

MARIAN H. LEWANDOWSKI

*Zakład Fizjologii Zwierząt,
Instytut Zoologii,
Uniwersytet Jagielloński,
R. Ingardena 6, 30-060 Kraków*

UDZIAŁ LISTKA CIAŁA KOLANKOWATEGO BOCZNEGO W MECHANIZMIE ZEGARA BIOLOGICZNEGO SSAKÓW

O tym, że rytmiczność jest fundamentalną własnością każdej żywej materii, poczynawszy od organizmów jednokomórkowych poprzez pojedyncze komórki wielokomórkowców a kończąc na tak skomplikowanym organizmie, jakim jest nasze ciało, nie trzeba nikogo przekonywać. Ciągłe bowiem niezliczone struktury i funkcje naszego i każdego organizmu ulegają cyklicznym (sekundowym, minutowym, godzinnym, okołodobowym, tygodniowym, miesięcznym, sezonowym czy rocznym) zmianom. Zmiany te

mają duże znaczenie adaptacyjne dla organizmów, pomagają bowiem optymalnie synchronizować funkcje behawioralne i fizjologiczne do periodycznych zmian środowiska zewnętrznego, a także ułatwiają integracje organizmu z jego własnym środowiskiem wewnętrznym. JÜRGEN ASCHOFF (1964), jeden z twórców chronobiologii światowej, określił rytmy okołodobowe jako odbicie zmian świata zewnętrznego w środowisku wewnętrznym organizmów.

RYS HISTORYCZNY

Przełom XVIII i XIX wieku to początek naukowego zainteresowania badaniami rytmów biologicznych. Pierwsze naukowe obserwacje rytmicznych zmian to badania czy raczej spostrzeżenia botaników u roślin. Przełom w tych obserwacjach został dokonany przez holenderskiego astronoma, BAPTISTE DERTOUS DE MAIRAN, w 1729 roku. Zauważył on rytmiczne zmiany ruchu liści fasoli, mimo iż znajdowała się ona w niecyklicznym (stałym) środowisku. Był to pierwszy dowód istnienia wewnętrznego (endogenego) oscylatora niezależnego od zmieniającego się cyklu światła i ciemności. De Mairan takiego wniosku jednak nie wyciągnął, sugerował raczej wpływ innych niż światło środowiskowych oscylatorów na obserwowany rytm ruchu liści fasoli w stałej ciemności.

Przez następne 200 lat nic szczególnego w badaniach nad rytmem się nie wydarzyło. Mnożyły się jedynie obserwacje potwierdzające słuszność koncepcji de Mairana i to nie tylko w stosunku do roślin.

W 1922 RICHTER jako jeden z pierwszych potwierdził obserwacje de Mairana u zwierząt, zaobserwował rytm aktywności lokomotorycznej u szczurów żyjących w stałej ciemności.

Cztery lata później JOHNSON (1926) konkluduje, że rytm aktywności zwierząt nie jest bezpośrednio zależny od zmian warunków środowiskowych. Sugeruje, że „zwierzęta muszą posiadać wyjątkowo ważny, trwały samo się nakręcający i regulujący zegar fizjologiczny, którego mechanizm pozostaje tajemnicą czekającą na opracowanie”. To właśnie Johnson prawdopodobnie po raz pierwszy wprowadził koncepcję endogennych oscylatorów. Prorocza zapowiedź Johnsona rozwiązania zagadki mechanizmu zegara biologicznego pozostała jednak bez odpowiedzi aż do lat 60. Pojawiały się w międzyczasie różne inne, mniej lub bardziej ważne, doniesienia dotyczące procesów rytmicznych, nie wносиły one jednak nic istotnego w wyjaśnienie mechanizmu działania zegara biologicznego.

W 1932 Rothmann obserwuje 24 godzinny rytm snu i czuwania u psów pozbawionych kory mózgowej (cyt. za RUSAK i ZUCKER 1979). Z drugiej jednak strony Kleitman i Camille (cyt. za RUSAK i ZUCKER 1979) konkluduje na podstawie swoich obserwacji, że dobowy rytm snu i czuwania u psów zależy od obecności i aktywności funkcjonalnej kory mózgowej. Zauważyli oni bowiem, że psy pozbawione kory charakte-

ryzuja się częstszym, typowym dla szczeniąt, zasypianiem. W 1958 MASON opisuje zaburzenia rytmiki kortizolu u małych po uszkodzeniu sklepienia hipokampa. Istotne w tych wszystkich doniesieniach było to, że począwszy od obserwacji Richtera uwaga badających zostaje zwrócona na układ nerwowy jako główne miejsce lokalizacji zegara biologicznego. Pojawiają się kolejne coraz śmielsze twierdzenia.

Pittendrigh mówi już wyraźnie, że skomplikowane chronometry ptaków, pszczoł i skorupiaków są zlokalizowane w ich układzie nerwowym, a mechanizm ich działania wiąże się z wyjątkową komplikacją neuronalnej organizacji ich układu nerwowego (cyt. za RUSAK i ZUCKER 1979). Halberg zwraca uwagę na podwzgórze jako główny oscylator, który na zasadzie sprzężenia zwrotnego może kontrolować pewne 24-godzinne rytmy naszego ciała (HALBERG i współaut. 1959). Te prorocze spekulacje nie miały jednak zbyt silnego doświadczalnego poparcia.

GŁÓWNY ELEMENT MECHANIZMU ZEGARA BIOLOGICZNEGO SSAKÓW

Dopiero od połowy lat 60. przyjmuje się powszechnie, że jądra nadskrzyżowaniowe przedniej części podwzgórza (SCN supra chiasmatic nucleus) stanowią główny element mechanizmu zegara biologicznego, są głównym miejscem lokalizacji wewnętrznego okołodobowego oscylatora.

Na początku lat 70. metodą autoradiografii wykazano bezpośrednie nerwowe połączenie między komórkami siatkówki a jądrami nadskrzyżowanymi. Drogi tę określono jako projekcję siatkówkowo-podwzgórzową (RHT retino hypothalamic tract) (MOORE 1973). To dzięki niej światło, główny zewnętrzny synchronizator rytmów biologicznych (zeitgeber — dawca czasu), dochodzi do SCN. Po tym odkryciu następuje ponowny okres lawinowych doniesień potwierdzających udział SCN w generowaniu rytmów biologicznych. Wiele, jeśli nie wszystkie, okołodobowe rytmy behawioralne ulega zanikowi po całkowitym uszkodzeniu lub chirurgicznej izolacji jąder nadskrzyżowaniowych (RUSAK i ZUCKER 1979). Natomiast ich elektryczne drażnienie zmienia fazę rytmu okołodobowej aktywności lokomotorycznej gryzoni (RUSAK i GROOS 1982). Dodatkowo dzięki autoradio-

graficznej metodzie 2-deoksyglukozy stwierdzono okołodobowy rytm aktywności metabolicznej w SCN (SCHWARTZ i współaut. 1980). Największe nagromadzenie tego radioaktywnie znakowanego cukru stwierdzono w komórkach SCN w fazie jasnej, a najmniejsze podczas ciemności. Także wyniki badań elektrofizjologicznych potwierdzają ten obserwowany rytm. Zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* spontaniczna aktywność elektryczna komórek nerwowych jest o wiele większa w fazie świetlnej niż ciemnej (INOYE i KAWAMURA 1979). W końcu transplantacja SCN z płodu szczurów lub świnek morskich do trzeciej komory mózgowia jest zdolna przywrócić rytmiczność zwierząt, które ją utraciły po uszkodzeniu SCN (AGUILAR-ROBLERO i współaut. 1992). Immunohistochemicznie stwierdzono w SCN co najmniej 30 różnych neuromodulatorów (neuroaktywnych substancji) czy enzymów je syntetyzujących (RIETVELD 1992). SCN zajmują przestrzeń około 0,066 mm³ tuż nad skrzyżowaniem wzrokowym, buduje je około 10000–12000, głównie dwubiegunowych, małych (8–12 μm średnicy) neuronów, tworząc symetryczne kuliste struktury (GULDNER 1983).

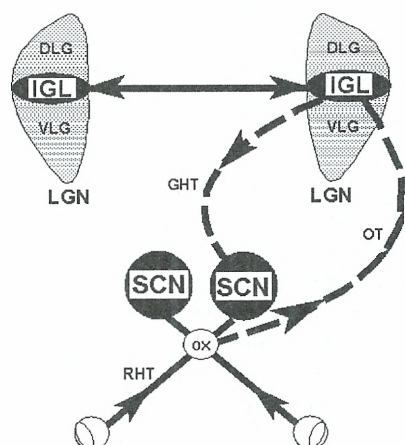
DRUGI ELEMENT MECHANIZMU ZEGARA BIOLOGICZNEGO SSAKÓW

Oprócz jąder nadskrzyżowaniowych istnieje drugi element w mechanizmie zegara biologicznego ssaków, ściśle i bezpośrednio powiązany z SCN, tak jak to powinno być i jest w dobrze funkcjonującym zegarku. Zlokalizowany jest on w ciele kolankowatym bocznym (LGN, lateral geniculate nucleus), niezwykle interesującej i ważnej strukturze drogi wzrokowej, biorąc pod uwagę fizjologię widzenia i plastyczność kory wzrokowej. To właśnie w tej strukturze następuje tak zwany proces sortowania informacji wzrokowych napływających ze skroniowej —

ipsilateralnie i nosowej — kontralateralnie położonych części komórek zwojowych siatkówki. To tu w warstwie komórek wielkich (wielkomórkowej, magnocellular layer) następuje segregacja informacji wzrokowych pod względem ostrości, szybkości i kierunku ruchu czyli dynamiki obserwowanego obrazu, a w warstwie komórek małych (drobnkomórkowej, parvocellular layer) — segregacja pod względem koloru. Po takiej analizie „uporządkowane” informacje biegną do kory wzrokowej, w której następuje proces widzenia.

BUDOWA IGL

Histologicznie LGN jest uważane za kompleks wielojądrzasty, występujący u wszystkich gatunków ssaków. Podzielone jest na dwie części: brzuszną (VLG ventral lateral geniculate nucleus) i grzbietową (DLG dorsal lateral geniculate nucleus), z których każda otrzymuje bardzo silne unerwienie z komórek zwojowych siatkówki. W 1976 roku dwaj uczeni HICKEY i SPEAR stwierdzili, a w 1994 MOORE i CARD potwierdzili istnienie równie silnego unerwienia płynącego z komórek siatkówki obu oczu do poziomo położonego wąskiego obszaru znajdującego się między częścią grzbietową i brzuszną ciała kolankowatego bocznego. Prawdopodobnie projekcję tę tworzą odgałęzienia komórek zwojowych siatkówki biegnące do SCN. Odgałęzienia te przebiegają przez skrzyżowanie wzrokowe (optic chiasm) i drogę wzrokową (optic tract) i dochodzą do obszaru, który został przez nich nazwany jako intergeniculate leaflet (IGL). Nie ma jeszcze przyjętej polskiej nazwy tej struktury, dlatego tłumacząc bezpośrednio określa się ją jako listek ciała kolankowatego bocznego (ryc. 1).



barwienia GFAP, co powoduje trudność w dokładnej identyfikacji listka, szczególnie w przedniej i tylnej jego części. W przeciwieństwie do metody Nissla stosunkowo łatwo można odróżnić listek w barwieniu Golgiego.

Aferentna projekcja z komórek zwojowych siatkówki tworzy gęste obustronne unerwienie IGL. Badania histologiczne sugerują istnienie wydzielonej grupy komórek zwojowych siatkówki mających obustronną projekcję tylko do SCN i IGL. Świadczyłoby to o istnieniu populacji komórek zwojowych siatkówki zaangażowanych tylko w działanie zegara biologicznego. Interesujące i do tej pory nie jest wyjaśnione to, że projekcja do przeciwległe położonego IGL jest dwukrotnie większa niż do IGL leżącego po tej samej stronie. Paradoksalnie jednak na skutek słabego wybarwienia grzbietowej i brzusznej części LGN w stosunku do IGL listek leżący po tej samej stronie jest wyraźniej widoczny niż jego przeciwległy sąsiad. To zresztą ułatwiło odróżnienie IGL przez Hickey i Speara. Listek ciągnie się przez całą długość horyzontalną cia-

Rys. 1. Schemat połączeń jąder nadskrzyżowaniowych przedniej części podwzgórza (SCN) z listkiem ciała kolankowatego bocznego (IGL).

LGN — ciało kolankowate boczne; DLG — grzbietowa część ciała kolankowatego bocznego; VLG — brzuszna część ciała kolankowatego bocznego; OX — skrzyżowanie wzrokowe; RHT — droga siatkówkowo-podwzgózowa; GHT — droga kolankowato-wzgózowa; OT — droga wzrokowa.

Homologiem tej struktury u małp i człowieka jest jądro przedkolankowe (pregeniculate nucleus). Prostymi metodami histologicznymi struktura ta jest praktycznie nieodróżnialna od reszty (brzusznej i grzbietowej części) ciała kolankowatego bocznego. Dlatego też wcześniej obszar ten zaliczano do brzusznej części LGN; był on po prostu nieodróżnialny w barwieniu metodą Nissla. Dopiero immunocytochemiczna lokalizacja astrocytów z użyciem przeciwciał na kwaśne białko włóknikowe gleju (GFAP glial fibrillary acidic protein) pozwoliła na anatomiczne odróżnienie tej struktury od reszty ciała kolankowatego bocznego (MORIN i współaut. 1989). Jednakże używając tej metody obserwuje się różnice gatunkowe w intensywności za-

ła kolankowatego bocznego od dziobu aż do ogona. Zajmuje u szczura odcinek około 2 mm, a u chomika 2,2 mm, co w porównaniu 0,6 mm zajmowanymi przez SCN ma swoją wymowę (MORIN 1994). Anatomiczna i funkcjonalna różnorodność w aferentnej projekcji tych trzech struktur (DLG, IGL, VLG) stała się podstawą do ich odróżnienia. Neurony części grzbietowej mają bowiem tylko projekcję do kory wzrokowej i biorą udział w tak zwanym postrzeganiu pierwotnym, brzuszna część unerwia liczne obszary podkorowe lecz nie korę wzrokową. Natomiast neurony listka ciała kolankowatego bocznego u wielu gatunków ssaków mają projekcję wsteczną w przeważającym stopniu tylko do jąder nadskrzyżowaniowych podwzgórza; chociaż

ostatnio u szczurów (MIKKELSEN i MOLLER 1990) i myszokoczków (*Mongolian gerbils*) (MIKKELSEN i współaut. 1991) opisano dodatkową projekcję do szyszynki, równie ważnego „elementu” zegara biologicznego. Projekcja z IGL do SCN jest obustronna i ograniczona wyłącznie do brzuszno-bocznej części jąder omijając projekcję RHT. Drogę nerwową, po której biegnie informacja z IGL do SCN nazwano drogą kolankowato-wzgórzową (GHT geniculatum hypothalamic tract). Istnieje także, co warto podkreślić, przeciwniegiła wzajemna i obustronna projekcja między ciałami kolankowatymi bocznymi. Jest ona wyłącznie ograniczona do listka, a w nim do populacji neuronów oddzielonych od tych, któ-

re wysyłają swoje włókna eferentne do SCN. To wzajemne połączenie przebiega przez spoidło nadwzrokowe (supraoptic commissures). Nie jest jednak jasne czy to połączenie obu listków spełnia inną rolę niż tylko regulacja rytmemi biologicznymi. Istnieją dowody mówiące, że przez to połączenie następuje wzajemna ich regulacja (MIKKELSEN 1992). Mogłoby to sugerować, że do prawidłowego funkcjonowania zegara biologicznego konieczne jest współdziałanie czy jednoczesna aktywność obu listków ciał kolankowatych bocznych. Jest to być może kolejny dowód integracyjnej aktywności mózgu.

HISTOLOGIA IGL

Histologicznie strukturę tę budują małe i średnie wielobiegunkowe neurony, których drzewka dendrytyczne ograniczają się do obszaru zajmowanego przez IGL i tym wyróżniają morfologicznie tę strukturę od reszty ciała kolankowatego bocznego. Podobna neuronalna organizacja jest widoczna w obu częściach przylegających do IGL, tu również dendryty rzadko przekraczają granice ich występowania. Morfologia zakończeń splotów nerwowych w IGL jest różna

od ich zakończeń w DLG i VLG. W budowie ultrastrukturalnej komórki listka charakteryzują się, licznymi mielinowanymi aksonami zgrupowanymi w neuropile, podobnie jak to jest w SCN. Biegają one horyzontalnie w kierunku przednio-tylnym tworząc gęste pęczki włókien mielinowych, które swą ultrastrukturą odróżniają IGL od części brzusznej i grzbietowej (MOORE i CARD 1994).

NEUROCHEMIA IGL

W listku ciała kolankowatego bocznego wykryto liczne populacje immunoreaktywnych neuromodulatorów. Najliczniejszą grupę stanowią enkefalin (ENK) obecne w około 1000 neuronach, głównie w projekcji do przeciwniegiło położonego listka u szczura, a u chomika dodatkowo w projekcji do SCN. Neuroaktywny peptyd Y (NPY) jest obecny w około 600 komórkach nerwowych u szczura głównie w projekcji do SCN. Występuje także substancja P (SP), serotonina (5-HT), czynnik uwalniający kortykosteroid (CRF corticosteroid releasing factor), neurotensyna (NT) i hydroksylaza tyrozyny (TH). Kwas gamma aminomasłowy (GABA) jest obecny w największej populacji neuronów, bo w około 1500 w każdym listku. Liczba ta jest bardzo bliska sumie neuronów zawierających neuroaktywny peptyd Y i enkefalinę, co wskazywałoby, że wszystkie neurony zawierające te neuroaktywne peptydy są GABA-ergiczne. Immunohistochemiczne barwienie na obecność dekarboksylazy glutaminianowej (GAD glutamate decarboxylase), enzymu syntetyzującego GABA, wykazało, że rozmieszczenie i liczba GAD(+) neuronów była bardzo podobna do neuronów barwionych metodą Nissla. To z kolei

sugeruje, że większość, a może wszystkie neurony IGL są GABAergiczne. Znacznie mniejsza ilość GAD(+) neuronów występuje w grzbietowej i brzusznej części ciała kolankowatego bocznego (MOORE i CARD 1994). Jest to dowód, że większość projekcyjnych neuronów IGL zawiera GABA, który musi odgrywać ważną rolę w funkcjonowaniu IGL, a przez to wpływa na okołodobowe zmiany (MOORE i SPEH 1993). Wsteczne barwienie połączone z immunohistochemią na obecność neuroaktywnego peptydu Y i enkefaliny wykazało jednak różnicę w ilości komórek wstecznie barwionych, których liczbę określono na około 2000, w stosunku do około 1700 komórek z NPY i ENK. Różnica ta dowodzi, że istnieje mała populacja projekcyjnych neuronów IGL o niezidentyfikowanym jeszcze neuroaktywnym peptydzie. IGL otrzymuje także gęste unerwienie bogate w substancję P, jak dotąd jednak nie jest znane źródło tej projekcji. Obecna jest też słaba projekcja monoaminoergiczna i cholinergiczna z pnia mózgu. Stanowi ona część głównej projekcji niespecyficznej do LGN. W stosunku do DLG i VLG zakończenia serotonergiczne z jąder szwu (raphe), noradrenergiczne z jądra sinawego (locus coeruleus) i cholin-

giczne z komórek pnia mózgu stanowią bardzo nieliczną grupę.

Neurony budujące IGL to głównie neurony projekcyjne, świadczy o tym ich duża liczba wysyłana do SCN i przeciwległe położenie IGL. Całkowita liczba komórek nerwowych budujących IGL, obliczona w preparacie Nissla, mieści

się w granicach 1800–2000. To grube przybliżenie wynika ze wspomnianego już faktu, iż barwienie metodą Nissla nie jest dobrym wskaźnikiem budowy anatomicznej listka ciała kolankowatego bocznego. Najprawdopodobniej liczba ta jest bliższa 2000 (MOORE i CARD 1994).

REAKCJA LISTKA CIAŁA KOLANKOWATEGO BOCZNEGO NA ŚWIATŁO

Istnieją dowody mówiące o wpływie światła na aktywność IGL. Mało jest natomiast dowodów potwierdzających udział IGL w przewodzeniu informacji świetlnych do SCN. Stwierdzono trzy różne wzory odpowiedzi neuronów listka na stymulację świetlną komórek zwojowych siatkówki (HARRINGTON i RUSAK 1989):

1. monotoniczne (jednostajne) zmiany poziomu częstotliwości odpowiedzi na zmiany oświetlenia,

2. monotoniczne (jednostajne) odpowiedzi ze wzrostem poziomu częstotliwości na kierunkowe zmiany oświetlenia,

3. zmiany poziomu częstotliwości tylko w odpowiedzi na wzrost siły oświetlenia. Drażnienie elektryczne listka obniża poziom odpowiedzi na stymulację świetlną w przeciwległym listku i hamuje odpowiedź na bezpośrednio napływające bodźce świetlne (ZHANG i RUSAK 1989). Generalnie reakcja neuronów listka na drażnienie siatkówki jest bardzo podobna do odpowiedzi jąder nadskrzyżowaniowych na ten rodzaj bodźca. Jest to zgodne z obserwacją, że SCN i IGL są unerwione przez ten sam zespół komórek nerwowych siatkówki. Niesłychanie ważne jest spostrzeżenie, że aktywność układu listek — GHT powoduje zmiany fazy rytmu, różne od tych które wywołuje światło.

Impulsy świetlne wpływają na rytm wolno biegnący, charakterystyczny dla stałych warunków świetlnych w czasie subiektywnej nocy, czyli okresu, który w warunkach rytmu okołodobowego odpowiada nocy. Powodują one opóźnienie fazy rytmu, jeśli są podawane na początku subiektywnej nocy lub jej przyspieszenie, gdy podano je na końcu subiektywnej

nocy. Natomiast liczne nieświatłne bodźce, takie jak zmiany wywołujące aktywność motoryczną, warunki socjalne, przyjmowanie leków czy regularne przyjmowanie pokarmu mają swój wpływ na rytm wolnobiegący, powodując jego przyspieszenie podczas subiektywnego dnia czyli okresu, który w warunkach rytmu okołodobowego odpowiada okresowi światła. Przyspieszenie fazy rytmu aktywności motorycznej, wywołane bodźcami nieświatłnymi podczas subiektywnego dnia jest tak duże, że często o wiele większe od tego, które wywołuje światło podczas subiektywnej nocy. To nasuwa wniosek, że światło i sygnały nieświatłne wpływają na zegar biologiczny działając poprzez różne neuronalno-komórkowe mechanizmy. Bodźce nieświatłne powodują nie tylko zmiany w przebiegu rytmu wolno biegnącego, ale mogą także indukować powstanie rytmu okołodobowego. To wydaje się być mechanizmem regulacji sprzężenia zwrotnego w działaniu dawcy czasu (zeitgebera), szczególnie w pośredniczeniu skutków aktywności lokomotorycznej. Najprawdopodobniej wymaga to wejść do IGL z jąder szwu, miejsca sinawego, a szczególnie z obszarów tylnej części skrzyżowania wzrokowego (RCA retrochiasmatic area). Uszkodzenie IGL i GHT przy zmianie warunków świetlnych powoduje wyraźne zmiany w odpowiedzi układu okołodobowego. Ponieważ wszystkie składowe rytmy aktywności chomików mogą być synchronizowane przez periodyczną nieświatłną stymulację, włączając te synchronizowane przez światło, zatem informacje o nieświatłnych wydarzeniach muszą dochodzić także do SCN, miejsca świetlnej synchronizacji rytmów.

WPLYW USZKODZEŃ IGL NA RYTMY BIOLOGICZNE

Jedną z najprostszych metod badania roli listka w generowaniu rytmów biologicznych jest ich elektryczne czy chemiczne uszkodzenie. Powoduje ono:

1. Wydłużenie czasu adaptacji potrzebnego organizmowi na dostosowanie się (resynchronizacji) do nowych warunków po zmianie faz świetlnych (LD na DL). Jest to dowód na udział

światła w aktywności IGL, ale może to być także wynik redukcji aktywności IGL po jego uszkodzeniu.

2. Zmianę położenia maksimum aktywności badanego rytmu (czasu wystąpienia maksimum).

3. Zablockowanie zdolności wydłużania się okresu rytmu wolno biegnącego podczas stałe-

go oświetlenia, a zatem wystąpienie krótszego okresu (τ) rytmu wolno biegnącego w stałym świetle.

4. Zanik rozdawiania się rytmu aktywności lokomotorycznej chomików, charakterystyczny dla przedłużających się warunków stałego oświetlenia.

5. Zniesienie wydłużenia się okresu (τ) rytmu przy przejściu z DD do LL (PICKARD i współaut. 1987).

6. Istotne zmniejszenie całkowitej aktywności lokomotorycznej chomików, nawet o 70–80% w stosunku do kontroli (JOHNSON i współaut. 1988, WICKLAND i TUREK 1994). Interesujące, że samo uszkodzenie drogi GHT czy lezja listka nie zakłóca synchronizacji rytmów w standardowych, laboratoryjnych warunkach świetlnych (LD 12/12). Nadal jest widoczne wyraźne, ostre przejście rytmu między światłem i ciemnością. Dowodzi to, że w tych warunkach oświetlenia sama droga RHT jest wystarczająca do synchronizacji rytmów, co może oznaczać, że droga przez IGL nie jest konieczna do synchronizacji rytmów przez światło. Obserwacje te potwierdzają udział listka i drogi GHT w procesach rytmicznych, nie wyjaśniają jednak dokładnie ich roli w tych zjawiskach. Trudność polega na tym, że nie jesteśmy w stanie wykonać precyzyjnego wyłączenia tylko projekcji RHT, pozostawiając nie uszkodzoną drogę GHT (MOORE 1992a). Z tego też powodu nie wiemy, czy sama droga GHT bez obecności bezpośredniej projekcji do SCN jest w stanie regulować rytmy biologiczne.

Inną metodą pozwalającą sprawdzić rolę tego nowego elementu w mechanizmie zegara biologicznego jest jego elektryczne czy chemiczne drażnienie przez stosowanie pobudzających neurotoksyn. Powoduje ono zmianę fazy rytmu wolno biegnącego aktywności motorycznej chomików, której krzywa odpowiedzi fazowej (PRC phase response curve) jest zupełnie różna od tej, jaką powoduje impuls światła czy stymulacja SCN, ale bardzo podobna do PRC, jaką wywołuje impuls ciemności. Podobny efekt jest obserwowany po podaniu neuroaktywnego peptydu Y do SCN. Tu także krzywa odpowiedzi fazowej jest zupełnie różna od tej, którą powoduje impuls świetlny, ale bardzo podobna do tej, którą wywołują bodźce nieświatlne. NPY stanowi zatem ekwiwalent elektrycznego drażnienia SCN. Wywołuje wzór przesunięcia fazowego podobny to tego, jaki powoduje impuls ciemności lub reakcja wzbudzenia (arousal) mózgowia, będąca wynikiem udziału innych niż światło bodźców. Można by zatem przypuszczać, że NPY stanowi element krytyczny we wpływie reakcji wzbudzenia mózgowia na regu-

lację rytmów biologicznych. Ostatnie badania wykazały, że bodźce wywołujące aktywność lokomotoryczną powodują przesunięcie fazy rytmu z identyczną krzywą odpowiedzi fazowej, jaką obserwuje się po stymulacji IGL.

Ponieważ podanie NPY zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* stanowi ekwiwalent stymulacji IGL, wydaje się uzasadnione stwierdzenie, że obserwowany efekt przesunięcia fazowego po aktywacji drogi IGL–GHT jest wynikiem, przynajmniej w części, aktywności receptorów dla NPY obecnych SCN. To nie wyklucza jednak możliwości jednoczesnego wpływu wydzielanego GABA i NPY na działanie głównego oscylatora. Faktycznie wydaje się prawdopodobne, że GABA i NPY mogą mieć ten sam wpływ i że w wyniku wspólnego wydzielania efekt ich działania jest podwojony. Możliwe jest także, że inne bezpośrednie wejścia do SCN, takie jak z jąder szwu, mogą wpływać i modulować działanie tego głównego elementu w mechanizmie zegara biologicznego. A zatem obserwowany efekt przesunięcia fazowego, wywołany impulsami ciemności nie jest wynikiem świetlnym (braku światła) lecz efektem aktywności motorycznej wywołanej innymi niż światło bodźcami. Narzuca się zatem jasna konkluzja z tych obserwacji, że droga IGL–GHT jest konieczna do przewodzenia nieświatlnych bodźców synchronizujących rytmy biologiczne. Nie jest natomiast jasne, czy IGL jest konieczny dla innych nieświatlnych bodźców wpływających na działanie zegara biologicznego. Możliwe bowiem jest, że te nieświatlne synchronizatory mogą oddziaływać bezpośrednio na SCN omijając IGL. Dobrym przykładem jest projekcja serotonergiczna z krawędzi szwu śródmózgowia, której nerwowe zakończenia, obserwowane w SCN, omijają wejścia dróg RHT i GHT. Ich zniszczenie powoduje zmiany fazy i okresu rytmu wolno biegnącego. Krzywa odpowiedzi fazowej powstała w wyniku tych zmian jest bardzo podobna do tej, jaką obserwujemy po podaniu NPY *in vitro* czy elektrycznym drażnieniu projekcji IGL–GHT *in vivo*. Nieświatlna stymulacja SCN zarówno poprzez drogę IGL–GHT czy też przez inne aferentne wejścia wywołuje podobną krzywą odpowiedzi fazowej. Przypuszczalnie receptory pośredniczące w tym zjawisku są zaangażowane w ten sam proces międzykomórkowej sygnalizacji wpływającej na aktywność — działanie dawcy czasu. W odróżnieniu od światła, które powoduje ekspresję wczesnych genów *c-fos* w SCN, bodźce nieświatlne powodujące wyraźne przesunięcie fazy rytmu nie wywołują bezpośredniej ekspresji *fos* w SCN, a jedynie w IGL i to w miejscach lokalizacji NPY. Warto w tym miejscu dodać, że około 70% komórek listka zawierających NPY wyka-

zuje ekspresje *c-fos*. To kolejny dowód świadczący o udziale w synchronizacji rytmów biologicznych innych bodźców niż świetlne i ich przekazywania z IGL do SCN drogą, która nie jest zaangażowana w indukcję genów *fos*. Listek ciała kolankowatego bocznego działa zatem jako integrator świetlnych i nieświetlnych informacji modyfikując działanie dawcy czasu.

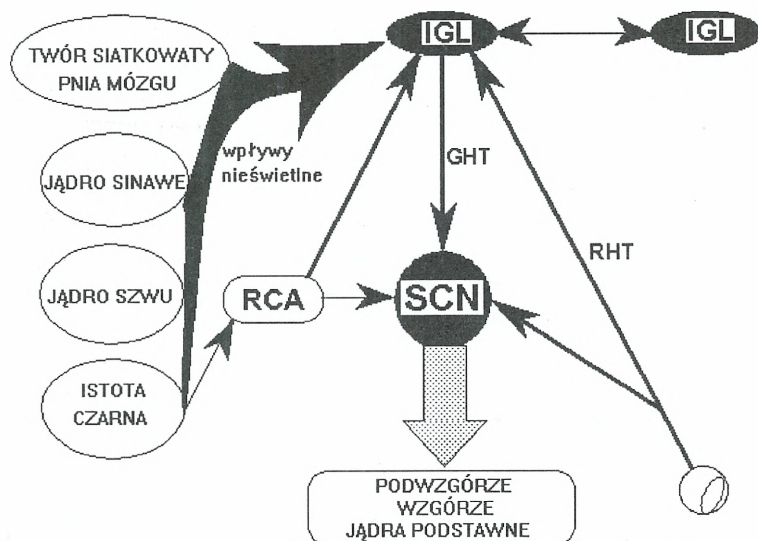
Niezwykle interesujące i intrygujące było odkrycie obszaru tylnej części skrzyżowania wzrokowego (RCA retrochiasmatic area), jako ważnego elementu okołodobowego obwodu regulującego rytmy biologiczne. Leży on na drodze krzyżujących się włókien spoidła nadwzrokowego. Dochodzą do niego informacje z siatkówki, SCN, istoty czarnej, tworzą siatkowatego pnia mózgu i podwzgórza. Barwienie wsteczne wykazało również silne połączenie listka z RCA. Projekcja ta jest znacznie bogatsza niż do SCN, przednich obszarów podwzgórza oraz grzbietowej i bocznej części SCN (MOORE i CARD 1994). To dowód, że RCA bierze również udział w przewodzeniu nieświeatlnych informacji do IGL, głównie z podwzgórza i pnia mózgu. Te dwie struktury mają idealne położenie do kompleksowego przetwarzania informacji sensorycznych i motorycznych, które nieustannie bombardują nasz organizm oraz ich przekazywania do listka ciała kolankowatego bocznego.

Wykazanie roli, jaką RCA odgrywa w regulacji rytmów okołodobowych, wyjaśniło dlaczego uszkodzenie czy zniszczenie tylko SCN nie eliminuje tak ważnych i strategicznych dla organizmu rytmów okołodobowych, jak rytm temperatury ciała czy fazy REM snu. Dopiero rozległe zniszczenie jąder nadskrzyżowaniowych obejmujące obszar RCA powodowało zanik tych

rytmów. Przypuszcza się, że samo SCN jest odpowiedzialne za regulację „wolnych i słabych” rytmów behawioralnych. „Silne”, podstawowe i ważne dla organizmu rytmy są prawdopodobnie regulowane ze współudziałem wszystkich elementów (RCA, IGL i SCN) mechanizmu zegara biologicznego.

Rola IGL w mechanizmie funkcjonowania zegara biologicznego polega zatem na integracji różnorodnych i szeroko napływających nies świetlnych bodźców z informacją świetlną płynącą drogą bezpośrednią i pośrednią przez SCN z komórek zwojowych siatkówki (ryc. 2).

Nieświeślne informacje dochodzą do IGL głównie za pośrednictwem układów modulujących mózgowie, takich jak projekcja cholinergiczna czy monoaminoergiczna pnia mózgu, informując o stanie behawioralnym organizmu. IGL zbierając te informacje zabezpiecza prawidłową i precyzyjną homeostatyczną regulację funkcji SCN jako głównego regulatora rytmów biologicznych. Omawiana struktura, stanowiąca nowy element w mechanizmie funkcjonowania zegara biologicznego gryzoni, nie jest wyraźnie widoczna u małp. Przynajmniej do tej pory nie wykazano eksperymentalnie istnienia projekcji z ciała kolankowatego do SCN. Stwierdzono wprawdzie istnienie populacji neuronów zawierających NPY w brzusznej części ciała kolankowatego bocznego i brzusznych obszarach SCN, które stanowią gęsty splot aksonów w miejscu RHT. Ponieważ ciało kolankowate boczne u człowieka ma podobną strukturalną organizację jak u małp, można zatem przypuszczać, że organizacja listka powinna być podobna (MOORE 1992).



Ryc. 2. Schemat przedstawiający organizację i wzajemne powiązania dwu głównych elementów w mechanizmie zegara biologicznego z informacją świetlną napływającą z komórek zwojowych siatkówki i bodźcami niesświetlnymi z układów niespecyficznych mózgowia.

MECHANIZM DZIAŁANIA IGL

Procesy wzbudzeniowe (brain arousal) napływające z układów niespecyficznych mózgowia podwyższają (torują) odpowiedzi komórek nerwowych będące efektem aktywności układów specyficznych (LEWANDOWSKI 1995). Można zatem przypuszczać, że również obserwowany w IGL efekt świetlnej stymulacji SCN może być modulowany poprzez aktywację układów niespecyficznych mózgowia. Tym bardziej, że obserwuje się torowanie odpowiedzi na błyski świetlne przez drażnienie somatyczne (np. uszczypnięcie ogona szczura). Informacje o stanie aktywności zwierzęcia czy poziomie jego wzbudzenia (arousal) mogą dochodzić do IGL bezpo-

średnio lub pośrednio przez obszary mózgowia, biorące udział w procesie przekazywania tego typu informacji. Chociaż wiele anatomicznych badań nie wyróżniło IGL z brzusznej części ciała kolankowatego bocznego to istnieją dowody pokazujące, że sam IGL otrzymuje serotonergiczne wejście z jądra grzbietowego szwu i słabe noradrenergiczne z miejsca sinawego. W ten sposób IGL zbiera informacje o stanie wzbudzenia zwierzęcia i przekazuje je do SCN. Systematyczne podawanie agonistów receptorów serotonergicznych powoduje przesunięcie fazy rytmu aktywności motorycznej, a podanie neurotoksyny serotoniny blokuje ten efekt.

PODSUMOWANIE

Jak zwykle w badaniach dotyczących tak skomplikowanej struktury jaką jest mózgowie, szczególnie gdy dotyczą one poszukiwania tak zwanego zegara biologicznego i mechanizmu jego działania, pozostaje wiele nie wyjaśnionych pytań.

Nie ulega wątpliwości, że listek jest anatomicznie i funkcjonalnie wydzieloną komponentą w kompleksie ciała kolankowatego bocznego i stanowi integralną część mechanizmu zegara biologicznego.

Nie jest jednak jasne dlaczego IGL, stanowiący część jądra tradycyjnie biorącego udział w przewodzeniu informacji wzrokowych, uczestniczy w regulacji rytmów biologicznych? W jaki sposób potrafi integrować napływające różnorodne bodźce zmysłowe z informacją świetlną? Jakie znaczenie ma wzajemne połączenie listków obu ciał kolankowatych bocznych? Jaki wpływ na aktywność IGL mają układy niespecyficzne (modulujące) mózgowie, takie jak: cholinergiczny, serotonergiczny, adrenergiczny? Czy procesy powodujące wzbudzenie mózgowia podwyższają (torują), czy też obniżają (hamują) odpowiedź neuronów w IGL na napływające informacje świetlne? Jakimi drogami te modulujące, niespecyficzne informacje dochodzą do IGL? Czy są one związane z reakcją wzbudzenia mózgowia (arousal), czy też jakieś inne zmienne

powodują to wyraźne przesunięcie fazowe? Dla światła bowiem oko jest jedynym punktem startowym, przyjmującym ten rodzaj bodźca. Być może interesujące i celowe byłoby rozpoczęcie badań wpływu bodźców nieświeatlnych na procesy rytmiczne od drugiego końca, czyli od głównego elementu zegara biologicznego — jąder nadskrzyżowaniowych. Posuwając się od SCN wstecz w kierunku obwodu, przypuszczalnie dowiedzielibyśmy się więcej na temat wejść i dróg, jakimi informacje nieświeatlnie docierają do SCN. Techniki oznaczania NPY i genów *c-fos* dają potencjalne możliwości w realizacji tak postawionego celu. Podsumowując rozważania dotyczące udziału listka ciała kolankowatego bocznego w mechanizmie funkcjonowania zegara biologicznego ssaków należałoby stwierdzić, że nadal pozostaje otwarte dokładne zrozumienie roli każdego z tych niespecyficznych wejść w funkcjonowaniu tego głównego mechanizmu i mechanizmów, poprzez które one działają na procesy rytmiczne organizmów. A zatem zagadka listka ciała kolankowatego bocznego polega na zrozumieniu mechanizmu, w jaki sposób potrafi on integrować te różnorodne wejścia bodźców nieświeatlnych z informacją świetlną, co w konsekwencji prowadzi do precyzyjnej rytmicznej regulacji funkcjonowania całego organizmu.

PARTICIPATION OF INTERGENICULATE LEAFLET IN THE MECHANISM OF ANIMAL BIOLOGICAL CLOCK

Summary

Light is the dominant "zeitgeber" for the entrainment of circadian rhythms. The effects of light are mediated by photoreceptors, the intrinsic retinal pathway and ganglion

cells forming the retinohypothalamic tract (RHT) that projects to the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus (SCN). The SCN functions as the major pacemaker in the

mammalian circadian system. The intergeniculate leaflet (IGL) is an anatomically and functionally distinct component of the lateral geniculate nucleus (LGN) which is intercalated between the dorsal geniculate nucleus (DLG) and ventral geniculate nucleus (VGL). The IGL contains neurons that form a secondary visual projection, the geniculate hypothalamic tract (GHT) by which photic information can reach the SCN. The IGL receives afferent input from SCN and adjacent anterior hypothalamic area, the retrochiasmatic area (RCA), the serotonin neurons of the midbrain raphe, the noradrenaline neurons of the locus coeruleus,

the cholinergic projection from brain stem and the contralateral IGL. There are two types of IGL neurons. One is characterized by colocalization of GABA and enkefalin (ENK) and the second by colocalization of GABA and neuropeptide Y (NPY). Activation of the IGL-GHT system results in phase changes that are different from those caused by light, phase advances during subjective day and phase delays during subjective night. The pathway via the IGL is not necessary for photic entrainment, but may integrate nonphotic information with visual input to provide a precise homeostatic regulation of the SCN pacemaker function.

LITERATURA

- AGUILAR-ROBLERO R., DRUCKER-COLIN R., MOORE R. Y., 1992. Behavioral and morphological studies of fetal neural transplants into SCN-lesioned rats. *Chronobiol. Int.* 9, 278-296.
- ASCHOFF J., 1964. Survival value of diurnal rhythms. *Symp. Zool. Soc. London* 13, 79-98.
- DE MAIRAN J., 1729. *Observation botanique*. Hist. Acad. R. Sci. Paris 35-36.
- GULDNER F. H., 1983. Numbers of neurons and astroglial cells in the suprachiasmatic nucleus of male and female rats. *Exp. Brain Res.* 50, 373-376.
- HALBERG F., HALBERG E., BARNUM C. P., BITTNER J. J., 1959. Physiologic 24-hour periodicity in humans beings and mice, the lighting regimen and daily routine. [W:] *Photoperiodism and Related Phenomena in Plants and Animals* WITHROW R. B., (red.). Am. Assoc. Advan. Sci., Washington DC., 803-878.
- HARRINGTON M. E., RUSAK B., 1989. Photic responses of geniculohypothalamic tract neurons in the Syrian hamster. *Vis. Neurosci.* 2, 367-375.
- HICKEY T. L., SPEAR P. D., 1976. Retinogeniculate projection in hooded and albino rats. *Exp. Brain Res.* 24, 523-529.
- INOYE S. I., KAWAMURA H., 1979. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic island containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 5962-5966.
- JOHNSON M. S., 1926. Activity and distribution of certain wild mice in relation to biotic communities. *J. Mammal.* 7, 245-277.
- JOHNSON R., MOORE R., MORIN L., 1988. Running wheel activity in hamster with hypothalamic damage. *Physiol. Behav.* 43, 755-763.
- LEWANDOWSKI M., 1995. Strukturalna i funkcjonalna analiza projekcji cholinergicznego pnia mózgu do kory wzrokowej. *TaiWPN Universitas, Kraków*, 53.
- MASON J., 1958. The central nervous system regulation of ACTH secretion. [W:] *Reticular Formation of the Brain* JASPER H. J., PROCTOR L. E., KNIGHTON R. S., NOSHAY W. C., COSTELLO R. T., (red.). Boston, Little Brown, 645-662.
- MIKKELSEN J. D., MOLLER M., 1990. A direct neural projection from the intergeniculate leaflet of the lateral geniculate nucleus of the deep pineal gland of the rat, demonstrated with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *Brain Res.* 520, 342-346.
- MIKKELSEN J. D., LOZZI B., MOLLER M., 1991. Efferent projections from the lateral geniculate nucleus to the pineal complex of the mongolian gerbil. *Cell Tiss. Res.* 264, 95-102.
- MIKKELSEN J. D., 1992. The organization of the crossed geniculogeniculate pathway of the rat: A *Phaseolus vulgaris* - leucoagglutinin study. *Neurosci.* 48, 953-962.
- MOORE R. Y., 1973. Retino-hypothalamic projection in mammals. A comparative study. *Brain Res.* 49, 403-409.
- MOORE R. Y., 1992. The organization of the human circadian timing system. *Progress in Brain Res.* 93, 101-117.
- MOORE R. Y., 1992a. The enigma of the geniculohypothalamic tract: Why two visual entraining pathways? *J. Int. Cycle Res.* 23, 144-152.
- MOORE R. Y., SPEH J. C., 1993. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett.* 150, 112-116.
- MOORE R. Y., CARD P. J., 1994. Intergeniculate leaflet: An anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J. Comp. Neurol.* 344, 403-430.
- MORIN L. P., JOHNSON R. F., MOORE R. Y., 1989. Two brain nuclei controlling circadian rhythms are identified by GFAP immunoreactivity in hamsters and rats. *Neurosci. Lett.* 99, 55-60.
- MORIN L. P., 1994. The circadian visual system. *Brain Res. Rev.* 67, 102-127.
- PICKARD G. E., RALPH M. R., MENAKER M., 1987. The intergeniculate leaflet partially mediates effects of light on circadian rhythms. *J. Biol. Rhythms* 2, 35-56.
- RICHTER C. P., 1922. A behavioristic study of the activity of the rat. *Comp. Psychol. Monog.* 1.
- RIETVELD W. J., 1992. Neurotransmitters and the pharmacology of the suprachiasmatic nuclei. *Pharmac. Ther.* 56, 119-130.
- RUSAK B., ZUCKER I., 1979. Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol. Rev.* 59, 449-526.
- RUSAK B., GROOS G. A., 1982. Suprachiasmatic stimulation phase shifts rodent circadian rhythms. *Science* 215, 1407-1409.
- SCHWARTZ W. J., DAVIDSEN L. C., SMITH C. B., 1980. In vivo metabolic activity of a putative circadian oscillator, the rat suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Neurol.* 198, 157-167.
- WICKLAND C., TUREK F. W., 1994. Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet block activity-induced phase shifts in the circadian activity rhythm of golden hamster. *Brain Res.* 660, 293-300.
- ZHANG D. X., RUSAK B., 1989. Photic sensitivity of geniculate neurons that project to the suprachiasmatic nuclei or the contralateral geniculate. *Brain Res.* 504, 161-164.