

Grażyna Barbacka-Surowiak,^{*} Henryk Lach,^{**}
Józef Surowiak,^{*} Jacek Domosławski^{*}

Zjawisko dyspersji rytmu jako źródło błędów biochemicznych w badaniach 24-godzinnej rytmiki w warunkach LD¹

Streszczenie

W biochemicznych badaniach 24-godzinnej rytmiki aktywności enzymów pojawia się niebezpieczeństwo wystąpienia dyspersji rytmiki dobowej u zwierząt, od których pobiera się materiał do badań enzymatycznych.

Zjawisko dyspersji rytmu pochodzi z przesunięć fazowych lub zaniku rytmu aktywności u poszczególnych osobników, czego powodem może być albo sam sposób pobierania materiału, czy nie kontrolowane bodźce ze środowiska albo wzajemne wpływy socjalne.

Autorzy omawiają szereg przypadków takich przesunięć fazowych rytmów wywołanych samą procedurą pobierania materiału do oznaczania aktywności enzymu (acetylocholinesterazy w podwzgórzu i zakręcie obręczy) lub wpływem liczby hodowanych zwierząt w klatce.

WSTĘP

W celu przeprowadzenia biochemicznych badań 24-godzinnej rytmiki aktywności enzymów, poziomu hormonów, poziomu elektrolitów we krwi lub tkankach małych gryzoni (myszy, szczurów itp.) zabija się zwykle co cztery godziny po 7 do 10

¹ Praca została wykonana w ramach programu R.III.14 koordynowanego przez Uniwersytet Jagielloński.

^{*}Zakład Fizjologii Zwierząt, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

^{**}Zakład Fizjologii Zwierząt, Instytut Biologii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Krakowie

zwierząt, w okresie przynajmniej 48 godzin, dla pobrania materiału. Z uzyskanych uśrednionych różnymi metodami danych określa się, czy zmiany aktywności badanego zjawiska fizjologicznego wykazują 24-godziną czy inną rytmikę.

Nasuwa się pytanie: Jakie warunki powinny być spełnione, aby została zachowana 24-godzinna rytmika badanego zjawiska fizjologicznego i aby prawidłowo ujawniła się w analizie uzyskanych wyników?

Warunki te są następujące:

1. Musi być odpowiedni "dawca czasu" ("Zeitgeber" Aschoff, 1954). Takim podstawowym dawcą czasu jest przemienalna zmiana światła i ciemności w okresie 24 lub zbliżonym do 24 godzin, powtarzająca się cyklicznie (LD 12:12, LD 8:16 itp., gdzie L oznacza okres jasny 12 lub 8-godzinny, a D okres ciemny 12 lub 16-godzinny cyklu) (Aschoff, 1979; Aschoff i Pohl, 1978).

2. Pomieszczenie hodowlane nie powinno mieć okien, ma być dobrze wentylowane, izolowane pod względem akustycznym, posiadać stałą temperaturę ca 20-22°C, stałą wilgotność powietrza - około 60% - i stałe sztuczne oświetlenie o natężeniu światła w okolicach jego źródła około 200-250 lx, zaś nad powierzchnią klatek 20-25 lx, poza tym oświetlenie pomieszczenia powinno być równomierne. Należy maksymalnie wykluczyć możliwość występowania nie kontrolowanych, rytmicznie powtarzających się bodźców świetlnych, akustycznych itp. (ponieważ mogą one stać się nie kontrolowanymi "dawcami czasu" zmieniającymi rytmikę zwierząt) (Aschoff, 1979; Aschoff i Pohl, 1978; Moore-Ede i wsp., 1982; Gander i Lewis, 1983; Pohl, 1983).

3. Zwierzęta powinny być w tym samym wieku, tej samej płci i pochodzić z tego samego szczepu (Olivero i Malorini, 1979; Connolly i Lynch, 1981; Buttner i Wollnik, 1984; Castellano i wsp., 1985).

4. Przed rozpoczęciem doświadczeń zwierzęta należy adaptować do wyżej wymienionych warunków hodowlanych przynajmniej

przez okres dwóch tygodni, w celu synchronizacji rytmu endogennego do dawcy czasu LD (entreinment). Zapobiega to ujawnieniu się tzw. efektów następczych (after-effect) (Pittendrigh i Daan, 1976; Moore-Ede i wsp., 1982).

5. Należy brać pod uwagę, że zwierzęta hodowane pojedynczo w klatkach mają inny przebieg rytmiki od zwierząt hodowanych w grupach (Quay i wsp., 1971; Aschoff, 1979; Wood i Rose, 1979; Stuppel i wsp., 1981; Gentsch i wsp., 1982 a, b i c, 1982 a i b).

Celem niniejszych badań było wykazanie pewnych często nie kontrolowanych czynników i niespodziewanych zjawisk w przebiegu rytmiki badanych zwierząt, które mogą w istotny sposób zafałszować lub zmienić badany na podstawie analiz biochemicznych rytm.

MATERIAŁ I METODY

Ogólnie przyjmuje się, że rytmika aktywności lokomotorycznej i spoczynku odzwierciedla właściwości endogennego zegara biologicznego zwierząt (i człowieka), dlatego też rytmikę badanych procesów fizjologicznych organizmu odnosi się do rytmiki aktywności i spoczynku badanych zwierząt.

Aby to sprawdzić, przeprowadzono badania na 700 samcach myszy szczepu Swiss pochodzących z hodowli "Camur" w wieku początkowym 6-8 tygodni. Mimo że zwierzęta urodziły się i wzrastały do wieku 6-8 tygodni w warunkach oświetlenia LD 12:12 (od godz. 8 do 20 - faza jasna i od 20 do 8 - faza ciemna doby), wszystkie zwierzęta przeznaczone do doświadczeń adaptowano do pomieszczenia hodowlanego w okresie dwóch tygodni. Pomieszczenie hodowlane nie posiadało okien, było izolowane akustycznie, średnia temperatura wynosiła 20 +/- 2°C a wilgotność powietrza 60% +/- 5%. Dawcą czasu były: zmieniające się co 12 godzin światło, pochodzące z lamp jarzeniowych o natężeniu przy źródle światła 200-250 lx, zaś

nad powierzchnią klatek 20-25 lx, oraz całkowita ciemność, bez możliwości przecieków światła z zewnątrz.

Wykonano następujące serie doświadczeń:

1. W miesiącach: kwietniu, sierpniu, wrześniu i listopadzie 1984 r. umieszczano po 100 samców myszy w klatkach plastikowych nieprzezroczystych tak, by cztery osobniki znajdowały się w jednej klatce. Klatki były przykrywane przezroczystą, drucianą pokrywą i ustawiane na regałach obok siebie. Wymiary klatki wynosiły 27 x 18 x 9,5 cm. Zwierzęta te były przeznaczone do badania aktywności acetylocholinestery (AChE) w podwzgórzu i zakręcie obręczy układu limbicznego. Równolegle badano też aktywność motoryczną tych zwierząt. W tym celu w dwóch klatkach przezroczystych z pleksiglasu o wymiarach 30 x 30 x 10 cm, ustawionych na aktometrach, umieszczono po cztery osobniki. Każdy ruch zwierząt był w postaci sygnału gromadzony w liczniku elektronicznym i co godzinę suma tych sygnałów była rejestrowana na taśmie perforowanej. W ten sposób dokonywano pomiaru aktywności motorycznej zespołowej.

Dla wykonania pomiaru aktywności motorycznej indywidualnej używano podobnych aktometrów z przezroczystymi klatkami z tego samego materiału jak wyżej opisane klatki, w których umieszczono po jednym osobniku. Pomiar ich aktywności dokonywał się podobnie jak pomiar zespołowy. Wszystkie aparaty z klatkami stały obok siebie w odległości około 20 cm jedna od drugiej, umożliwiając wzajemne wizualne, akustyczne czy inne kontakty.

2. W czasie wykonywania drugiej serii doświadczeń, zwierzęta przeznaczone do badania aktywności AChE były rozlokowane pojedynczo w klatkach. Pozostałe badania aktywności motorycznej indywidualnej były wykonywane tak, jak w grupie poprzedniej.

3. Podczas tego doświadczenia zwierzęta były rozmieszczone po 4 osobniki w jednej klatce, a rejestracja aktywności motorycznej zespołowej i indywidualnej została wykonana

podobnie jak w grupach poprzednich, z tą różnicą, że warunki LD 12:12, w których zwierzęta były hodowane przez 4 tygodnie, zostały zmienione na DL 12:12 (w miejsce fazy jasnej nastąpiła faza ciemna doby, a w miejsce fazy ciemnej - faza jasna, obie po 12 godz.) i w tych warunkach zwierzęta pozostawały przez 2 tygodnie. Po upływie dodatkowego tygodnia pobrano materiał dla wykonania badań enzymatycznych.

4. W lipcu 1986 r. przeprowadzono badania aktywności lokomotorycznej i spoczynku zwierząt w warunkach nieprawidłowych. W tym celu w sześciu klatkach o wymiarach 13x12x11,5 cm, wykonanych z siatki nierdzewnej metalowej z przyległą do nich bieżnią kołową (bębnową) o średnicy 20 cm i szerokości bębna 5 cm (długość pasa bieżni wynosiła 62,8 cm), umieszczono po dwie myszy i w sześciu podobnych klatkach po jednej myszy (samce). Wszystkie obroty bębna były zliczane przez licznik elektroniczny i co godzinę suma obrotów była rejestrowana na taśmie perforowanej. Pomieszczenie w którym umieszczono klatki miało sztuczne oświetlenie, spełniające warunki LD 12:12, ale nie było izolowane akustycznie, gdyż od korytarza zwierzętarni oddzielały je tylko drzwi. W tym też czasie były prowadzone prace murarskie w innych pomieszczeniach zwierzętarni. Trwający więc hałas mógł być dodatkowym czynnikiem wpływającym na rytmikę zwierząt. Po dwóch tygodniach trwania badań w warunkach LD 12:12 warunki oświetlenia zostały zmienione na DL 12:12, jak w grupie poprzedniej. Podczas wykonywania doświadczeń klatki czyszczono jeden raz w tygodniu zawsze w tym samym dniu w godzinach od 9-9³⁰. Każdego dnia podawano zwierzętom w tym samym czasie pokarm standardowy granulowany oraz wodę ad libitum. Zachowanie się zwierząt hodowanych w pomieszczeniu izolowanym można było obserwować na ekranie telewizyjnym ustawionym tam, gdzie znajdowała się elektroniczna aparatura pomiarowa.

W doświadczeniach przeprowadzonych dla badania aktywności AChE, po dwóch tygodniach adaptacji zwierząt zabijano po 7 osobników, począwszy od godz. 8⁰⁰, co 4 godziny przez

dwie kolejne doby. Wypreparowane podwzgórze i korę zakrętu obręczy (gyrus cinguli) umieszczano w buforze fosforanowym (pH=8) w temperaturze 0°C, a następnie, po przemyciu i rozdrobnieniu tkanek, homogenizowano je w buforze fosforanowym (pH=8) w teflonowo-szklanych, mechanicznych homogenizatorach w ciągu 2 minut w kąpielii wodnej z lodem. Aktywność AChE oznaczano metodą Ellmana (Elman i wsp., 1961) w której jako substratu używa się jodku acetylotiocholiny. W wyniku jego hydrolizy powstająca tiocholina reaguje z dodanym do homogenatu DTNB (5-tio-2-nitrobenzoesanem) dając żółte zabarwienie, którego intensywność jest wprost proporcjonalna do ilości rozłożonej acetylotiocholiny a więc i aktywności AChE zawartej w tkance. Intensywność zabarwienia mierzono w spektrofotometrze VSU-2P C. Zeiss, w temperaturze 37°C w trzeciej minucie, przy długości fali 412 nm. Aktywność enzymu przeliczano w um zhydrolizowanego substratu w przeciągu 1 minuty na gram świeżej tkanki.

Uzyskane wyniki opracowano na komputerze SM-3A zmodyfikowaną metodą Halberga (Nelson i wsp., 1979), wyliczając następujące parametry rytmu o okresie dopasowanym i arbitralnym $T = 24$ godzinom (obliczenia prowadzono przy poziomie istotności $p=0.05$):

Mesor M - średnia wartość aktywności dobowej,

Amplituda rytmu A ,

Akrofaza rytmu ϕ - wartość kątowa mierzona w stopniach lub godzinach od wartości zerowej (w tym wypadku od północy czasu środkowoeuropejskiego), określająca czas wystąpienia pierwszego maksimum rytmu.

Rysunki dopasowań rytmów wykonano na ploterze NE 2000.

Aktywność motoryczną lub lokomotoryczną zwierząt obliczono w następujący sposób:

Po zakończeniu doświadczeń taśma perforowana z zarejestrowaną liczbą ruchów była opracowana przy pomocy programu komputerowego, który pozwalał na wykonanie obliczeń kalendrzowych oraz wizualizację danych dla poszczególnych godzin

i dni. Następnie z całego materiału wybierano cztery doby takie, aby dwie z nich poprzedzały a pozostałe dwie pokrywały się czasowo ze skorelowanymi z motoryką badaniami biochemicznymi. Pierwszą z wybranych grup traktowano jako grupę kontrolną, drugą jako doświadczalną. Dla obu tych grup zastosowano program pozwalający na indykację występowania rytmu. Oceniano to poprzez dopasowanie do wyników doświadczalnych funkcji periodycznej postaci:

$$F(t) = M + A \cos(2\pi t / \tau + \phi)$$

gdzie:

M - mesor (przeciętna wartość dopasowania)

A - amplituda rytmu

τ - okres funkcji F

ϕ - akrofaza rytmu.

Rozwiązywano problem stosując metodę najmniejszych kwadratów w modyfikacji określonej jako SINGULAR VALUE DECOMPOSITION. Pełny opis tej metody wraz ze szczegółowym uzasadnieniem teoretycznym można znaleźć w pracy (Forsythe i wsp., 1977). Zasadnicze obliczenia poprzedzało wykonanie testu Studenta, który pozwalał ocenić, czy średnie wyniki dla poszczególnych godzin różnią się istotnie między sobą. Kryterium zgodności założonego modelu z doświadczeniem jest test X wyliczony dla poziomu istotności $p = 0,05$. W każdym przypadku obliczono też dopasowanie przy założeniu stałego okresu równego 24 godzinom. Uzyskanie poprawnego dopasowania pozwala wnioskować o rytmice danego przebiegu, a także operować parametrami funkcji $F(t)$ jako charakterystykami tego przebiegu lub stosować je dla porównań z innymi przebiegami (np. zmiany okresów albo przesunięcia akrofaz). Wszystkie obliczenia numeryczne były wykonywane przy pomocy maszyny cyfrowej SM-3A.

WYNIKI

Z tabeli 1, fig. 1 wynika, że przez dwie doby przed pobieraniem materiału do oznaczania aktywności AChE, średnia dobową aktywność motoryczną zwierząt hodowanych pojedynczo wahała się od 283 (klatka 1) do 3789 (klatka 3), a po przeliczeniu wszystkich trzech klatek wynosiła 318-320. U zwierząt hodowanych po 4 w grupie jest ona znacznie wyższa osiągając 4755 w okresie dopasowanym do 4828 ruchów w okresie $T = 24$ godz. Podobne różnice wykazują amplitudy rytmu. Dopasowany okres rytmu zwierząt pojedynczych jest na ogół krótszy od 24 godzin (z wyjątkiem klatki 3) lub, jak w wypadku 3 klatki, prawie dwukrotnie dłuższy. Uśredniony dopasowany okres dla zwierząt pojedynczych jest także krótszy od 24 godz. i wynosi $23,37 \pm 0,52$ godz., podczas gdy u zwierząt grupowych wynosi on $32,07 \pm 0,43$ godz. Szczyt aktywności, czyli akrofazy rytmów zwierząt pojedynczych wypada w godzinach 1-3 w nocy a po uśrednieniu o godzinie 1 w nocy, co zgadza się z akrofazą zwierząt grupowych dla okresu arbitralnego (24 godz.), natomiast nie jest zgodne w okresie dopasowanym dla tych zwierząt u których przypada na godz. 6 (tzw. pierwsza akrofaza dla tego okresu wynosi 32,07 godz.).

Z danych tych wynika, że u zwierząt hodowanych indywidualnie średnia aktywność i amplituda rytmu są mniejsze, a dopasowany okres rytmu krótszy w porównaniu z analogicznymi danymi dla zwierząt grupowych (tab. 1, fig. 1).

W następnych dwóch dniach, w których co 4 godziny pobierano materiał do pomiarów aktywności AChE u zwierząt hodowanych pojedynczo uległy obniżeniu o około 1/3 zarówno średnia dobową aktywność, jak i amplituda rytmu, a akrofaza rytmu przesunęła się ostatecznie na godzinę 23,34 (23,12), wahać się u poszczególnych osobników między godzinami 2 i 4 (tab. 1, fig. 2). U zwierząt grupowych zaś w tym samym czasie uległa obniżeniu prawie o połowę amplituda rytmu przy nie zmiennej średniej aktywności zwierząt, a akrofaza uległa prze-

sunięciu z godziny 1 na 23,52 wykazując duże odchylenie: -0,01 i +1,18.

Aktywność AChE tak w podwzgórzu, jak i w zakręcie obręczy wykazywała istotną rytmikę 24-godziną z akrofazami poprzedzającymi akrofazę rytmu motoryki tych zwierząt w podwzgórzu o około 4 godziny, a w zakręcie obręczy o wiele godzin.

Z powyższych danych wynika, że manipulacje związane z pobieraniem materiału (przenoszenie zwierząt z pomieszczenia hodowlanego i ich uśmiercanie) nie wpłynęły w tym wypadku istotnie na przebieg rytmu, ich aktywności motorycznej i aktywności AChE, zwłaszcza w podwzgórzu. Natomiast spłaszczenie sinusoidy wyrażającej rytm aktywności motorycznej zwierząt pojedynczych w wyniku mniejszej średniej aktywności dobowej i małej amplitudy rytmu w porównaniu z odpowiednimi danymi zwierząt grupowych wynika także z badań przeprowadzonych we wrześniu 1984 r., których wyniki ilustruje tabela 2 i figury 3 i 4. Z danych podanych w tej tabeli wynika również, że w 48-godzinnym okresie pobierania materiału wystąpiły znaczne zaburzenia rytmu, w wyniku których akrofazy motoryki zwierząt grupowych uległy przesunięciu z godziny 2,58 na godzinę 10,48 (o 8 godzin). Fakt ten znacznie podważa istotność akrofazy rytmu aktywności AChE, która w tym miesiącu przypada na godzinę 8.03 w podwzgórzu i 13.22 w zakręcie obręczy.

W badaniach przeprowadzonych w listopadzie 1984 r. wystąpiły jeszcze bardziej drastyczne różnice pomiędzy rytmiką aktywności motorycznej zwierząt pojedynczych i grupowych (tabela 3 i 4, fig. 5 i 6). Akrofazy rytmu aktywności motorycznej zwierząt pojedynczych, mierzone dwie doby przed doświadczeniem, są względem siebie różnie przesunięte, a akrofaza uśredniona wykazuje przesunięcie względem akrofazy zwierząt grupowych aż o 12 godzin (180°). Zatem i rytmy tych grup są względem siebie przesunięte (przesunięcie fazowe) o 12 godzin, czyli kąt przesunięcia rytmu wynosi 180° (fig. 5).

W okresie następnych dwóch dni, w których był pobierany materiał do oznaczania aktywności AChE, te różnice fazowe uległy znacznemu zmniejszeniu a obie akrofazy przypadają w ciemnym okresie doby (fig. 6). Rytmika aktywności AChE tak w podwzgórzu, jak i w zakręcie obręczy wyprzedza rytmikę motoryczną zwierząt o 4 godziny, tj. kąt przesunięcia fazowego wynosi 60° (przyjmując, że 24 godz. odpowiada 360°).

Z tabeli 5 wynika, że aktywność AChE badana u zwierząt grupowych w kwietniu 1984 r. w porównaniu z aktywnością tego enzymu występującą u zwierząt pojedynczych w kwietniu 1985 r. wykazuje tylko nieznaczne różnice pomiędzy średnimi dobowymi aktywności w podwzgórzu, natomiast nie wykazuje tych różnic w zakręcie obręczy. Występują nieco mniejsze amplitudy rytmu u zwierząt pojedynczych i pewne przesunięcia pomiędzy akrofazami rytmów. Rytm tego enzymu w podwzgórzu w obu wypadkach nie jest statystycznie istotny, przeciwnie w zakręcie obręczy, tam w obu wypadkach istotny rytm występuje.

Figura 7 przedstawia inny przykład dyspersji rytmu zwierząt pojedynczych. Rytmu tych zwierząt oznaczono kolejno cyframi od 1 do 6.

x oznacza uśredniony rytm wszystkich zwierząt pojedynczych, K oznacza rytm aktywności motorycznej zwierząt grupowych.

Zwierzęta o rytmach oznaczonych cyframi 1,2,3 i 6 cechuje podobny rytm aktywności motorycznej i ich akrofazy przypadają na ciemny okres doby. Ich amplitudy są różne. Natomiast osobnik 5 ma rytm przesunięty względem wymienionych zwierząt o 12 godzin (kąt 180°). Fakt ten nie wpłynął w sposób istotny na ich wspólny uśredniony rytm, ale gdyby tych osobników o innym rytmie było więcej niż jeden, to rytm albo uległby zmianie albo obliczenia nie wykazałyby w ogóle rytmu. Natomiast rytm zwierząt grupowych jest wyraźny.

Inne zjawisko przedstawia figura 8. Rytmika aktywności motorycznej zwierząt pojedynczych, uśredniona (krzywa x) i rytmika motoryczna zwierząt grupowych wykazują wzajemne

Tabela 1

Okołodobowa rytmika aktywności motorycznej zwierząt (myszy) hodowanych pojedynczo i po 4 osobniki w klatce oraz aktywności acetylocholinerazy (AChE) w miesiącu sierpnia 1984 r. Uwaga: we wszystkich miejscach pracy gdzie występują wartości czasowe, liczby po kropce dziesiętnej oznaczają minuty.

Sierpień 1984 r.

Grupy:	P	n	Mesor: M ± SE	Amplituda: A ± SE	Okres: $\bar{T} \pm SE$ lub T = 24	Akrofaza: $\bar{\theta}$ (w godz. 95% CL)
Kontrola:	0.05	1	283 ± 3	232 ± 4	22.55 ± 00.06	02.52 (-00.00 +00.09)
	0.05	1	343 ± 3	281 ± 4	24.00 —	02.31 (-00.00 +00.07)
Zwierzęta hodowane pojedynczo:	0.05	1	256 ± 3	247 ± 4	23.31 ± 00.07	02.52 (-00.00 +00.09)
	0.05	1	288 ± 3	275 ± 4	24.00 —	02.34 (-00.00 +00.08)
Klatki 1-3	0.05	1	3431 ± 33	1261 ± 41	43.54 ± 00.51	01.32 (-00.01 +00.42)
	0.05	1	3789 ± 33	1085 ± 43	24.00 —	01.29 (-00.03 +00.21)
Klatki 1-3	0.05	3	318 ± 29	262 ± 32	23.37 ± 00.52	01.34 (-00.16 +01.22)
	0.05	3	320 ± 28	264 ± 32	24.00 —	01.29 (-00.08 +01.19)
Zwierzęta hodowane po 4 w klatce:	0.05	4	4715 ± 75	1765 ± 104	32.07 ± 00.42	06.04 (-00.03 +00.55)
	0.05	4	4828 ± 72	1327 ± 102	24.00 —	01.42 (-00.03 +00.04)
Doświadczenia:	0.05	1	166 ± 2	190 ± 4	22.49 ± 00.06	02.50 (-00.00 +00.12)
	0.05	1	164 ± 3	177 ± 4	24.00 —	02.29 (-00.00 +00.12)
Zwierzęta hodowane pojedynczo:	0.05	1	174 ± 2	175 ± 4	23.38 ± 00.09	02.18 (-00.00 +00.13)
	0.05	1	178 ± 3	177 ± 4	24.00 —	02.14 (-00.00 +00.13)
Klatki 1-3	0.05	1	3121 ± 30	1283 ± 41	26.06 ± 00.15	04.41 (-00.03 +00.20)
	0.05	1	3117 ± 33	1277 ± 42	24.00 —	04.12 (-00.04 +00.18)
Klatki 1-3	0.05	3	230 ± 32	181 ± 32	14.10 ± 00.31	23.12 (-00.07 +01.12)
	0.05	3	145 ± 15	172 ± 24	24.00 —	22.54 (-00.07 +01.02)
Zwierzęta hodowane po 4 w klatce:	0.05	4	4746 ± 4	837 ± 105	21.36 ± 00.41	23.14 (-00.07 +01.12)
	0.05	4	4717 ± 2	755 ± 102	24.00 —	23.52 (-00.00 +01.18)
Aktywność acetylocholinerazy: w podwzgórzu:	0.05	91	10.39 ± 0.22	1.57 ± 0.37	20.57 ± 00.32	19.28 (-01.36 +02.59)
	0.05	91	10.30 ± 0.21	0.90 ± 0.27	24.00 —	19.34 (-03.16 +04.40)
w zakręcie obr.	0.05	91	2.34 ± 0.03	0.48 ± 0.05	32.47 ± 00.55	05.42 (-00.48 +01.20)
	0.05	91	2.26 ± 0.03	0.17 ± 0.04	24.00 —	10.01 (-01.46 +02.53)

Tabela 2

Okolodobowa rytmika aktywności motorycznej myszy hodowanych pojedynczo i po 4 osobniki w klatce oraz aktywności AChE w miesiacu wrzesniu 1984 r.

Wrzesień 1984 r.

Grupy:	P	n	Mesor: M ± SE	Amplituda: A ± SE	Okres T + SE lub T = 24	Akrofaza: A (w godz. 95% CL)
Kontrola: zwierzęta hodowane pojedynczo:	0.05	1	218 ± 3	172 ± 4	23.46 ± 00.10	01.12 (-00.00 +00.16)
	0.05	1	223 ± 3	175 ± 4	24.00	01.09 (-00.00 +00.14)
	0.05	1	496 ± 3	249 ± 4	19.02 ± 00.39	02.20 (-00.00 +00.08)
	0.05	1	609 ± 3	286 ± 4	24.00	00.22 (-00.00 +00.09)
	0.05	2	153 ± 5	147 ± 5	16.04 ± 00.08	18.24 (-00.06 +00.30)
	0.05	2	84 ± 1	92 ± 4	24.00	03.20 (-00.08 +00.26)
zwierzęta hodowane po 4 w klatce:	0.05	4	5676 ± 74	1184 ± 108	20.52 ± 00.21	04.01 (-00.33 +00.50)
	0.05	4	5642 ± 74	898 ± 102	24.00	02.58 (-00.22 +01.08)
	0.05	1	401 ± 2	219 ± 4	22.50 ± 00.06	03.42 (-00.01 +00.10)
	0.05	1	375 ± 3	187 ± 4	24.00	04.02 (-00.01 +00.12)
Dostawczalne: zwierzęta hodowane pojedynczo:	0.05	1	242 ± 3	286 ± 4	25.51 ± 00.15	11.38 (-00.01 +00.12)
	0.05	1	143 ± 3	224 ± 4	24.00	11.21 (-00.00 +00.10)
	0.05	2	184 ± 4	181 ± 5	20.54 ± 00.12	01.23 (-00.02 +00.19)
	0.05	2	167 ± 3	175 ± 1	24.00	01.22 (-00.01 +00.18)
	0.05	4	4944 ± 77	1044 ± 107	30.13 ± 01.12	09.38 (-01.00 +01.28)
	0.05	4	4762 ± 72	900 ± 102	24.00	10.48 (-00.06 +01.04)
Aktywność acetylocholinesterazy w podwzgórzu:	0.05	91	12.19 ± 0.27	1.92 ± 0.37	33.30 ± 01.48	05.35 (-02.23 +02.31)
	0.05	91	11.46 ± 0.21	0.57 ± 0.33	24.00	08.03 (-03.31 +04.40)
	0.05	91	2.77 ± 0.05	0.33 ± 0.06	20.08 ± 00.47	17.53 (-03.17 +01.56)
	0.05	91	2.77 ± 0.05	0.21 ± 0.07	24.00	13.37 (-01.12 +04.32)

Tabela 3
 Okołodobowa rytmika motoryczna myszy hodowanych pojedynczo i po 4 osobniki w klatce oraz aktywności AChE
 w listopadzie 1984 r.
 Listopad 1984 r.

Grupy:	P	n	Mesor: M ± SE	Amplituda: A ± SE	okres: $\bar{T} \pm SE$ lub I = 24	Akrofaza: \bar{A} (w godz. 95% CL)
Kontrola: zwierzęta hodowane pojedynczo:	0.05	1	3431 ± 45	1446 ± 61	26.37 ± 00.19	03.49 (-00.05 +00.27)
	0.05	1	3172 ± 50	1233 ± 64	24.00	04.01 (-00.07 +00.28)
	0.05	1	4543 ± 47	2061 ± 64	28.25 ± 00.17	04.56 (-00.03 +00.20)
	0.05	1	4299 ± 50	1812 ± 64	24.00	03.26 (-00.07 +00.34)
	0.05	1	3528 ± 52	737 ± 81	27.27 ± 00.58	06.53 (-00.06 +00.58)
Kl.4	0.05	1	4143 ± 50	1031 ± 65	24.00	03.26 (-00.07 +00.34)
	0.05	1	1164 ± 14	839 ± 20	25.18 ± 00.12	02.55 (-00.01 +00.15)
Kl.5	0.05	1	1063 ± 16	763 ± 21	24.00	03.07 (-00.01 +00.15)
	0.05	1	5913 ± 45	1141 ± 64	29.22 ± 00.29	05.01 (-00.14 +00.47)
Klatki 1 - 5	0.05	1	5577 ± 50	825 ± 61	24.06	07.23 (-00.24 +00.45)
	0.05	5	3057 ± 176	1515 ± 222	26.50 ± 00.25	06.03 (-03.08 +01.37)
zwierzęta hodowane po 4 w klatce:	0.05	5	2855 ± 155	1371 ± 212	24.00	05.44 (-04.15 +01.29)
	0.05	4	6271 ± 60	1736 ± 61	17.13 ± 00.13	18.48 (-00.11 +00.25)
	0.05	4	6774 ± 58	1230 ± 59	24.00	19.15 (-00.28 +00.46)

Tabela 4

Okołodobowa rytmika motoryczna myszy hodowanych pojedynczo i po 4 osobniki w klatce oraz aktywności AChE w listopadzie 1984 r.

L i s t o p a d 1 9 8 4 r. c i a g d a l s z y

Grupy:	P	n	Mesor: M ± SE	Amplituda: A ± SE	Okres: $\bar{T} \pm SE$ lub T = 24	Akrofaza: μ (w godz. 95% CL)	
Doświadczenia: zwierzęta hodowane pojedynczo:	0.05	1	4062 ± 43	1228 ± 62	24.28 ± 00.33	01.35 (-00.05 +00.58)	
	0.05	1	4317 ± 50	1500 ± 66	24.00	01.47 (-00.01 +00.23)	
	0.05	1	4927 ± 50	677 ± 62	23.07 ± 00.29	02.46 (-00.17 +01.04)	
	0.05	1	4838 ± 50	563 ± 66	24.00	02.32 (-00.14 +01.01)	
	0.05	1	3777 ± 50	1601 ± 63	20.41 ± 00.09	02.11 (-00.01 +00.20)	
	0.05	1	3510 ± 50	893 ± 66	24.00	00.38 (-00.00 +00.39)	
	0.05	1	1301 ± 14	1050 ± 20	22.29 ± 00.06	04.20 (-00.02 +00.11)	
	0.05	1	1421 ± 16	1011 ± 21	24.00	04.06 (-00.00 +00.11)	
	0.05	1	4814 ± 45	858 ± 64	35.34 ± 00.57	23.07 (-00.00 +01.00)	
	0.05	1	4910 ± 50	631 ± 65	24.00	00.00 (-00.00 +00.56)	
Klatki: 1 - 5	0.05	5	2499 ± 154	1187 ± 204	22.18 ± 00.49	03.31 (-01.47 +01.33)	
	0.05	5	2565 ± 147	1113 ± 143	24.00	03.17 (-01.16 +01.49)	
	0.05	4	4014 ± 75	858 ± 108	35.34 ± 01.35	23.08 (-00.03 +01.40)	
	0.05	4	4798 ± 72	528 ± 102	24.00	23.40 (-00.05 +01.53)	
Aktywność acetylocholinesterazy:							
	w podwzgórzu:	0.05	7	12.76 ± 0.23	2.69 ± 0.33	32.51 ± 02.11	13.16 (-02.20 +02.38)
		0.05	7	12.89 ± 0.23	2.11 ± 0.36	24.00	19.06 (-01.31 +02.04)
	w zakręcie obręczy:	0.05	7	2.77 ± 0.04	0.48 ± 0.06	32.25 ± 02.14	13.01 (-01.15 +01.59)
		0.05	7	2.80 ± 0.04	0.38 ± 0.06	24.00	18.58 (-06.14 +01.19)

Tabela 5

Okołodobowa rytmika aktywności AChE mierzona u myszy hodowanych pojedynczo i po 4 osobniki w klatce w kwietniu 1984 r. i u myszy hodowanych pojedynczo w klatce w kwietniu 1985 r. Hyp.- w podwzgórzu, G.c. - w zakręcie obręczy

Grupy:	P	n	Mesor: M ± SE	Amplituda: A ± SE	Okres: T ± SE lub T = 24	Akrofaza: φ (w godz. 95% CL)
K w i e c i e ń 1 9 8 4 r., w podwzgórzu: Aktywność acetylocholinestera- zy u myszy hodowanych po 4 w klatkach:	n.s.	91	15.63 ± 0.29	0.72 ± 0.37	25.45 ± 00.52	23.24 n.s.
	n.s.	91	15.68 ± 0.30	0.09 ± 0.48	24.00	20.26 n.s.
	0.05	91	4.40 ± 0.08	0.46 ± 0.11	19.46 ± 01.05	01.40(-01.54 +02.20)
	0.05	91	4.40 ± 0.36	0.36 ± 0.11	24.00	22.50(-00.07 +02.43)
K w i e c i e ń 1 9 8 5 r., w podwzgórzu: Aktywność acetylocholinestera- zy u myszy hodowanych pojedyn- czo:	0.05	91	14.42 ± 0.23	1.29 ± 0.34	18.10 ± 00.50	01.23(-00.47 +02.35)
	0.32	91	14.27 ± 0.22	0.57 ± 0.25	24.00	23.26(-01.21 +03.45)*
	0.05	91	4.20 ± 0.07	0.32 ± 0.09	29.25 ± 10.52	04.55(-06.30 +07.50)
	0.05	91	4.16 ± 0.05	0.28 ± 0.08	24.00	05.28(-04.50 +03.18)

* - poziom istotności 68%

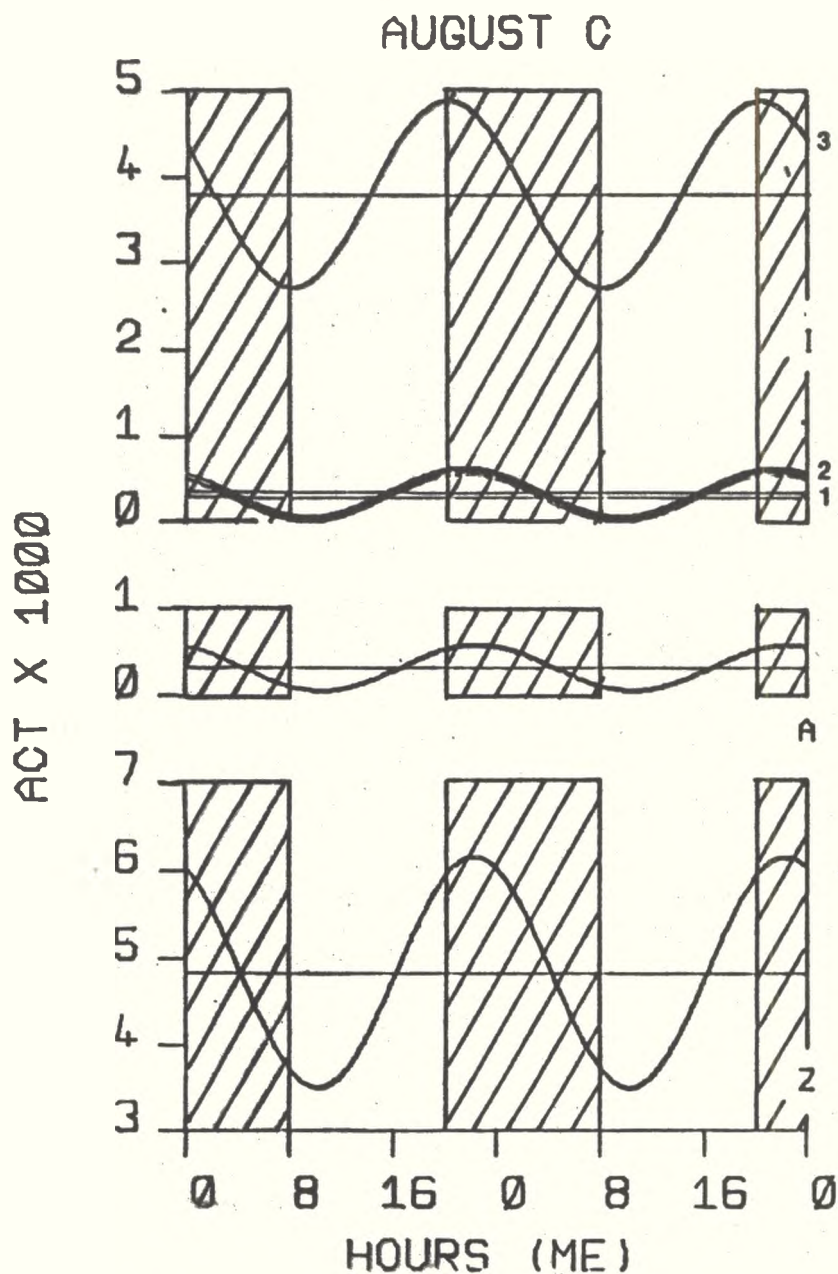


Fig. 1. 24-godsinny obraz rytmiki aktywności motorycznej myszy hodowanych pojedynczo i po 4 osobniki w klatce w sierpniu 1984 r. C - w okresie dwóch dób przed pobieraniem materiału, 1,2,3 - rytmika zwierząt pojedynczych, A - uśredniona rytmika zwierząt 1 - 3, Z - rytmika zwierząt grupowych (po 4 w klatce)

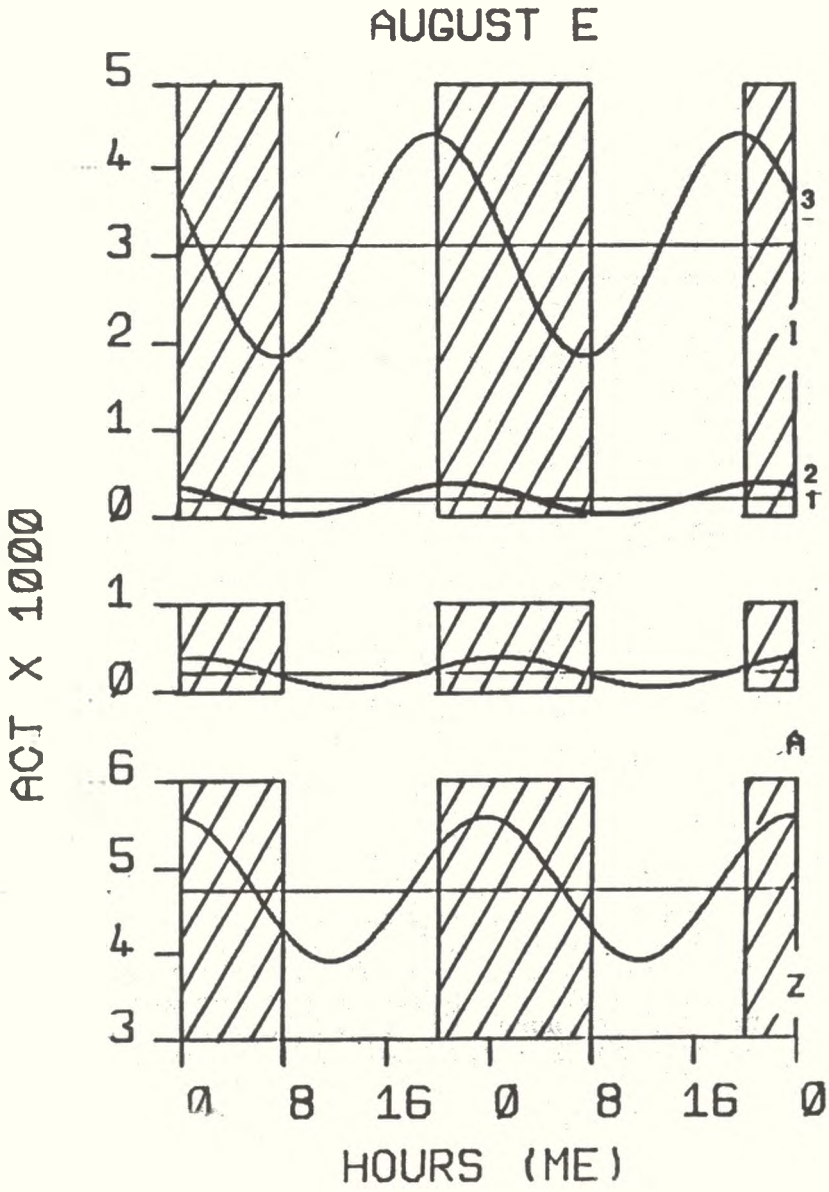


Fig. 2. Jak figura 1 z wyjątkiem: E - motoryka zwierząt w okresie pobierania materiału

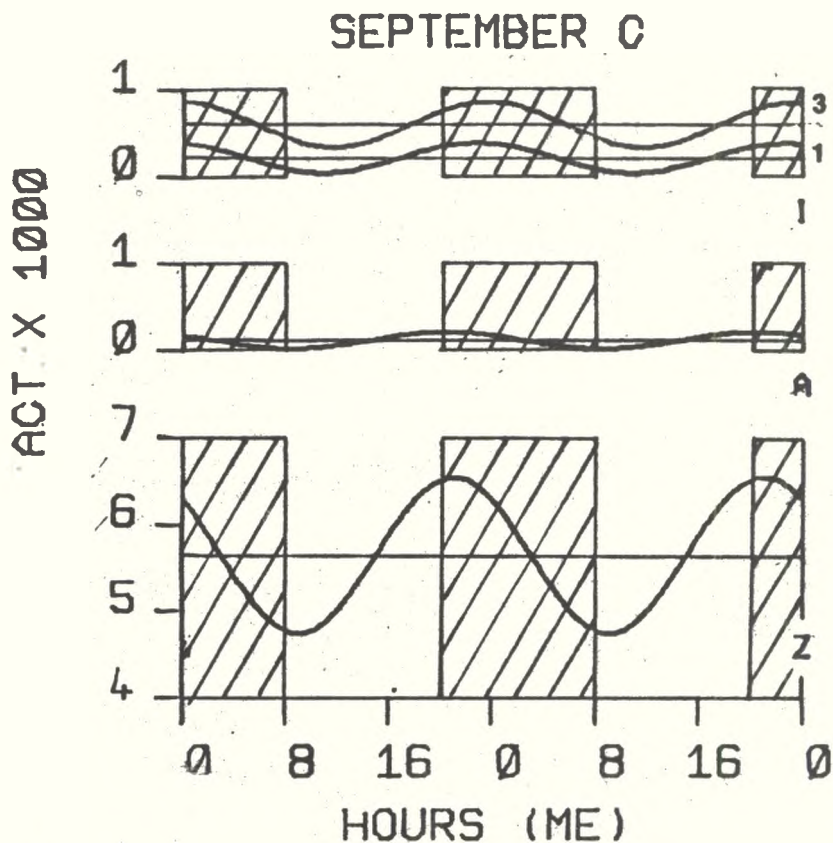


Fig. 3. 24-godzinny obraz rytmiki motorycznej myszy hodowanych pojedynczo i po 4 osobniki w klatce we wrześniu 1984 r. C - dwie doby przed pobraniem materiału, E - w okresie pobierania materiału, 1,3 - zwierzęta pojedyncze, A - uśredniony rytm zwierząt pojedynczych, Z - rytm zwierząt grupowych

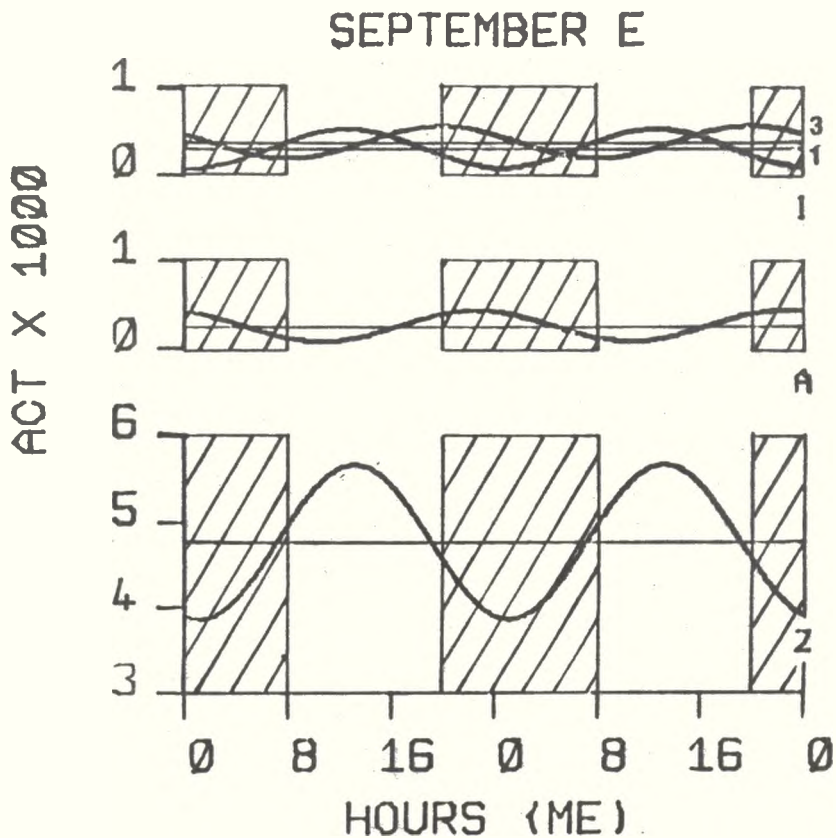
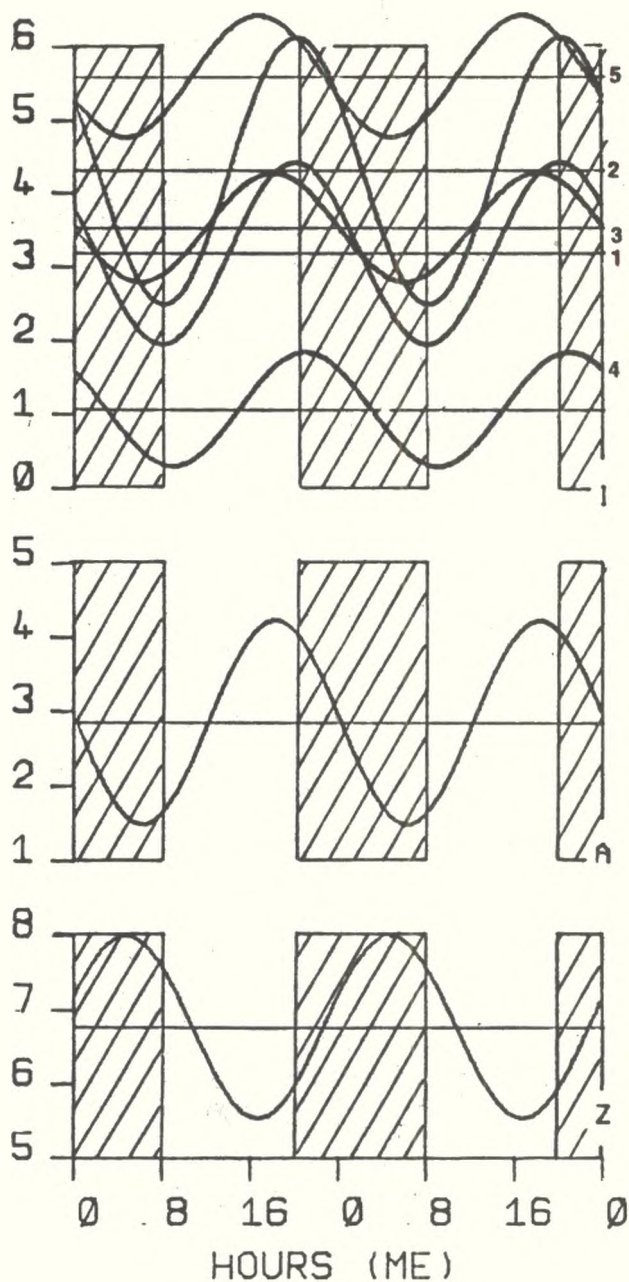


Fig. 4. 24-godzinny obraz rytmiki motorycznej myszy hodowanych pojedynczo i po 4 osobniki w klatce we wrześniu 1984 r. C - dwie doby przed pobraniem materiału, E - w okresie pobierania materiału, 1,3 - zwierzęta pojedyncze, A - uśredniony rytm zwierząt pojedynczych, Z - rytm zwierząt grupowych

Fig. 5. 24-godzinny rytm aktywności motorycznej myszy hodowanych pojedynczo i po 4 osobniki w klatce w listopadzie 1964 r. C - rytmika myszy w okresie dwóch dob przed pobraniem materiału, E - rytmika w okresie pobierania materiału, 1, 2, 3, 4, 5 - rytmika myszy pojedynczych z zaznaczającą się wyraźną dyspersją rytmu w postaci wzajemnych przesunięć fazowych rytmów, A - uśredniona rytmika myszy pojedynczych, Z - rytmika myszy grupowych

Uwaga: Po lewej stronie wykresów figur od 1 do 6 skróć ACT x 1000 oznacza powiększoną o 1000 odpowiednią liczbę skali aktywności

ACT X 1000

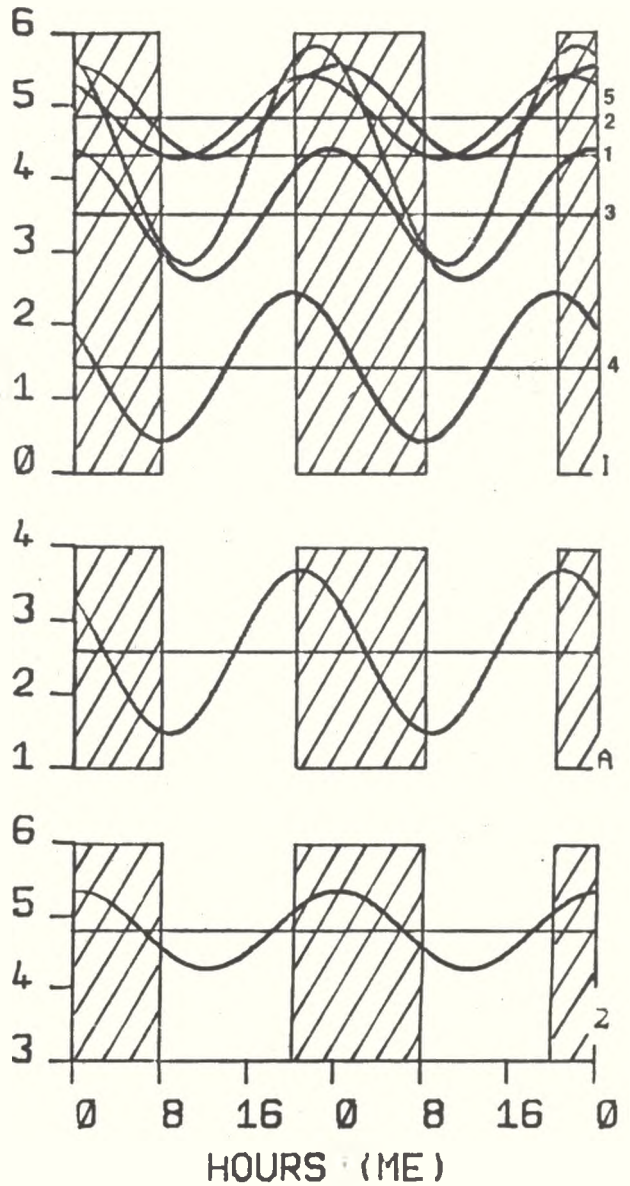


NOVEMBER E

Fig. 6. 24-godzinny rytm aktywności motorycznej myszy hodo-
wanych pojedynczo i po 4 osobniki w klatce w listo-
padzie 1984 r. C - rytmika myszy w okresie dwóch
dob przed pobraniem materiału, E - rytmika w okre-
sie pobierania materiału, 1,2,3,4,5 - rytmika myszy
pojedynczych z zaznaczającą się wyraźną dyspersją
rytmu w postaci wzajemnych przesunięć fazowych ryt-
mów, A - uśredniona rytmika myszy pojedynczych,
Z - rytmika myszy grupowych

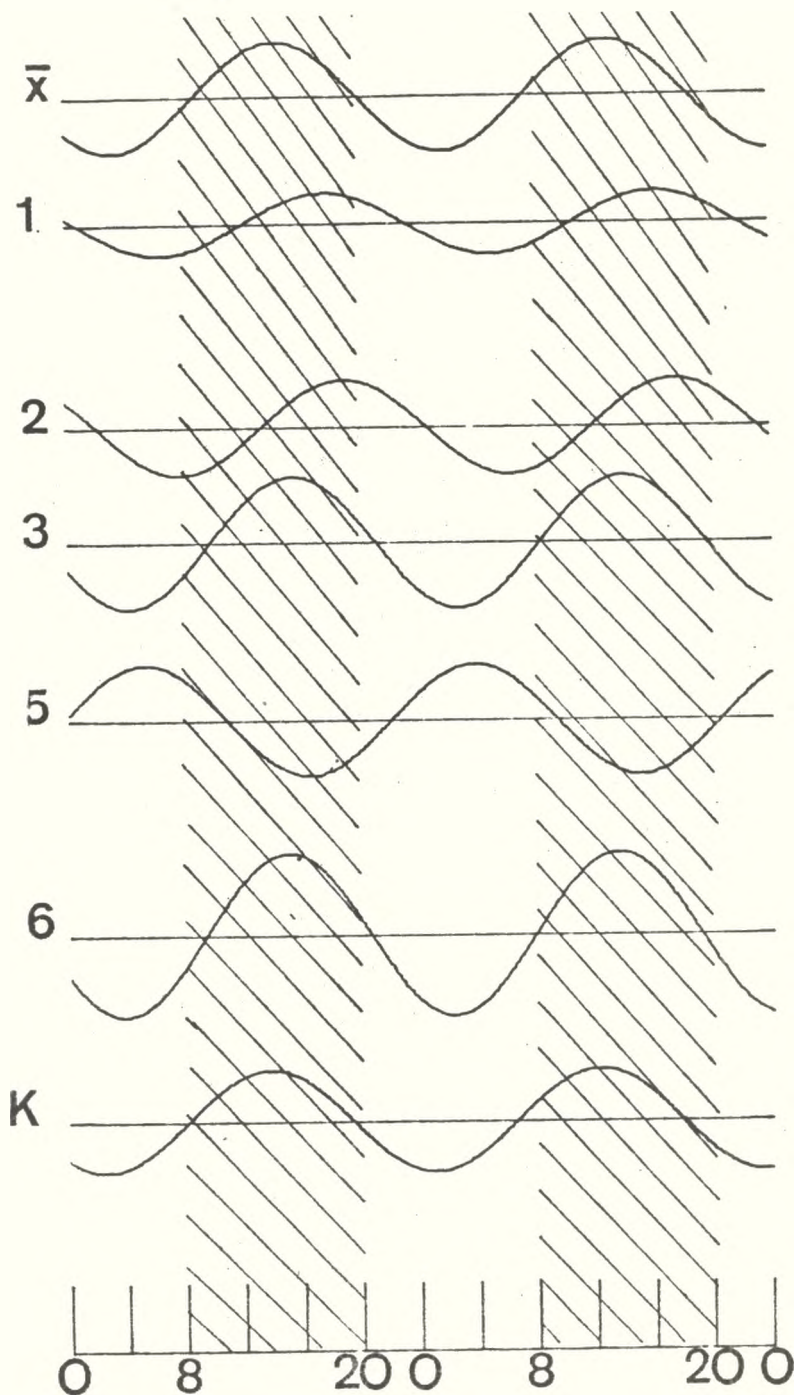
Uwaga: Po lewej stronie wykresów figur od 1 do 6 skrót
ACT x 1000 oznacza powiększoną o 1000 odpowiednią
liczbę skali aktywności

ACT X 1000



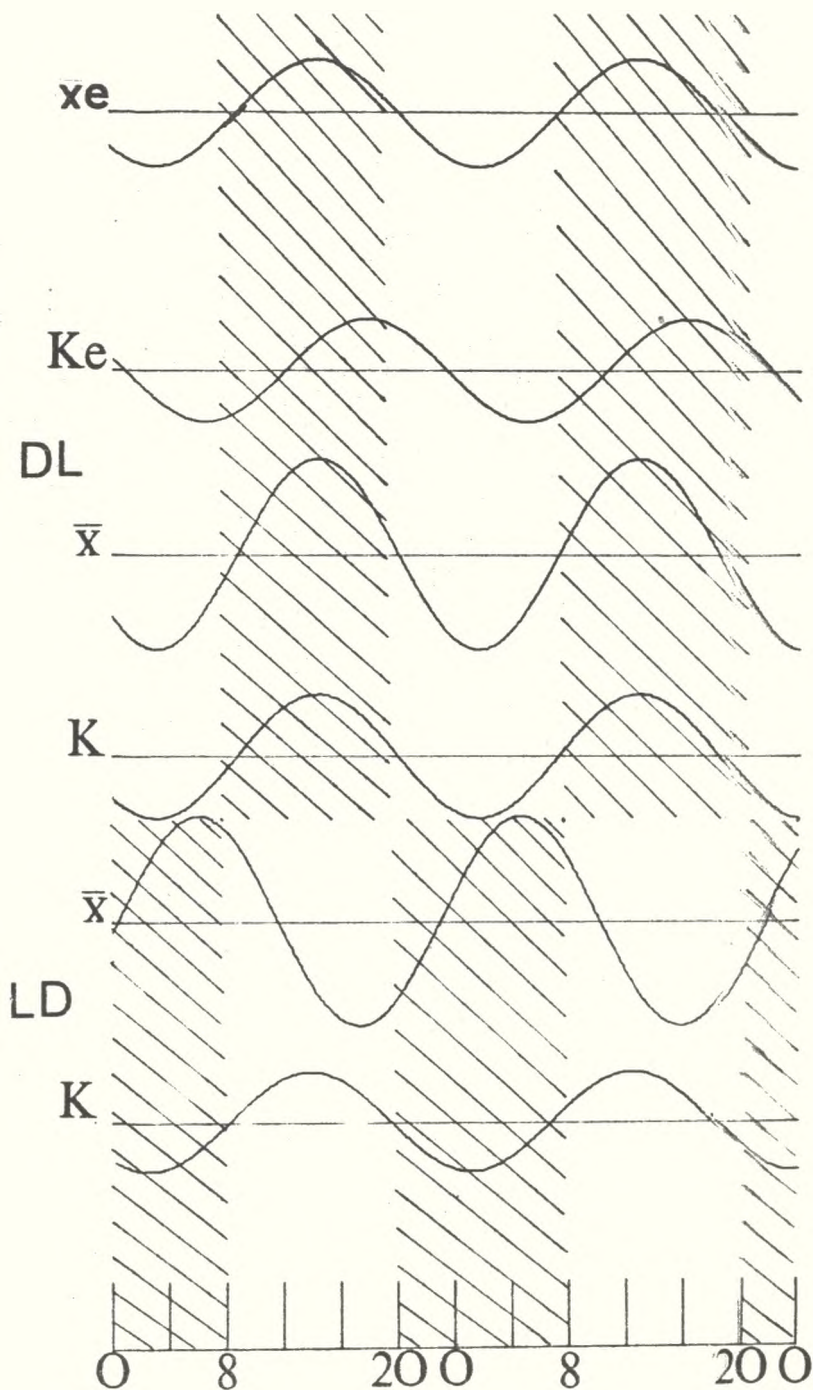
AKTYWNOŚĆ MOTOR.

Fig. 7. 24-godzinny obraz rytmu aktywności motorycznej zwierząt hodowanych pojedynczo i po 4 osobniki w klatce: 1, 2, 3, 5, 6 - rytmika zwierząt pojedynczych, osobnik płątyma odwróconą fazę rytmu (o 180° = 12 godz.), x - uśredniona rytmika zwierząt pojedynczych, K - rytmika zwierząt grupowych



AKTYWNOŚĆ MOTOR.

Fig. 8. 24-godzinny rytm aktywności motorycznej zwierząt hodowanych pojedynczo i po 4 osobniki w klatce w warunkach LD i po odwróceniu na DL. K - rytmika zwierząt grupowych, \bar{x} - uśredniona rytmika zwierząt pojedynczych dwie doby przed pobieraniem materiału, Ke - rytmika zwierząt grupowych i \bar{x} - pojedynczych w czasie pobierania materiału



DNI 24.06 - 8.07

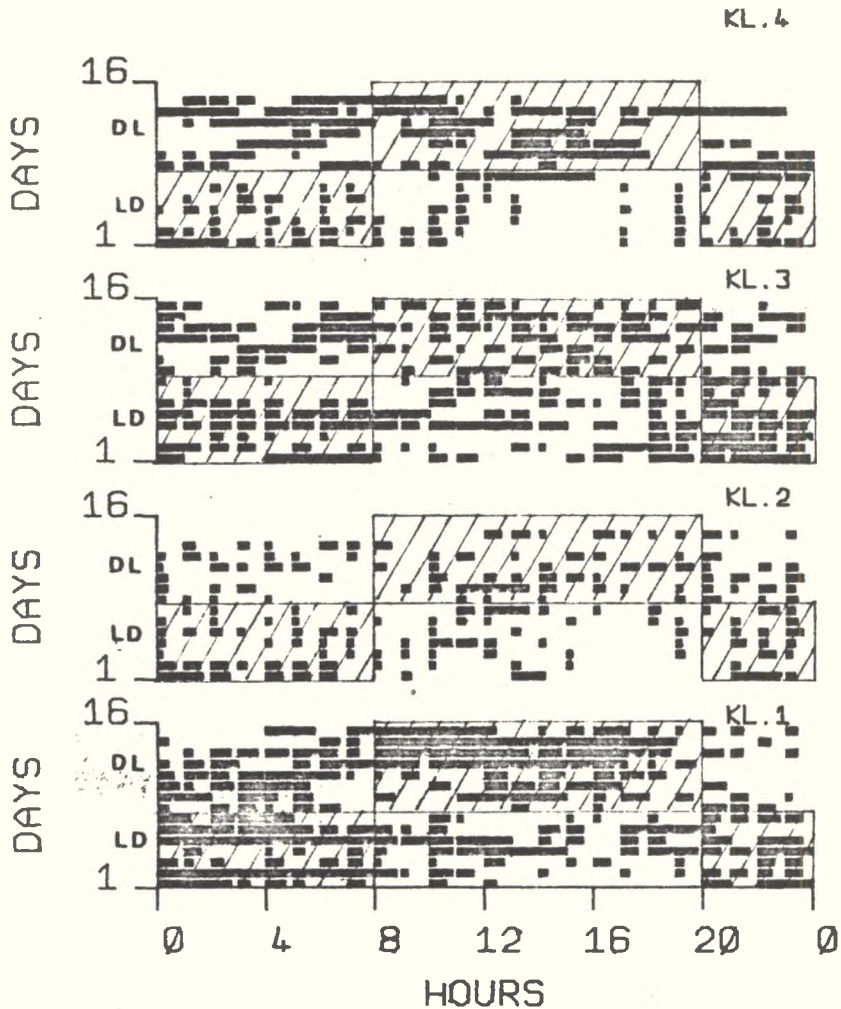


Fig. 9. Aktogramy przedstawiające rytmikę aktywności lokomotorycznej zwierząt hodowanych po 2 osobniki w klatce: Kl. 1,2,3,4 i po jednej myszy w klatce: Kl. 7,8,9,11 licząc od dołu każdego aktogramu 8 dni w warunkach LD 12:12 i 8 dni po odwróceniu na DL. W niektórych dniach w klatkach 2,4,8,9 i 11 zaznacza się wyraźna dysocjacja rytmu

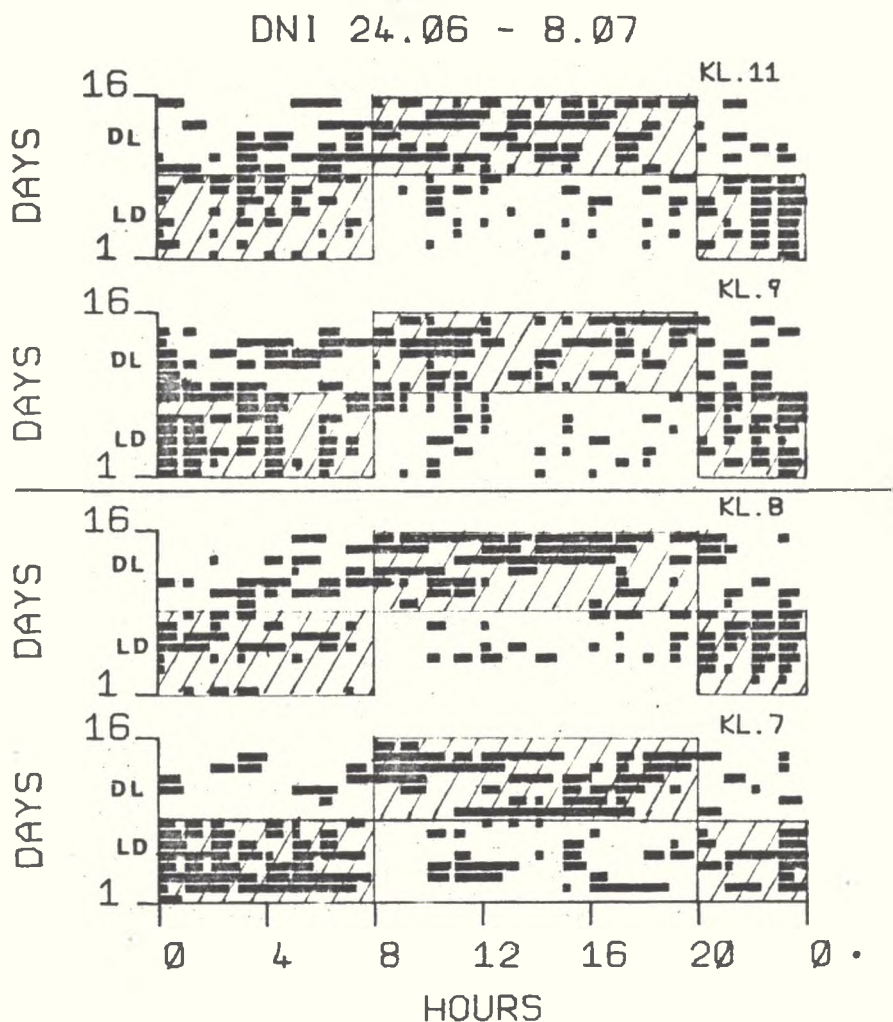


Fig. 10. Aktogramy przedstawiające rytmikę aktywności lokomotorycznej zwierząt hodowanych po 2 osobniki w klatce: Kl. 1,2,3,4 i po jednej myszy w klatce; Kl. 7,8,9,11 licząc od dołu każdego aktogramu 8 dni w warunkach LD 12:12 i 8 dni po odwróceniu na DL. W niektórych dniach w klatkach 2,4,8,9 i 11 zaznacza się wyraźna dysocjacja rytmu

przesunięcia fazowe o około 12 godz. (tj. 180°). Po odwróceniu światła i ciemności na DL (o 180°) w dwie doby przed pobieraniem materiału oba rytmy K i x są podobne, w następnych 48 godzinach, w czasie pobierania materiału - rytmy Ke i xe zostały nieco zmienione: zmniejszyła się amplituda rytmu i średnie aktywności dobowe, a akrofaza rytmu zwierząt grupowych przesunęła się na koniec okresu ciemnego doby przy zachowanym podobieństwie obu przebiegów. Wynika z tego, że zarówno zwierzęta pojedyncze, jak i grupowe zsynchronizowały swój rytm z nowym dawcą czasu (DL).

Figury 9 i 10 przedstawiają komputerowe aktogramy rytmiki motorycznej myszy hodowanych po dwie w klatce z bieżnią kołową (klatki 1,2,3 i 4) i po jednym osobniku w klatce (klatki 7,8,9 i 11), w warunkach LD 12:12 przez 4 tygodnie i w warunkach odwróconego światła DL 12:12 przez następne 2 tygodnie. Aktogramy obejmują wycinek 7 dni przed odwróceniem światła - licząc od dołu - i 8 dni po odwróceniu na DL. Jak już wspomniano, klatki ze zwierzętami były umieszczone w pomieszczeniu nie izolowanym akustycznie, oddzielonym od korytarza zwykłymi drzwiami. Pozostałe warunki hodowli były takie same jak w grupach opisanych powyżej. Mimo że na niektórych aktogramach występuje wyraźna synchronizacja z nowym dawcą czasu (DL), to jednak mają też miejsce wyraźne zakłócenia rytmu wywołane dodatkowymi czynnikami wynikłymi z braku izolacji. Szczególnie istotne zakłócenia pojawiły się w okresie jasnym doby fizycznej. W rytmice zwierząt hodowanych w klatkach 2,4,7,8 i 11 obserwuje się tak zwane zjawisko dysocjacji aktywności lokomotorycznej przejawiające się jej rozczłonkowaniem na małe fragmenty w okresie całej doby. U zwierząt hodowanych pojedynczo zjawisko to jest bardziej wyraźne (fig. 9 i 10, klatki 7,8 i 11).

DYSKUSJA

Jak już zaznaczono na wstępie, szereg badań rytmiki procesów fizjologicznych zachodzących w organizmie wymaga uśmiercania pewnej liczby zwierząt w pewnych odstępach czasu w okresie obejmującym przynajmniej dwie doby, tj. dwa fizyczne cykle dobowe, powtarzające się po sobie. Ze średnich wartości uzyskanych z pobranych prób w poszczególnych godzinach następujących po sobie dób, wnioskuje się o obecności lub braku rytmiki danego fizjologicznego procesu. Zostało wykazane (Pohl i Gibbs, 1978), że rytm aktywności N-acetylotransferazy (NAT) szyszynki szczurów wykazuje wyraźne maksimum o północy. Maksimum to zanika, a aktywność tego enzymu staje się nierytmiczna u szczurów oślepionych. Jeżeli jednak przy pobieraniu materiału uwzględni się - u oślepionych szczurów - ich indywidualny rytm aktywności i spoczynku, to znaczy uwzględni się tzw. subiektywny czas każdego zwierzęcia, to rytm aktywności NAT pojawi się ponownie. Zatem autorzy ci uzyskali także po oślepieniu szczurów wyraźny okołodobowy rytm aktywności NAT, gdy pomiary aktywności skorelowali z cyklem aktywności i spoczynku tych zwierząt.

Moore-Ede i wsp. (1982) przytaczając ten przykład zwracają uwagę na fakt, że zwierzęta, które przechodzą z warunków LD do warunków stałych DD lub LL (stała ciemność lub stała jasność) ujawniają swój własny, endogeny indywidualny rytm aktywności i spoczynku, zwany rytmem spontanicznym (free-running) lub dosłownie rytmem wolno biegnącym. Okres tego rytmu może być u poszczególnych zwierząt nieco inny, mimo że zawsze będzie zbliżony do 24 godzin (rytm circadian okołodobowy). Im później pobierze się materiał od takich zwierząt, mierząc od momentu przeniesienia zwierząt ze stanu LD w warunki DD lub LL, tym większej dyspersji mogą ulec względem siebie wolno biegnące rytmy poszczególnych osobników. Zdaniem przytoczonych autorów, badania takie należy wykonywać w możliwie najkrótszym czasie od zmiany warunków

z LD na DD lub LL. Sugerują oni, że tak zwanym "rytmem markerowym" jest właśnie rytm aktywności i spoczynku zwierząt i do niego należy odnosić wyniki innych badań. Rytm ten bowiem jest mocno sprzężony z wewnętrznym miernikiem czasu, tzw. zegarem biologicznym.

W omawianych wynikach tej pracy przedstawiono przykłady podobnej dyspersji rytmu lokomotorycznego i motorycznego, lecz nie wolno biegnącego ale zsynchronizowanego z zewnętrznym dawcą czasu w warunkach LD lub zmiany warunków oświetlenia na DL (fig. 5,6,7,8,9 i 10).

Pittendrigh (1965) wyraźnie stwierdza, że "jakaś zewnętrzna periodyczność" o okresie T "może zsynchronizować (entrain) samoczynny oscylator" z okresem τ "tylko wtedy, gdy T i τ są w przybliżeniu takie same". Innymi słowy, istnieją ścisłe granice poza którymi oscylacja nie może być zsynchronizowana przez jakiś zewnętrzny cykl. Biologicznie istotne cechy zjawiska synchronizacji, wiążące się z kontrolą rytmów okołodobowych poprzez okresowość (periodyczność) środowiska zewnętrznego są dwojakie:

- 1) kontrolujące wrodzony okres okołodobowy w odniesieniu do precyzyjności okresu środowiska,
- 2) ustalające odpowiedni stosunek fazowy pomiędzy oscylacją wrodzoną organizmu a okresowością zmiany środowiska.

Inaczej mówiąc, pomiędzy rytmiką danego zwierzęcia a dawcą czasu środowiska ustala się w czasie synchronizacji pewien określony, stały stosunek fazowy, przy tym okres T musi być zbliżony do τ (czyli okresu wewnętrznego, endogenego zegara organizmu). T równy 24 godzinom, a więc okres reprezentujący na ziemi dobę fizyczną, spełnia te warunki, gdyż okres endogeny τ tzw. zegara biologicznego jest tylko zbliżony do 24 godzin i jest zazwyczaj nieco krótszy lub dłuższy od doby fizycznej ($\tau = 24 \pm 4$ godz.), (Halberg i wsp., 1977).

Ponieważ w niniejszej pracy warunki te zostały spełnione ($T = 24$ godzin i LD 12:12), nie ma więc podstaw twierdzić,

że synchronizacja (entrainment) badanych zwierząt odbywała się w sposób nieprawidłowy. Intensywność światła w okresie jasnym doby wynosiła 200-250 lx pod źródłem światła i 20-25 lx nad powierzchnią klatek, światło było rozproszone po całym pomieszczeniu równomiernie, zatem i w tym wypadku nie można dopatrywać się przyczyny indywidualnej zmienności rytmu.

Szereg badań nad rytmiką biologiczną dotyczy różnic międzygatunkowych czy nawet międzyszczepowych, zwłaszcza dotyczących synchronizacji (entrainment) rytmu spontanicznego z dawcą czasu. Prace (Oliverio i Malorni, 1979; Ebihara i Tsuji, 1980; Connolly i Lynch, 1981; Buttner i Wollnik, 1984; Castellano i wsp., 1985) podkreślają, że w badaniach, podczas których konieczne jest zabijanie pewnej liczby zwierząt w określonych odstępach czasu należy liczyć się nie tylko z możliwością występowania różnic międzygatunkowych czy międzyszczepowych, ale i różnic między osobnikami. Stwierdzają to również Moore-Ede i wsp. (1982).

Quay i wsp. (1971) badali występowanie rytmiki 24-godzinnej aktywności AChE w różnych okolicach mózgu szczurów hodowanych pojedynczo lub po dwa osobniki w klatce. Autorzy stwierdzili, że tylko u szczurów hodowanych po dwa osobniki w klatce wystąpił wyraźny, 24-godzinny rytm aktywności AChE i to tylko w podwzgórzu i mózdzku. U zwierząt hodowanych pojedynczo nie stwierdzono rytmu aktywności tego enzymu w żadnej przebadanej okolicy mózgu. W dyskusji autorzy sugerują, że pewne istotne systemy metaboliczne mózgu wykazują tylko nieznaczną - jeżeli w ogóle wykazują - 24-godzinną rytmikę. Tak więc neurochemiczny lub też neurometaboliczny 24-godzinny rytm może być bardziej charakterystyczny lub mieć większą amplitudę tylko w pewnych systemach centralnych enzymów.

Wood i Rose (1979) natomiast, badając zmiany aktywności AChE w obszarach kory motorycznej i wzrokowej szczurów hodowanych po 4-8 osobników w klatce i odnosząc je do aktywności motorycznej tych zwierząt doszli do wniosku, że wyniki ich

badania wskazują wyraźnie na ścisłą zależność pomiędzy aktywnością AChE w korze motorycznej i ich ogólną motoryczną aktywnością, co uwidacznia się szczególnie w warunkach stałej ciemności (DD). Brak tej ścisłej korelacji w warunkach LD autorzy tłumaczą zwiększoną w tych warunkach liczbą czynników środowiskowych pobudzających zwierzęta. Są oni również zdania, że błąd Quaya i wsp. (1971) polegał na tym, że nie brali pod uwagę specyfiki rytmów poszczególnych obszarów kory mózgowej, a ponadto brak tej rytmiki wystąpił tylko u zwierząt hodowanych pojedynczo w klatce.

Gdyby Quay i wsp. odnosili rytmikę tego enzymu do aktywności motorycznej badanych zwierząt, zauważyliby wyraźne zjawisko dyspersji tych rytmów, które może być przyczyną zatarcia się rytmu w badaniach enzymatycznych, jak wynika to z przedstawionego w tej pracy materiału. Na poparcie tego wniosku warto jeszcze przytoczyć badania McKinneya (1970): Stwierdził on, że demedullacja nadnerczy prowadzi do obniżenia aktywności AChE u szczurów hodowanych pojedynczo i do wzrostu jej aktywności u szczurów hodowanych grupowo. Chroniczne podawanie dibenzyliny (phenoxybenzamine hydrochloride) redukuje poziom AChE w mózgu u szczurów hodowanych pojedynczo a nie redukuje go w hodowlach grupowych. Interesujące badania (Gentsch i wsp., 1981 a, b i c; 1982 a i b) dotyczące porównawczych badań behawioru szczurów hodowanych pojedynczo i grupowo oraz wpływu różnych czynników środowiskowych na ich rytm okołodobowy dostarczyły wiele interesujących i ważnych wniosków. Wykazali oni, że szczury hodowane pojedynczo wykazują wzrost aktywności lokomotorycznej w teście otwartego pola. Aktywność spontaniczna (podstawowa) szczurów hodowanych pojedynczo ma tendencję do redukcji aktywności. Pojedynczo hodowane zwierzęta mają także uboższą zdolność do adaptacji, jednakże po 24 godzinach różnice między zwierzętami pojedynczymi a grupowymi znikają. Autorzy jednak konkludują, że wszystkie przez nich przebadane różnice behawioralne pomiędzy zwierzętami pojedynczymi i grupowymi wyka-

zują podobieństwo we wszystkich punktach czasowych cyklu LD 12:12.

Aschoff (1979) w pracy na temat wpływu czynników zewnętrznych i wewnętrznych na okres mierzony w stałych warunkach (otoczenia) podaje między innymi, że wielkość grupy (liczebność) także wpływa na obraz synchronizacji rytmu okołodobowego, szczególnie na amplitudę rytmu zarówno u zwierząt bezkręgowych, jak i u kręgowców. Natomiast, jak wynika to z nielicznych danych, zwierzęta hodowane pojedynczo mogą wykazywać dłuższy okres rytmu spontanicznego (wolno biegnącego) niż zwierzęta grupowe.

Z przytoczonych wypowiedzi różnych autorów stwierdzić można, iż niewiele jest jednak informacji na temat przebiegu i obrazu rytmiki 24-godzinnej u zwierząt hodowanych pojedynczo i grupowo w warunkach LD. Jedynie prace Quaya i wsp. (1971) oraz Wooda i Rose (1979) rozważają ten problem. Wynika z nich niedwuznacznie, że u zwierząt hodowanych pojedynczo, rytmiczne zmiany aktywności, w tym wypadku AChE, mogą pozostać nie ujawnione, podczas gdy u zwierząt grupowych ujawniają się one niemal zawsze.

Z przedstawionych w niniejszej pracy wyników nasuwają się podobne wnioski. Wykazująca poważną dyspersję indywidualna aktywność motoryczna zwierząt hodowanych pojedynczo może albo sumarycznie dać błędny obraz rytmu lub go wcale nie wykazać (fig. 1,2,3,4,5 i 6). Natomiast rytm aktywności motorycznej zwierząt grupowych nawet w pewnym sensie zaburzony interwencją eksperymentatora w czasie pobierania materiału, zachowuje zwykle prawidłowy obraz, do którego można odnieść uzyskane wyniki pomiarów biochemicznych. Jednakże sama procedura pobierania materiału może być również przyczyną błędu. Calvano i Reynolds (1984) badali wpływ procedury metodycznej na okołodobowe fluktuacje kortykoidów osocza, CBG - globuliny (transkortyny) oraz białka całkowitego osocza. Metoda pobierania materiału polegała na seryjnym, co 6 godzin przez dwie doby, pobieraniu krwi z ogonów

szczurów. Zwierzęta były hodowane pojedynczo w klatkach, część z nich w klatkach z bieżnią kołową, w celu równoległego prowadzenia pomiarów aktywności lokomotorycznej. Wyniki uzyskane w tych doświadczeniach wskazują, że mimo iż 24-godzinna rytmika poziomu kortykoidów osocza wykazała typowy przebieg dla tych zwierząt (szczurów), z wyraźnym minimum o godzinie 6 i maksimum o 18 (początek ciemnej fazy), to obraz tego rytmu u osobników pojedynczych wykazywał znaczne różnice, a 4 z 10 szczurów wykazało rytm nietypowy. Autorzy początkowo tę nietypowość przypisywali przypadkom rozprzężenia rytmu spowodowanego procedurą pobierania materiału do badań. Hipotezę tę poparły równolegle przeprowadzone badania rytmiki aktywności lokomotorycznej. Okazało się, że w okresie 48 godzin pobierania materiału aktywność lokomotoryczna spadła o 50% w ciągu doby. Jednak największa aktywność przypadała na godziny nocne. Autorzy przestrzegają, że należy dokładnie zbadać, jak sama procedura pobierania materiału wpływa na rozprzężenie rytmu lokomotorycznego; szczególnie ważne jest wyjmowanie zwierząt z klatek, zwłaszcza w ich nieaktywnej fazie rytmu.

Są nieliczne fakty, które w badaniach biochemicznych rytmów zwróciły uwagę z jednej strony na liczebność zwierząt hodowanych w klatce, z drugiej - na wpływ samej procedury pobierania materiału na końcowe wyniki badań. Zarówno przedyskutowane w tej pracy badania innych autorów, jak i wyniki własne sugerują następujące wnioski:

Przy zachowaniu wszystkich, gwarantujących stałość środowiska warunków w pomieszczeniu hodowlanym i ograniczeniu procedury pobierania materiału tylko do niezbędnych i możliwie najmniej zakłócających rytmikę zwierząt czynności, należy badania przeprowadzać na zwierzętach hodowanych w niewielkich grupach i równolegle kontrolować ich rytmikę lokomotoryczną. Socjalne warunki zwierząt hodowanych grupowo wpływają resynchronizująco. Ustalić należy wspólny rytm określony dla wszystkich zwierząt, hodowanych w jednej grupie.

Jeżeli doświadczenia wymagają pojedynczej hodowli zwierząt, niezbędna jest kontrola rytmiki lokomotorycznej prowadzona równolegle, a pobieranie materiału badawczego należy zsynchronizować z indywidualną rytmiką każdego zwierzęcia.

LITERATURA

1. Aschoff J., 1954, Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik, *Naturwissenschaften*, 41, 44-56.
2. Aschoff J., 1979, Circadian Rhythms: Influences of Internal and External Factors on the Period Measured in Constant Conditions, *Z. Tierpsychol.*, 49, 225-249.
3. Aschoff J., Pohl H., 1978, Phase Relations between Circadian Rhythm and Its Zeitgeber within the Range of Entrainment, *Naturwissenschaften*, 65, 80-84.
4. Buttner D., Wollnik F., 1984, Strain-Differentiated Circadian and Ultradian Rhythms in Locomotor Activity of the Laboratory Rat, *Behavior Genetics*, 14, 137-151.
5. Calvand S.E., Reynolds R.W., 1984, Circadian Fluctuations in Plasma Corticosterone, Corticosterone-Binding Activity and Total Protein in Male Rats: Possible Disruption by Serial Blood Sampling, *Endocrine Res.*, 10, 11-25.
6. Castellano C., Puglisi-Allegra S., Renzi P., Oliverio A., 1985, Genetic Differences in Daily Rhythms of Pain Sensitivity in Mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 23, 91-92.
7. Connolly M.S., Lynch C.B., 1981, Circadian Variation of Strain Differences in Body Temperature and Activity in Mice, *Physiol. Behav.*, 27, 1045-1049.
8. Ebihara S., Tsuji K., 1980, Entrainment of the Circadian Activity Rhythm to the Light Cycle: Effective Light Intensity for a Zeitgeber in the Retinal Degenerate C3H Mouse and the Normal C57BL Mouse, *Physiol. Behav.*, 24, 523-527.
9. Ellman G.L., Courtney K.D., Anders V., Feartherstone R.M., 1961, A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity, *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95.

10. Forsythe G.W., Malcolm M.A., Moler C.B., 1977, Computer Methods for Mathematical Computations, Englewood Cliffs, N.Y. 192-239.
11. Gander P.H., Lewis R.D., 1983, Phase-Resetting Action of Light on the Circadian Activity Rhythm of *Rattus Exulans*, *Am. J. Physiol.*, 245 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 4), R10-R17.
12. Gentsch C., Lichtsteiner M., Feer H., 1981a, Individual Housing of Rats Causes Divergent Changes in Spontaneous and Reactive Activity, *Experientia*, 37, 61-62.
13. Gentsch C., Lichtsteiner M., Feer H., 1981b, Locomotor Activity, Defecation Score and Corticosterone Levels During an Openfield Exposure: a Comparison Among Individual and Group-housed Rats and Genetically Selected Rat Lines. *Physiol. Behav.*, 27, 183-186.
14. Gentsch C., Lichtsteiner M., Feer H., 1981 c, Taste Neophobia in Individually and Socially Reared Male Rats, *Physiol. Behav.*, 27, 199-202.
15. Gentsch C., Lichtsteiner M., Feer H., 1982a, Different Reaction Patterns in Individually and Socially Reared Rats During Exposure to Novel Environments, *Behav. Brain Res.*, 4, 45-54.
16. Gentsch C., Lichtsteiner M., Feer H., 1982b, Behavioral Comparison between Individually-and-Group-housed Male Rats: Effects of Novel Environments and Diurnal Rhythm, *Behav. Brain Res.*, 6, 93-100.
17. Halberg F., Charandente F., Cornelissen G., Katinas G.S., 1977, Glossary of Chronobiology, *Chronobiologia* IV-Suppl. 1.
18. McKinney T.D., 1970, Brain Cholinesterase in Grouped and Singly Caged Adrenal-demedullated Rats, *Am. J. Physiol.*, 219, 331-334.
19. Moore-Ede M.C., Sulzman F.M., Filler C.A., 1982, *The Clocks That Time Us*, Harvard University Press, Cambridge, Mass. and London, England, pp. 448.

20. Nelson W., Tong Y.L., Lee J.K., Halberg F., 1979, Methods for Cosinor Rhythmometry, *Chronobiologia*, VI, 305-323.
21. Oliverio A., Malorni W., 1979, Wheel Running and Sleep in Two Strains of Mice: Plasticity and Rigidity in the Expression of Circadian Rhythmicity, *Brain Res.*, 163, 121-133.
22. Pittendrigh C.S., 1965, On the Mechanism of the Entrainment of a Circadian Rhythm by Light Cycles, in: Aschoff J., *Circadian Clocks*, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 277-297.
23. Pittendrigh C.S., Daan S., 1976, A Functional Analysis of Circadian Pacemakers in Nocturnal Rodents, I. The Stability and Lability of Spontaneous Frequency, *J. Comp. Physiol.*, 106, 223-252.
24. Pohl H., 1983, Light Pulses Entrain the Circadian Activity Rhythm of Diurnal Rodent (*Ammospermophilus leucurus*), *Comp. Biochem. Physiol.*, 76b, 723-729.
25. Pohl C.R., Gibbs F.P., 1978, Circadian Rhythms in blinded Rats: Correlation between Pineal and Activity Cycles, *Am. J. Physiol.*, 243, R110-R114.
26. Quay W.B., Bennett E.L., Morimoto H., Hebert M., 1971, Evidence for the Absence of 24-Hour Rhythms in Cholinesterase Activities of Brain Regions, *Comp. Gen. Pharm.*, 2, 402-410.
27. Wood N., Rose S.P.R., 1979, Changes in Acetylcholinesterase with Light Exposure, Time of Day, and Motor Activity in the Rat, *Behav. Neural Biol.*, 25, 79-89.

Grażyna Barbacka-Surowiak, Henryk Lach, Józef Surowiak
and Jacek Domosławski

THE DISPERSION OF THE RHYTHM AS THE SOURCE OF ERROR IN BIO-
CHEMICAL INVESTIGATIONS OF 24-HOUR RHYTHM AT LD 12:12

Summary

In biochemical investigations of 24-hour rhythm of enzyme activity one has to be aware of possible dispersion of the diurnal rhythm of animals activity which are material for experiment.

The cause of such a dispersion of the rhythm can be: phase shift or disappearance of the rhythm in some animals as the result of either the procedure of collecting the tissue for experiment or uncontrolled environmental cues and social factors, or both.

The authors of the present investigation discuss a number of the phase shifts of enzyme activity rhythm caused either by the technique of tissue collection or by the amount of animals kept in one cage.

Гражина Барбацка-Суrowiak, Хенрик Лях, Юзеф Суrowiak, Яцек Домославски

ЯВЛЕНИЕ ДИСПЕРСИИ РИТМА - ИСТОЧНИК ОШИБОК В БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ 24-ЧАСОВОЙ РИТМИКИ В УСЛОВИЯХ ЛД 12:12

Резюме

В биохимических исследованиях 24-часовой ритмики активности энзимов возникает опасность появления дисперсии суточной ритмики животных, от которых брались материал для энзиматических исследований.

Явление дисперсии ритма объясняется фазовыми перемещениями или замиранием ритма у некоторых животных, причиной которых может быть или сама процедура взятия материала, неконтролируемые раздражители окружающей среды, а также взаимные социальные влияния.

Авторы этой статьи обсуждают ряд таких примеров фазовых перемещений ритмов, вызванных или же самой процедурой взятия материала для определения активности энзима, или же влиянием количества выращиваемых в клетке животных.