

2004 és 2007 közötti eredményeink összefoglalása:

Az óragének vizsgálata

A madarak tobozmirigyének circadian ritmusos működésében is feltehetőleg kulcsszerepet játszó óragének azonosítása céljából más, elsősorban alacsonyabb rendű speciesekben megtalált és emlősökben is szerkezetileg azonosított óragénekkal homológ helyeket kerestünk madár génkönyvtárban. A csirke óragén homológokra primereket terveztünk és RT-PCR módszerrel megvizsgáltuk, hogy a génszakaszok csirkében expresszáldónak-e a tobozmirigyben. Kimutattuk, hogy a csirke tobozmirigyben a filogenetikailag ismertebb óragének többsége, a Clock, Bmal1, Bmal2, Per1, Per2, Per3, Cry1 és Cry2 expresszáldódik. A reverz transzkripcióban alkalmazott specifikus antisense primerekkel sikerült a Per1 expressziót 6 hetes csirkék tobozmirigyében is kimutatni. A Cry1, Cry2, Bmal2 és a Clock óragének mRNS-eit sikerült kimutatni 15 napos csirke embriók tobozmirigyéből is.

A Cry1 és a Clock esetében szemikvantitatív RT-PCR módszer segítségével mértük az mRNS szintek napi ritmusát. Megvizsgáltuk, hogy a génexpresszió ritmusa környezeti megvilágítással milyen mértékben befolyásolható. Az mRNS expresszió változásait éjszakai megvilágítás alatt, ill. a környezeti fény/sötét ciklus megfordítása utáni első ciklusban vizsgáltuk 6 hetes csirkékben. Az óragének expressziós mintázatát az éjszaka alkalmazott megvilágítás 2 órán belül megváltoztatta.

Megvizsgáltuk csirke tobozmirigyben, hogy a ritmusos óragén- expresszió változás milyen embrionális stádiumban alakul ki. A kikelt állatokban mért mRNS ritmushoz fázisban hasonló mintázatot mértünk 18 napos csirke embriókban is, fény/sötét és állandó sötétben inkubált embriók esetében is. Eredményeink alapján csirke tobozmirigyben a ritmusos óragén- expresszió kialakulásához nem szükséges a környezeti fényviszonyok ritmusos változása. 10 nM PACAP kezelés *in vitro* mindkét vizsgált óragén expresszióját csökkentette az alkalmazást követő 2 órán belül, mely a neurohumorális környezet tobozmirigy-működést szabályozó szerepére utal.

A circadian melatonin (MT) szekréció kialakulásának vizsgálata

A korábbi évek munkáját folytatva vizsgáltuk a csirke embrionális melatonin szekréció fejlődését befolyásoló tényezőket. Mivel ritmikus biológiai folyamatok fejlődéséről eddig meglehetősen kevés irodalmi adat szólt, a téma jelenleg is a tudományos érdeklődés középpontjában áll. Kimutattuk, hogy a melatonin és cAMP koncentrációjának napszakos ritmusa a 16-18. embrionális napokon jelenik meg *in vitro* körülmények között is.

A ritmikus szekréció kialakulása azonban periodikus ingerek (fény, hő, tojásforgatás) nélkül késik. Kísérleteink során megpróbáltuk ezen ingerek közül a felnőtt csirke melatonin ritmusának szinkronizálásában kulcsfontosságú környezeti megvilágítás hatásait, szerepét feltárni. A tobozmirigy MT termelése már a 14. embrionális naptól kezdve érzékenynek bizonyult a külső megvilágításra, de az ebben a korban alkalmazott *in vitro* ritmikus megvilágítás esetén sem jelenik meg a 17. embrionális naponál korábban a MT ritmus. Ezzel az eredménnyel igazoltuk, hogy bár a tobozmirigy fény-receptorai már a 14. embrionális napon is működőképesek, a fényingernek még nincs direkt, *in vitro* a corpus pinealera gyakorolt szinkronizáló hatása. A 17 napos embriók tobozmirigyét fordított fény/sötét ciklusú *in vitro* környezetbe helyeztük, ahol a megvilágítás intenzitásának mértékét 10 lux-ra

csökkentettük. A melatonin szekréció ritmusa, hasonlóan a felnőtt állatokéhoz, 2 cikluson belül megfordult, mely hatást 10 luxos fény/sötét ciklusok megfordításával is tapasztaltunk. Ezzel igazoltuk, hogy a 18. embrionális naptól kezdve a csirke tobozmirigy már a rendkívül alacsony intenzitású megvilágítással is vezérelhető.

Eredményeink szerint a pituitary adenilate cyclase activating polypeptide (PACAP) már a 13. embrionális napon fokozza a cAMP és a melatonin termelést, de a ritmus fejlődését, illetve annak fázisát nem változtatja meg. Más kísérletekben a csirke embriókat *in ovo* a 8. illetve a 15. embrionális napokon pituitary adenilate cyclase activating polypeptide (PACAP) antagonistával (PACAP6-38) kezeltük. A lokomotoros aktivitás fejlődését késleltető kezelés az embrionális melatonin szekréciójában nem okozott változást a kontroll állatokhoz képest. Ezek az eredmények is alátámasztják feltételezésünket, hogy a PACAP nem szükséges a melatonin szekréció és/vagy a circadián ritmus fejlődéséhez. Továbbá kimutattuk, hogy a 13. és a 18. embrionális napok között vasoactive intestinal polypeptide-del (VIP) periódikusan történt *in vitro* ingerlés nem változtatta meg a melatonin szekréció jellegét, a ritmikus környezeti ingerekkel (fény, hő, tojásforgatás) ellentétben nem indukálta a circadián ritmus megjelenését. Ugyanakkor a VIP már a 14. embrionális naptól átmenetileg fokozza a melatonin termelést.

A circadian MT szekréciót szinkronizáló tényezők vizsgálata

Vizsgáltuk a csirke tobozmirigy melatonin szekrécióját a külvilághoz szinkronizáló tényezők hatásait. Kimutattuk, hogy a tobozmirigy *in vitro* MT szekrécióját a környezeti hőmérséklet periódikusan alkalmazott, 12, 8, 6, sőt mindössze három órás megváltoztatása (37 °C-ról 41 °C-ra történő emelése) is módosítja. A hőmérséklet változására eltérő választ találtunk a 14-16 hétnél fiatalabb, illetve az ennél idősebb állatok tobozmirigyei esetén. Továbbá igazoltuk, hogy az állandó megvilágítás deszinkronizáló hatásai a környezeti hőmérséklet ritmikus megváltoztatása mellett elmaradnak. Kimutattuk, hogy a megvilágítás és a hőmérséklet megfelelő megváltoztatásával a melatonin szekréció átmenetileg 24 óránál rövidebb periódusra is kényszeríthető, de ingerlések nélkül az eredeti, circadian ritmus visszatér.

Vizsgáltuk a Föld mágneses terének nagyságrendjébe eső, váltóárammal (50 Hz), illetve lassú frekvenciájú (1 Hz alatti) áramokkal keltett mágneses terek *in vitro* hatását. A váltóárammal létesített mágneses mező alkalmazása esetén a MT ritmus deszinkronizációjára utaló amplitúdó csökkenést figyeltünk meg. Eredményeink, és azok konferenciákon történt megvitatása alapján azonban feltételezhettük, hogy a mágneses mező embrionális és felnőtt csirkék tobozmirigyeinek MT szekréciójára kifejtett hatásainak a rendelkezésünkre álló eszközökkel történő további *in vitro* vizsgálata nem szolgáltatott volna újszerű adatokat.

IHK, ISH és elektronmikroszkópos módszerekre tervezett kísérleteinket forráshiány miatt sajnos nem tudtuk elvégezni.

Tudományos publikációk

Idézhető absztraktok

Csernus V., Faluhelyi N., Nagy A.D.: Features of the circadian clock in the avian pineals. - *Upsala J. Med. Sci.*, **S56**. 28. 2004.

Faluhelyi N., Reglődi D., Csernus V.: Development of the circadian rhythm and its responsiveness to PACAP in the embryonic chicken pineal gland. - *Upsala J. Med. Sci.*, **S56**. 35. 2004.

Nagy A. D., Csernus V.: Expression profiles of mammalian clock gene homologs in the chicken pineal gland. - *Clin Neurosci/Idegy Szle* **57** (S1). 89. 2004.

Faluhelyi N., Csernus V.: The effects of rhythmic environmental factors on the chicken pineal gland in vitro. - *Clinical Neuroscience*, **58**. 28. 2005.

Faluhelyi, N., Reglodi D., Csernus V.: The effects of PACAP and VIP on the *in vitro* melatonin secretion from the embryonic chicken pineal gland. *Regulatory Peptides* **130**. 161. 2005.

Nagy A. D., Csernus V.: Detection of the mammalian clock gene homolog of Per1 in the chicken pineal gland. - *Clin Neurosci/Idegy Szle* **58** (S1). 69. 2005.

Faluhelyi N., Csernus V.: The effects of PACAP and VIP on the *in vitro* melatonin secretion from the embryonic chicken pineal gland. - *Clin Neurosci/Idegy Szle* **59** (S1). 20. 2006.

Nagy A. D., Csernus V.: The effects of acute inversion in the environmental light dark cycle on Cry1 clock gene expression in the chicken pineal gland. - *Clin Neurosci/Idegy Szle* **59** (S1). 48. 2006.

Nagy A. D.; Kommedal S.; Csernus V.: Effects of PACAP exposure on the pineal clock gene expression in birds. - *Clin Neurosci/Idegy Szle* **60** (S1). 47. 2007.

Könyv fejezet

Csernus V., Mess B.: *Rhythmic biological processes. The role of the biological clocks*, Dialog-Campus Kiadó, Budapest,, 2004

Csernus V., Mess, B.: *The avian pineal gland - a model of the biological clock*, Akadémiai Kiadó, Budapest,, 2004

Csernus V., Nagy A.D., Faluhelyi N.: The control of MT release from mammalian and avian pineal glands. - In: *Melatonin: from Molecules to Therapy*. S.R. Pandi-Perumal, D.P. Cardinali (eds.). Nova Science Publishers Inc., New York (2006).

Csernus V., Mess B. (szerkesztők): *Biológiai órák. Ritmikus biológiai folyamatok az élővilágban*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 2006. p 195., 2006

Csernus Valér: *A tobozmirigy szerepe a napszakos ritmusokban. A madár tobozmirigy, mint a napszakos ritmus kutatásának modellje.*, in: Csernus V., Mess B. (szerkesztők): *Biológiai órák. Ritmikus biológiai folyamatok az élővilágban*. - Akadémiai Kiadó, Budapest, 2006. 81-100, 2006

Tudományos cikkek

Faluhelyi N., Reglődi D., Lengvári I., Csernus V.: Development of the circadian melatonin rhythm and the effect of PACAP on melatonin production in the embryonic chicken pineal gland. An *in vitro* study. - *Regul Pept.*, **123**. 23-28, 2004.

Gaszner B., Csernus V., Kozicz T.: Urocortinergic neurons respond in a differentiated manner to various acute stressors in the Edinger-Westphal nucleus in the rat., *J Comp Neurol.* **480.** 170-179., 2004

Csernus V., Józsa R., Reglődi D., Hollósy T., Somogyvári-Vigh A., Arimura A.: The effect of PACAP on rhythmic melatonin release of avian pineals., *Gen. Comp. Endocrinol.* **135.** 62-69., 2004

Csernus V., Faluhelyi N., Nagy A.D.: Features of the circadian clock in the avian pineals. - *Annals N.Y. Acad. Sci.*, **1040.** 281-287, 2005.

Faluhelyi N., Reglődi D., Csernus V.: Development of the circadian thym and it's responsiveness to PACAP in the embryonic chicken pineal gland. - *Annals N.Y. Acad. Sci.*, **1040.** 305-309, 2005.

Faluhelyi N., Csernus V.: The effects of periodic alteration of the temperature on the rhythmic melatonin release of explanted chicken pineals. - *Neuro Endocrinol Lett.*, **26.** 503-510, 2005.

Csernus V.: The avian pineal gland., *Chronobiology International*, **23.** 329-339, 2006

Faluhelyi, N., Reglődi D., Csernus V.: The effects of PACAP and VIP on the in vitro melatonin secretion from the embryonic chicken pineal gland. - *Annals N Y Acad Sci.*, **1070.** 271-275, 2006.

Csernus V.J., Nagy A.D., and Faluhelyi N.: Development of the rhythmic melatonin secretion in the embryonic chicken pineal gland. - *Gen Comp Endocrinol.* **152.** 148-153. 2007

Faluhelyi N. and Csernus V.: The effects of environmental illumination on the in vitro melatonin secretion from the embryonic and adult chicken pineal gland. - *General and Comparative Endocrinology.* **152.** 154-158. 2007

Nagy A.D., Csernus V.: Cry1 expression in the chicken pineal gland: effects of changes in the light/dark conditions. - *Gen Comp Endocrinol* **152.** 148-153. 2007.

Nagy A. D., Kommedal S., Csernus V.: The role of PACAP in the circadian regulation of clock gene expression in the chicken pineal gland. - *Peptides* **28.** 1767-1774. 2007.

Tudományos előadások

Tudományos előadások nemzetközi kongresszusokon

Faluhelyi N., Csernus V.: A mágneses erőtér és a környezeti hőmérséklet biológiai ritmusokra gyakorolt hatásának vizsgálata. - *1st Symposium of the European Federation of Endocrine Societies*, Gyula, 2002.05.14-17.

Csernus V., Nagy A., Faluhelyi N.: Mechanisms of the circadian clock in the chicken pineal gland. - *21st Conference of European Comparative Endocrinologists*, Bonn, 2002.08.26-30.

Faluhelyi N., Reglődi D., Lengvári I., Csernus V.: Development of the circadian melatonin rhythm and the effect of PACAP on melatonin production in the embryonic chicken pineal gland. An in vitro study. - *IBRO 2004 International Workshop on Neuronal Circuits: From Elementary to Complex Functions*, Budapest, 2004.01.29-31.

Csernus V., Faluhelyi N., Nagy A.D.: Features of the circadian clock in the avian pineals. - *22nd Conference of the European Comparative Endocrinologists*, Uppsala, Sweden, 2004.08.24-28.

Faluhelyi N., Reglődi D., Csernus V.: Development of the circadian rhythm and its responsiveness to PACAP in the embryonic chicken pineal gland. - *22nd Conference of the European Comparative Endocrinologists*, Uppsala, Sweden, 2004.08.24-28.

Nagy A. D., Csernus V.: Expression profiles of mammalian clock gene homologs in the chicken pineal gland. - *IBRO 2004 International Workshop on Neuronal Circuits: From Elementary to Complex Functions*, Budapest, 2004. Jan 29-31

Faluhelyi N., Csernus V.: The effects of subtle changes of illumination on the in vitro melatonin rhythm of chicken pineal gland. - *X. Congress of the European Pineal and Biological Rhythms Society*, Frankfurt, 2005.09.01-05.

Faluhelyi N., Reglődi D., Csernus V.: The effects of PACAP and VIP on the in vitro melatonin secretion from the embryonic chicken pineal gland. - *7th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides*, Rouen, France, 2005.09.11-14.

Faluhelyi N., Csernus V.: The effects of PACAP and VIP on the in vitro melatonin secretion from the embryonic chicken pineal gland. - *IBRO 2006 International Workshop on Neuronal Circuits: Regulatory mechanisms of synaptic transmission*, Budapest, 2006. Jan 26-28.

Nagy A. D., Csernus V.: The effects of acute inversion in the environmental light-dark cycle on Cry1 clock gene expression in the chicken pineal gland. - *IBRO 2006 International Workshop on Neuronal Circuits: Regulatory mechanisms of synaptic transmission*, Budapest, 2006. Jan 29-31.

Faluhelyi N., Csernus V.: The effects of environmental illumination and PACAP on the in vitro melatonin secretion from the embryonic chicken pineal gland. - *23rd Conference of the European Comparative Endocrinologists*, Manchester, UK, 2006. Aug 28 - Sept 2.

Csernus V., Faluhelyi N., Nagy A.D.: Development of the rhythmic melatonin secretion in the embryonic chicken pineal gland. - *23rd Conference of the European Comparative Endocrinologists*, Manchester, UK, 2006. Aug 28 - Sept 2.

Nagy A.D., Csernus V.: Expression of Cry1 in the chicken pineal gland is not only induced, but also downregulated by light in a time-dependent manner. - *23rd Conference of the European Comparative Endocrinologists*, Manchester, UK, 2006. Aug 28 - Sept 2.

Tudományos előadások hazai konferenciákon, kongresszusokon.

Faluhelyi N., Csernus V.: A mágneses tér hatása csirke tobozmirigy in vitro ritmikus melatonin termelésére. - *XI. Magyar Anatómus Kongresszus*, Debrecen, 2001.06.14-16.

Faluhelyi N., Csernus V.: A környezeti hőmérséklet és a circadian melatonin ritmus kapcsolatának vizsgálata. - *A Magyar Anatómus Társaság XII. Kongresszusa*, Budapest, 2003.06.19-21.

Faluhelyi N., Csernus V.: A circadian melatonin ritmus kialakulásának és a pacap hatásának vizsgálata csirke embrió tobozmirigyén in vitro. - *XII. Sejt és Fejlődésbiológiai Napok*, Pécs, 2004.04.16-18.

Faluhelyi N., Csernus V.: A hőmérséklet szerepe csirke tobozmirigy in vitro circadian melatonin ritmusának szinkronizálásában. - *XII. Sejt és Fejlődésbiológiai Napok*, Pécs, 2004.04.16-18.

Faluhelyi N., Csernus V.: A hőmérséklet szerepe csirke tobozmirigy in vitro circadian melatonin ritmusának szinkronizálásában - *A magyar endokrinológiai és anyagcsere társaság XIX. Kongresszusa*, Szolnok, 2004.05.20-22.

Nagy A.D., Csernus V.: Óragén homologok expressziója csirke tobozmirigyben. - *XII. Sejt és Fejlődésbiológiai Napok*, Pécs, 2004. április 16 18.

Nagy A.D., Csernus V.: Óragén homologok expressziója csirke tobozmirigyben. - *A Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság XIX. Kongresszusa*, Szolnok, 2004. május 20-22

Faluhelyi N, Csernus V.: The effects of rhythmic environmental factors on the chicken pineal gland in vitro. - *Magyar Idegtudományi Társaság 11. Kongresszusa*, Pécs, 2005.01.26-29.

Faluhelyi N., Csernus V.: A csirke tobozmirigy fényérzékenysége in vitro vizsgálata. - *XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok*, Eger, 2005.04.10-12.

Faluhelyi N., Csernus V.: A ritmikus melatonin szekréció kialakulásának in vitro vizsgálata embrionális csirke tobozmirigy modellen. - *Magyar Anatómus Társaság XIII. Kongresszusa*, Pécs, 2005.06.17-18.

Nagy A. D., Csernus V.: Detection of the mammalian clock gene homolog of Per1 in the chicken pineal gland. - *A Magyar Idegtudományi Társaság 11. Kongresszusa*, Pécs, 2005 január 26 29.

Nagy A. D., Csernus V.: Az óragének és a napi ritmusok. - *A Magyar Biológiai Társaság Pécsi Csoportja Szakülései*, Pécs, 2005. Február 22.

Faluhelyi N., Csernus V.: Kis intenzitású fényváltozások hatása a csirke tobozmirigy in vitro melatonin szekréciójára. - *A Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság XX. Kongresszusa*, Debrecen, 2006. május 18-20.

Nagy A.D., Csernus V.: A Cry1 óragén-expresszió circadian ritmusának változása éjszakai megvilágítás hatására csirke tobozmirigyben. - *A Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság XX. Kongresszusa*, Debrecen, 2006. május 18-20.

Nagy A.D., Kommedal S., Csernus V.: PACAP hatása az óragén-expresszió circadian ritmusára csirke tobozmirigyben. - *A Magyar Idegtudományi Társaság 12. Kongresszusa*, Szeged, 2007 január 26-29.

Nagy A.D., Kommedal S., Seomangal K., Csernus V.: Az óragén expresszió circadian ritmusának kialakulása csirke tobozmirigyben. - *XIV. Sejt és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred*, 2007. április 15-17.

Faluhelyi N, Csernus V.: Fényváltozások hatása a csirke tobozmirigy in vitro circadian melatonin szekréciójára - *XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok*, Balatonfüred, 2007. április 15-17.

Matkovits A., Faluhelyi N., Csernus V.: A periódikus megvilágítás hatásai csirke embrionális tobozmirigy in vitro melatonin szekréciójára. *Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése*, Pécs, 2007. június 8-11.

Kommedal S., Seomangal K., Nagy A.D., Csernus V.: A Cry1 és Clock génexpresszió circadian ritmusának kialakulása csirke tobozmirigyben. - *Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése*, Pécs, 2007. Június 8-11.

Seomangal K., Kommedal S., Nagy A.D., Csernus V.: A Cry1 és Cry2 génexpresszió változásai fordított fény/sötét viszonyok között csirke tobozmirigyben. - *Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése*, Pécs, 2007. Június 8-11.

Nagy András: Circadian biológiai ritmusok szabályozása: Óragén-expresszió vizsgálata csirke tobozmirigy modellen - *Neurobiológus Doktoranduszok Fóruma*, Pécs, 2007. November 16.