORalpha, melatonin membrane receptor MT, and hydroxindole-O-methyltransferase in different populations of human immune cells.

J Pineal Res. 2004 Aug;37(1):48-54.

Privat K, Ravault JP, Chesneau D, Fevre-Montange M.

Day/night variation of tryptophan hydroxylase and serotonin N-acetyltransferase mRNA levels in the ovine pineal gland and retina.

J Pineal Res. 1999 May;26(4):193-203.

Rafii-El-Idrissi M, Calvo JR, Harmouch A, Garcia-Maurino S, Guerrero JM.

Specific binding of melatonin by purified cell nuclei from spleen and thymus of the rat.

J Neuroimmunol. 1998 Jun 15;86(2):190-7.

Raikhlil NT, Kvetnoy IM, Tolkachev VN.

Melatonin may be synthesised in enterochromaffin cells.

Nature. 1975 May 22;255(5506):344-5.

Redman J, Armstrong S, Ng KT.

Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin.
Science. 1983 Mar 4;219(4588):1089-91.

Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T.

Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses.
Neuron. 1994 Nov;13(5):1177-85.

Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slangenaupt SA, Gusella JF.

Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Sep 12;92(19):8734-8.

Reppert SM, Weaver DR, Cassone VM, Godson C, Kolakowski LF Jr.

Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain.
Neuron. 1995b Nov;15(5):1003-15.

Reppert SM, Weaver DR.

Forward genetic approach strikes gold: cloning of a mammalian clock gene.
Cell. 1997 May 16;89(4):487-90. Review.

Reppert SM, Weaver DR.

Molecular analysis of mammalian circadian rhythms.
Annu Rev Physiol. 2001;63:647-76. Review.

Ribelayga C, Pevet P, Simonneaux V.

Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland.
Brain Res. 1997 Nov 28;777(1-2):247-50.

Ribelayga C, Garidou ML, Malan A, Gauer F, Calgari C, Pevet P, Simonneaux V.

Photoperiodic control of the rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and its effect on melatonin synthesis.
J Biol Rhythms. 1999 Apr;14(2):105-15.

Roca AL, Godson C, Weaver DR, Reppert SM.

Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel1a melatonin receptor.
Endocrinology. 1996 Aug;137(8):3469-77. Erratum in: Endocrinology 1997 Jun;138(6):2307.

Roth JA, Rosenblatt T, Lis A, Bucelli R.

Melatonin-induced suppression of PC12 cell growth is mediated by its Gi coupled transmembrane receptors.
Brain Res. 2001 Nov 16;919(1):139-46.

Sainz RM, Mayo JC, Rodriguez C, Tan DX, Lopez-Burillo S, Reiter RJ.

Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells.
Cell Mol Life Sci. 2003 Jul;60(7):1407-26. Review.

Sallinen P, Saarela S, Ilves M, Vakkuri O, Leppaluoto J.

The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues.
Life Sci. 2005 Jan 21;76(10):1123-34.

Seron-Ferre M, Torres C, Parraguez VH, Vergara M, Valladares L, Forcelledo ML, Constandil L, Valenzuela GJ.

Perinatal neuroendocrine regulation. Development of the circadian time-keeping system.
Mol Cell Endocrinol. 2002 Jan 25;186(2):169-73. Review.

Shibuya H, Toru M, Watanabe S.

A circadian rhythm of tryptophan hydroxylase in rat pineals.
Brain Res. 1977 Dec 16;138(2):364-8.

Schrader M, Danielsson C, Wiesenberg I, Carlberg C.

Identification of natural monomeric response elements of the nuclear receptor RZR/ROR. They also bind COUP-TF homodimers.

J Biol Chem. 1996 Aug 16;271(33):19732-6.

Schuster C, Gauer F, Guerrero H, Lakhdar-Ghazal N, Pevet P, Masson-Pevet M.

Photic regulation of mt1 melatonin receptors in the Siberian hamster pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei: involvement of the circadian clock and intergeniculate leaflet.

J Neuroendocrinol. 2000 Mar;12(3):207-16.

Simonneaux V, Ribelayga C.

Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters.

Pharmacol Rev. 2003 Jun;55(2):325-95. Review.

Siuciak JA, Krause DN, Dubocovich ML.

Quantitative pharmacological analysis of 2-125I-iodomelatonin binding sites in discrete areas of the chicken brain.

J Neurosci. 1991 Sep;11(9):2855-64.

Sjoblom M, Jedstedt G, Flemstrom G.

Peripheral melatonin mediates neural stimulation of duodenal mucosal bicarbonate secretion.

J Clin Invest. 2001 Aug;108(4):625-33.

Sjoblom M, Flemstrom G.

Melatonin in the duodenal lumen is a potent stimulant of mucosal bicarbonate secretion.

J Pineal Res. 2003 May;34(4):288-93.

Sjoblom M, Safsten B, Flemstrom G.

Melatonin-induced calcium signaling in clusters of human and rat duodenal enterocytes.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003 Jun;284(6):G1034-44.

Slaugenhaupt SA, Roca AL, Liebert CB, Altherr MR, Gusella JF, Reppert SM.

Mapping of the gene for the Mel1a-melatonin receptor to human chromosome 4 (MTNR1A) and mouse chromosome 8 (Mtnr1a).

Genomics. 1995 May 20;27(2):355-7.

Smirnov AN.

Nuclear melatonin receptors.

Biochemistry (Mosc). 2001 Jan;66(1):19-26. Review.

Song Y, Ayre EA, Pang SF.

The identification and characterization of 125I-labelled iodomelatonin-binding sites in the duck kidney.

J Endocrinol. 1992 Nov;135(2):353-9.

Song Y, Tam PC, Poon AM, Brown GM, Pang SF.

2-[125I]iodomelatonin-binding sites in the human kidney and the effect of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate).

J Clin Endocrinol Metab. 1995 May;80(5):1560-5.

Sovová Ž, Mazna P, Teisinger J, Štys D, Obšil T, Ettrich R.

A structural model of human MT2 melatonin receptor and its melatonin recognition site. 3rd Discussions in Structural Molecular Biology. 2004. Abstract.

Srinivasan V, Maestroni G, Cardinali D, Esquifino A, Perumal SP, Miller S.

Melatonin, immune function and aging.

Immun Ageing. 2005 Nov 29;2:17.

Stankov B, Cozzi B, Lucini V, Fumagalli P, Scaglione F, Fraschini F.

Characterization and mapping of melatonin receptors in the brain of three mammalian species: rabbit, horse and sheep. A comparative in vitro binding study. *Neuroendocrinology*. 1991 Mar;53(3):214-21.

Stefulj J, Hortner M, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, Wolfler A, Semmler J, Liebmann PM.

Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat.

J Pineal Res. 2001 May;30(4):243-7.

Steinhilber D, Brungs M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen JP, Nayeri S, Schrader M, Carlberg C.

The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes.

J Biol Chem. 1995 Mar 31;270(13):7037-40.

Sugden D, McArthur AJ, Ajpru S, Duniec K, Piggins HD.

Expression of mt(1) melatonin receptor subtype mRNA in the entrained rat suprachiasmatic nucleus: a quantitative RT-PCR study across the diurnal cycle.

Brain Res Mol Brain Res. 1999 Oct 1;72(2):176-82.

Sugden D.

Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR.

J Neurochem. 2003 Sep;86(5):1308-11.

Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Zhang M, Weintraub ST, Cabrera J, Sainz RM, Mayo JC.

Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance.

Biochim Biophys Acta. 1999 Oct 18;1472(1-2):206-14.

Tenn C, Niles LP.

Physiological regulation of melatonin receptors in rat suprachiasmatic nuclei: diurnal rhythmicity and effects of stress.

Mol Cell Endocrinol. 1993 Dec;98(1):43-8.

Thomas L, Purvis CC, Drew JE, Abramovich DR, Williams LM.

Melatonin receptors in human fetal brain: 2-[(125)I]iodomelatonin binding and MT1 gene expression.

J Pineal Res. 2002 Nov;33(4):218-24.

Ting KN, Blaylock NA, Sugden D, Delagrangé P, Scalbert E, Wilson VG.

Molecular and pharmacological evidence for MT1 melatonin receptor subtype in the tail artery of juvenile Wistar rats.

Br J Pharmacol. 1999 Jun;127(4):987-95.

Trávníčková Z, Sumová A, Peters R, Schwartz WJ, Illnerová H.

Photoperiod-dependent correlation between light-induced SCN c-fos expression and resetting of circadian phase.

Am J Physiol. 1996 Oct;271(4 Pt 2):R825-31.

Underwood H, Harless M.

Entrainment of the circadian activity rhythm of a lizard to melatonin injections.

Physiol Behav. 1985 Aug;35(2):267-70.

Vaněček J, Pavlík A, Illnerová H.

Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography.

Brain Res. 1987 Dec 1;435(1-2):359-62.

Vaněček J, Vollrath L.

Developmental changes and daily rhythm in melatonin-induced inhibition of 3',5'-cyclic AMP accumulation in the rat pituitary.
Endocrinology. 1990 Mar;126(3):1509-13.

Vaněček J.

Melatonin inhibits increase of intracellular calcium and cyclic AMP in neonatal rat pituitary via independent pathways.
Mol Cell Endocrinol. 1995 Feb;107(2):149-53.

Vaněček J.

Cellular mechanisms of melatonin action
Physiol Rev. 1998 Jul;78(3):687-721. Review.

Vera H, Tijmes M, Valladares LE.

Melatonin and testicular function: characterization of binding sites for 2-[125I]-iodomelatonin in immature rat testes.
Steroids. 1997 Feb;62(2):226-9.

Vernadakis AJ, Bemis WE, Bittman EL.

Localization and partial characterization of melatonin receptors in amphioxus, hagfish, lamprey, and skate.
Gen Comp Endocrinol. 1998 Apr;110(1):67-78.

Vician M, Zeman M, Herichova I, Jurani M, Blazicek P, Matis P.

Melatonin content in plasma and large intestine of patients with colorectal carcinoma before and after surgery.
J Pineal Res. 1999 Oct;27(3):164-9.

von Gall C, Stehle JH, Weaver DR.

Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction.
Cell Tissue Res. 2002 Jul;309(1):151-62. Epub 2002 May 18. Review.

Von Gall C, Weaver DR, Moek J, Jilg A, Stehle JH, Korf HW.

Melatonin plays a crucial role in the regulation of rhythmic clock gene expression in the mouse pars tuberalis.
Ann N Y Acad Sci. 2005 Apr;1040:508-11.

Wan Q, Pang SF.

2-[125I]iodomelatonin binding sites in the quail liver: characterization and the effect of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate).
Biol Signals. 1995 Jan-Feb;4(1):24-31.

Wang ZP, Cheng KM, Brown GM, Pang CS, Pang SF.

Characterization of 2-[125I]iodomelatonin-binding sites in quail testes at mid-light and mid-dark.
Neurosci Lett. 1992 Nov 9;146(2):195-8.

Weaver DR, Liu C, Reppert SM.

Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters.
Mol Endocrinol. 1996 Nov;10(11):1478-87.

Weaver DR, Reppert SM.

The Mel1a melatonin receptor gene is expressed in human suprachiasmatic nuclei.
Neuroreport. 1996 Dec 20;8(1):109-12.

Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM.

Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms.
Neuron. 1995 Apr;14(4):697-706.

Wiechmann AF, Hollyfield JG.

Localization of hydroxyindole-O-methyltransferase-like immunoreactivity in photoreceptors and cone bipolar cells in the human retina: a light and electron microscope study.

J Comp Neurol. 1987 Apr 8;258(2):253-66.

Wiechmann AF, Wirsig-Wiechmann CR.

Localization and quantification of high-affinity melatonin binding sites in *Rana pipiens* retina.

J Pineal Res. 1991;10(4):174-9.

Wiechmann AF, Wirsig-Wiechmann CR.

Asymmetric distribution of melatonin receptors in the brain of the lizard *Anolis carolinensis*.

Brain Res. 1992 Oct 16;593(2):281-6.

Wiechmann AF, Craft CM.

Localization of mRNA encoding the indolamine synthesizing enzyme, hydroxyindole-O-methyltransferase, in chicken pineal gland and retina by in situ hybridization.

Neurosci Lett. 1993 Feb 19;150(2):207-11.

Wiechmann AF, Wirsig-Wiechmann CR.

Distribution of melatonin receptors in the brain of the frog *Rana pipiens* as revealed by in vitro autoradiography.

Neuroscience. 1993 Jan;52(2):469-80.

Wiechmann AF, Wirsig-Wiechmann CR.

Melatonin receptor distribution in the brain and retina of a lizard, *Anolis carolinensis*.

Brain Behav Evol. 1994;43(1):26-33.

Wiechmann AF, Campbell LD, Defoe DM.

Melatonin receptor RNA expression in *Xenopus* retina.

Brain Res Mol Brain Res. 1999 Jan 8;63(2):297-303.

Wiesenberg I, Missbach M, Kahlen JP, Schrader M, Carlberg C.

Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand.

Nucleic Acids Res. 1995 Feb 11;23(3):327-33.

Williams JA, Sehgal A.

Molecular components of the circadian system in *Drosophila*.

Annu Rev Physiol. 2001;63:729-55. Review.

Winczyk K, Pawlikowski M, Karasek M.

Melatonin and RZR/ROR receptor ligand CGP 52608 induce apoptosis in the murine colonic cancer.

J Pineal Res. 2001 Sep;31(2):179-82.

Winczyk K, Pawlikowski M, Lawnicka H, Kunert-Radek J, Spadoni G, Tarzia G, Karasek M.

Effects of melatonin and melatonin receptors ligand N-[(4-methoxy-1H-indol-2-yl)methyl]propanamide on murine Colon 38 cancer growth in vitro and in vivo.

Neuro Endocrinol Lett. 2002 Apr;23 Suppl 1:50-4.

Witt-Enderby PA, Dubocovich ML.

Characterization and regulation of the human ML1A melatonin receptor stably expressed in Chinese hamster ovary cells.

Mol Pharmacol. 1996 Jul;50(1):166-74.

Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H.

Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats.

Science. 2000 Apr 28;288(5466):682-5.

Yu ZH, Chow PH, Pang SF.

Identification and characterization of 2[125I]-iodomelatonin binding sites in the rat epididymis.

J Pineal Res. 1994 Nov;17(4):195-201.

Yu ZH, Yuan H, Lu Y, Pang SF.

[125I]iodomelatonin binding sites in spleens of birds and mammals.

Neurosci Lett. 1991 Apr 29;125(2):175-8.

Zhang S, Li W, Gao Q, Wei T.

Effect of melatonin on the generation of nitric oxide in murine macrophages.

Eur J Pharmacol. 2004 Oct 6;501(1-3):25-30.

Zhao H, Poon AM, Pang SF.

Pharmacological characterization, molecular subtyping, and autoradiographic localization of putative melatonin receptors in uterine endometrium of estrous rats.

Life Sci. 2000 Mar;66(17):1581-91.

Zimmerman NH, Menaker M.

Neural connections of sparrow pineal: role in circadian control of activity.

Science. 1975 Oct 31;190(4213):477-9.

7. Zoznam použitých skratiek

- 2-[¹²⁵I]-melatonín – rádioaktívne značený 2-jódomelatonín
- 4-P-PDOT – 4-fenyl-2-propionamidotetralín
- 5-HT – 5-hydroxytryptamín, serotonín
- AAAD – dekarboxyláza aromatických kyselín
- AA-NAT – arylalkylamín-N-acetyltransferáza
- ACTH – adrenokortikotropný hormón
- B_{max} – maximálna hustota väzbových miest
- cAMP – cyklický adenosínmonofosfát
- CCK – cholecystokinín
- cDNA – DNA vzniknutá reverznou transkripciou mRNA
- cGMP – cyklický guanosínmonofosfát
- CGP 52608 – tiazolidínión, syntetický ligand RZR/ROR receptorov
- CNS – centrálny nervový systém
- CREB – CRE element viažúci proteín
- CT – cirkadiánný čas
- Ct – treshold cycle
- DD – konštantná tma (dark-dark cycle)
- DTT – dithiothreitol
- GIT – gastrointestinálny trakt
- GLUT5 – glukózový receptor
- GnRH – gonádotropný hormón
- GTP – guanosíntrifosfát
- HIOMT – hydroxyindol-O-metyltransferáza
- ICER – inducibilný represor cAMP
- IP₃ – inozitoltrisfosfát
- Isc – skratovací prúd
- IUPHAR – International union of pharmacology
- JNK kináza – c-Jun N-terminal kinase
- K_d – disociačná konštanta
- LD – svetelno-tmavá fotoperiód (light-dark cycle)
- Mell_a – izoforma vysokoafinitného melatonínového receptora
- Mell_b – izoforma vysokoafinitného melatonínového receptora

Mel1c – izoforma vysokoafinitného melatonínového receptoru
ML1 – skupina vysokoafinitných melatonínových receptorov
ML2 – skupina nízkoafinitných melatonínových receptorov
MMC – migrujúce motorické komplexy svaloviny čreva
MT1 – izoforma vysokoafinitného melatonínového receptoru
MT2 – izoforma vysokoafinitného melatonínového receptoru
MT3 – izoforma nízkoafinitného melatonínového receptoru
NA-5-HT – N-acetyl-5-hydroxytryptamín
NCBI – National center for biotechnology information
PACAP – hypofyzárny adenylát cyklázu aktivujúci peptid
PCR – polymerizačná reťazová reakci
PEPT1 - H⁺-peptid kotransportér (PEPT1)
Per-P – fosforylovaný proteín Period
PT – pars tuberalis hypofýzy
PTX – pertussis toxín
RHT – retinohypotalamický trakt
ROR – jadrový retinoidný „orphanový“ receptor
RT-PCR – reverzná transkripcia s následnou polymerizačnou reťazovou reakciou
RZR – jadrový retinoidný Z receptor
SCN – suprachiasmatické jadrá
Tim-P – fosforylovaný proteín Timeless
TPOH – tryptofánhydroxyláza