

Gracjan Świątkiewicz**

**Wpływ stałej ciemności przerywanej
15-minutowym okresem światła na okołodobową
rytmikę aktywności acetylocholinesterazy
w szyszynce myszy oraz na rytmikę aktywności
lokomotorycznej ***

Streszczenie

Przebadano okołodobowe zmiany aktywności acetylocholinesterazy (AChE, EC 3.1.1.7) w szyszynce samców myszy w warunkach LD 12:12 i DD z 15-minutowym okresem światła.

Stwierdzono występowanie okołodobowego rytmu aktywności AChE zarówno w warunkach LD 12:12, jak i w warunkach DD z 15-minutowym okresem światła. W warunkach DD z 15-minutowym okresem światła między 9.00 a 9.15, wystąpiło dryfowanie fazy rytmu aktywności AChE w kierunku okresu światła, połączone z obniżeniem wartości amplitudy i wydłużeniem okresu rytmu w stosunku do kontroli (LD 12:12).

Przebadano również okołodobowe zmiany aktywności lokomotorycznej zwierząt hodowanych pojedynczo w warunkach LD 12:12 i DD z 15-minutowym okresem światła i w obu wypadkach stwierdzono występowanie okołodobowego rytmu aktywności lokomotorycznej. W warunkach DD z 15-minutowym okresem światła między 9.00 a 9.15 wystąpiło również dryfowanie fazy rytmu aktywności lokomotorycznej w kierunku okresu światła, połączone z wyraźnym obniżeniem wartości amplitudy i skróceniem długości okresu w stosunku do kontroli (LD 12:12).

Ponadto stwierdzono desynchronizację rytmów aktywności AChE i lokomotorycznej u zwierząt hodowanych w warunkach DD z 15-minutowym okresem światła.

* Praca wykonana w ramach programu naukowego RP.II.12 koordynowanego przez Uniwersytet Jagielloński.

** Zakład Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Jagiellońskiego.

WSTĘP

Moore-Ede i wsp. (1982) uważają, że szyszynkę ssaków można traktować jako jeden z pasywnych elementów (passive element) okołodobowego układu odmierzającego czas (circadian timing system). Oznaczałoby to, że narząd ten nie jest zdolny do generowania samopodtrzymujących się oscylacji, czyli że nie może być w przypadku ssaków nadrzędnym zegarem biologicznym Esso (endogenous self-sustaining oscillatory clock). Pomimo to uważa się, że szyszynka kręgowców, szczególnie gryzoni, może synchronizować rytmikę różnych procesów fizjologicznych, poprzez rytmiczną produkcję i sekrecję melatoniny (Binkley i wsp., 1978).

Najważniejszymi czynnikami kontroli aktywności wydzielniczej tego gruczołu są wyrunki świetlne otoczenia. Liczne badania morfologiczne i biochemiczne wykazały stymulujący wpływ ciemności na aktywność szyszynki i hamujący wpływ światła (Rowe i wsp., 1981; Karasek i wsp., 1983).

Informacje świetlne otoczenia docierają do szyszynki ssaków z siatkówki, bilateralnie, poprzez jądro nadskrzyżowaniowe podwzgórza, pień mózgu, słupy pośrednioboczne rdzenia kręgowego, zwoje szyjne górne pnia współczulnego i biegnące z nich zazwojowe płókna adrenergiczne, osiągające szyszynkę drogą nervi conarii. Układ ten sprawuje funkcję regulatora rytmiki syntezy i sekrecji melatoniny oraz reguluje rytmikę aktywności kluczowych enzymów syntezy tego hormonu (Rowe i wsp., 1981; Reiter i wsp., 1981; Erlich i Apuzzo 1985).

Szyszynka ssaków posiada również unerwienie cholinergiczne, parasympatyczne, pochodzące z nerwów skalistych powierzchniowych, które wnika do szyszynki drogą nervi conarii (Erlich i Apuzzo 1985). Semm i wsp., (1981) oraz Korf i Møller (1984) wykazali, że acetylocholina (ACh) wpływa na aktywność elektryczną pinealocytów ssaków, jednakże rola unerwienia cholinergicznego w szyszynce nie została poznana.

Ernest i Iurek (1983) sugerują, że układ cholinergiczny działając na pinealocyty zmienia aktywność enzymów związanych z syntezą melatoniny i w ten sposób moduluje wpływ szyszynki na podległe jej narządy. Wskaźnikiem aktywności układu cholinergicznego może być, obok poziomu aktywności cholinacetyltransferazy (CAT, EC 2.3.1.6), enzymu syntezy acetylo-

cholinyl, poziom aktywnoŝci AChE, enzymu hydrolizującego ACh we wszystkich miejscach przekżnictwa cholinergicznego (Lehman i Fibiger 1979).

AChE występuje w elementach pre- i postsynaptycznych układu cholinergicznego, w płytkach nerwowo-mięŝniowych, w róznych obszarach mózgu (prążkowie, kora, twór siatkowaty), w erytrocytach, osoczu, ŝcianach naczyń krwionoŝnych, gruczole ŝlinowym, nadnerczach (Silver, 1974; Lehman i Fibiger 1979; Beauregard, 1980; Davis i Koelle 1981; Carmichael, 1984; Gordon i Finch 1984; Mastrolia i wsp., 1986). W szyszynce ssaków wykazano jak dotąd okołodobową rytmik poziomu melatoniny, dopaminy, norepinefryny oraz rytmik aktywnoŝci N-acetylotransferazy (NAT) i 5-hydroksoindolo-C-metylotransferazy (HIOMT). Rytmu te charakteryzowały się szczytem nocnym i minimum w ciągu dnia.

Podobnie rytmiczne zmiany w szyszynce wykazano w przypadku poziomu serotoniny, charakteryzujące się szczytem w okresie dnia i minimum w ciągu nocy (Binkley i wsp., 1978; Hoffman, 1981; Reiter, 1981; Reiter i wsp., 1984; Brainard i wsp., 1984; Reppert i wsp., 1984; Tang i wsp., 1985; Erlich i Apuzzo 1985). Okołodobową rytmik aktywnoŝci AChE w szyszynce myszy, hodowanych w warunkach LD 12:12 wykaza Chyb (1988).

Celem niniejszej pracy było okreŝlenie wpływu stałej ciemnoŝci (DD) przerywanej 15-minutowym okresem ŝwiata na okołodobową rytmik aktywnoŝci AChE w szyszynce myszy oraz na rytmik aktywnoŝci lokomotorycznej.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto 194 samców myszy, szczepu Swiss, chowu wsobnego, w wieku 8 tygodni i ŝredniej masie ciała 24-30 g. Zwierzęta hodowano w warunkach LD 12:12 (faza jasna od godziny 8.00 do 20.00 i faza ciemna od godziny 20.00 do 8.00) w pomieszczeniu bez okien, izolowanym akustycznie, w temperaturze 20°C \pm 2°C i wilgotnoŝci względnej powietrza 60% \pm 5%. Natężenie ŝwiata w pomieszczeniu hodowlanym wynosiło 200 lx a nad każdą klatk \pm 120 lx. Standardowy pokarm granulowany i wod podawano w róznych porach doby ad libitum.

Zwierzęta, u których oznaczano aktywność AChE, przebywały w klatkach po 7 osobników w każdej. Grupę zwierząt, u których oznaczano aktywność lokomotoryczną, umieszczono po 1 osobniku w 12 klatkach z bieżnią kołową. Aktywność lokomotoryczną rejestrował w postaci impulsów licznik elektroniczny i co godzinę suma impulsów z każdej klatki zapisywana była na taśmie perforowanej.

Po dwóch tygodniach adaptacji zwierząt do warunków LD 12:12 pobierano materiał do badań kontrolnych na poziom AChE w szyszynce, podczas gdy pozostała grupa zwierząt przebywała przez następne dwa tygodnie w warunkach DD z 15-minutowym okresem światła, powtarzanym co 24 godziny, o natężeniu 2001 x między godziną 9.00 a 9.15.

Po dwóch tygodniach przebywania zwierząt w warunkach DD z 15-minutowym okresem światła ponownie oznaczano aktywność AChE. Materiał do oznaczania AChE, zarówno kontrolny, jak i doświadczalny, pobierano przez dwie doby, co 4 godziny, poczynając od godziny 8.00. Zwierzęta zabijano przez dekapitację, a w ciemnej fazie doby zabiegu dokonywano przy słabym czerwonym świetle.

Aktywność lokomotoryczną zwierząt w warunkach LD 12:12 rejestrowano przez dwa tygodnie, po uprzednim dwutygodniowym okresie adaptacji. Następnie tę samą grupę zwierząt przeniesiono na dwa tygodnie do warunków DD z 15-minutowym okresem światła i przez ten czas rejestrowano aktywność lokomotoryczną.

Wypreparowaną szyszynkę homogenizowano przez dwie minuty w 1 ml zimnego buforu fosforanowego o pH 8.0. Aktywność AChE oznaczano metodą Ellmana i wsp. (1961), używając jako substratu jodku acetylotiocholiny. Pomiaru aktywności AChE dokonano spektrofotometrycznie, po 1 minucie przy długości fali 412 nm, w temperaturze 37°C.

Uzyskane wyniki poddano analizie wariancji (ANOVA 1) i analizie kosinorów wg Halberga (1969) w modyfikacji Domośławskiego, obliczając wartości średnie M, amplitudę rytmu A, akrofazę rytmu θ dla okresu stałego T = 24 godziny i dopasowanego τ . Aktywność AChE wyrażono w μ molach zhydrolizowanego substratu w ciągu 1 minuty, na gram świeżej tkanki. Obliczeń aktywności lokomotorycznej dokonano dla każdego zwierzęcia indywidualnie, a następnie uśredniono je, przy pomocy komputera ITM.

WYNIKI

Analiza wariancji wykazała wysoką istotność statystyczną zarówno wewnątrzgrupową, jak i międzygrupową badanego materiału.

Z analizy kosinorów wynika, że w warunkach LD 12:12 i DD z 15-minutowym okresem światła aktywność AChE w szyszynce myszy, jak również aktywność lokomotoryczna tych zwierząt, charakteryzuje się zarówno dla okresu stałego (T), jak i dopasowanego (τ), statystycznie istotną rytmiką okołodobową.

Rytm aktywności AChE w warunkach LD 12:12 posiada akrofazę przypadającą na środek fazy ciemnej, tj. na godzinę 2.30, oraz okres wynoszący 22 godziny i 55 minut (tab. 1, ryc. 1).

Tabela 1

Rytm aktywności AChE w szyszynce myszy w warunkach LD 12:12

N	P	M	A	Okres	$\bar{\theta} \pm SD$
7	95%	42.86	22.56	$\tau = 22^h55' + 2^h30'$	$(-1^h55' + 1^h55')$
7	95%	42.05	22.31	T = 24 ^h 00'	$(-1^h36' + 2^h12')$

W warunkach DD z 15-minutowym okresem światła rytm aktywności tego enzymu charakteryzuje się akrofazą występującą o godzinie 15.58 oraz okresem wynoszącym 24 godziny i 22 minuty (tab. 2, ryc. 2).

Tabela 2

Rytm aktywności AChE w szyszynce myszy w warunkach DD z 15' okresem światła

N	P	M	A	Okres	$\bar{\theta} \pm SD$
7	95%	74.30	20.96	$\tau = 24^h22'$	$15^h58' (-5^h49' + 2^h42')$
7	95%	74.30	21.14	T = 24 ^h 00'	$15^h54' (-5^h49' + 2^h39')$

W porównaniu z grupą kontrolną (LD 12:12) wystąpiło znaczne przesunięcie fazy tego rytmu w kierunku okresu światła (ryc. 3).

Rytmika aktywności lokomotorycznej zwierząt, rejestrowana dwie doby przed pobieraniem materiału i dwie doby w trakcie, nie wykazuje różnic w warunkach LD 12:12. Występuje jedynie nieznaczne obniżenie amplitudy rytmu aktywności lokomotorycznej w okresie pobierania materiału (tab. 3, 4, ryc. 4). W stosunku do rytmu aktywności AChE w tych samych warunkach przebieg rytmu aktywności lokomotorycznej wykazuje czasową zbieżność występowania akrofaz (ryc. 1).

Tabela 3

Rytm aktywności lokomotorycznej zwierząt w warunkach LD 12:12 rejestrowany przed pobieraniem materiału

N	P	M	A	Okres	$\bar{\theta} \pm SD$
12	95%	165.87	173.95	$\tau = 23^h23'$	$2^h44' \pm 0.00$
12	95%	165.40	173.09	$T = 24^h00'$	$2^h37' \pm 0.00$

Tabela 4

Rytm aktywności lokomotorycznej zwierząt w warunkach LD 12:12 rejestrowany w trakcie pobierania materiału

N	P	M	A	Okres	$\bar{\theta} \pm SD$
12	95%	157.50	162.61	$\tau = 23^h45'$	$2^h24' \pm 0.00$
12	95%	157.93	162.62	$T = 24^h00'$	$2^h20' \pm 0.00$

N - liczba zwierząt

P - prawdopodobieństwo

M - mediana

A - amplituda rytmu

$\bar{\theta}$ - akrofaza rytmu

SD - odchylenie standardowe

W warunkach DD z 15-minutowym okresem światła amplituda rytmu aktywności lokomotorycznej zwierząt, rejestrowana w trakcie pobierania materiału, wykazuje znaczne obniżenie swej wartości w stosunku do grupy kontrolnej (przed pobieraniem materiału). Pozostałe parametry tego rytmu, jak okres i akrofaza, nie wykazują różnic (tab. 5, 6, ryc. 5).

Tabela 5

Rytm aktywności lokomotorycznej zwierząt w warunkach DD z 15' okresem światła, rejestrowany przed pobieraniem materiału

N	P	M	A	Okres	$\emptyset \pm SD$
12	95%	109.78	142.12	$\tau = 23^h20'$	$21^h54' \pm 0.00$
12	95%	103.47	140.86	$T = 24^h00'$	$22^h14' \pm 0.00$

Tabela 6

Rytm aktywności lokomotorycznej zwierząt w warunkach DD z 15' okresem światła, rejestrowany w trakcie pobierania materiału

N	P	M	A	Okres	$\emptyset \pm SD$
12	95%	21.44	21.12	$\tau = 22^h36'$	$21^h29' (-0.00+10')$
12	95%	20.23	21.24	$T = 24^h00'$	$22^h15' (-0.00+10')$

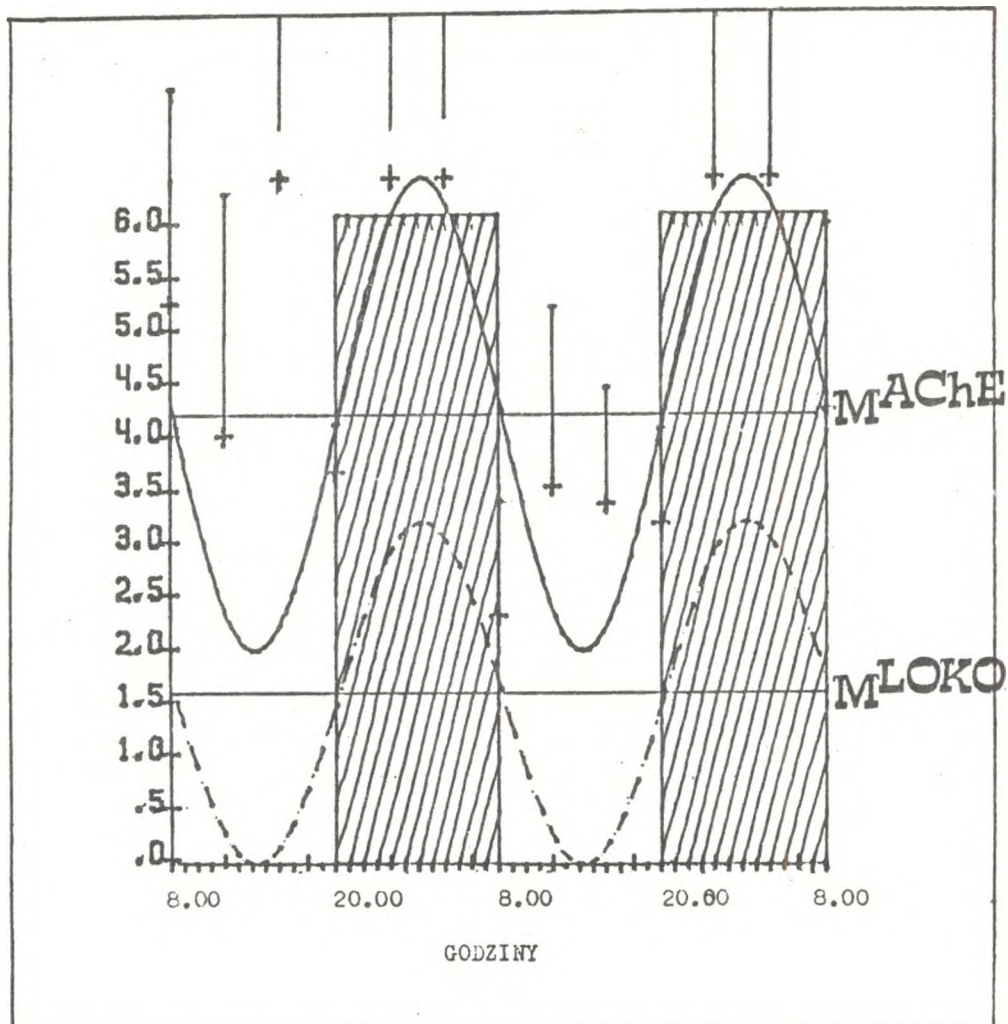
N - liczba zwierząt
P - prawdopodobieństwo
M - mediana

A - amplituda rytmu
 \emptyset - akrofaza rytmu
SD - odchylenie standardowe

W porównaniu z rytmem aktywności AChE w tych samych warunkach braku czasowej zbieżności występowania akrofaz, gdyż akrofaza rytmu aktywności AChE znacznie poprzedza w czasie akrofazę rytmu aktywności lokomotorycznej (ryc. 2). Przebieg rytmu aktywności lokomotorycznej rejestrowanej przed pobieraniem materiału, jak i w trakcie, wykazuje przesunięcie fazy rytmu w stosunku do odpowiedniego rytmu grupy kontrolnej (LD 12:12) (ryc. 6, 7). Podobne przesunięcie ilustruje chronogram aktywności lokomotorycznej, rejestrowanej przez cały okres badań (ryc. 8).

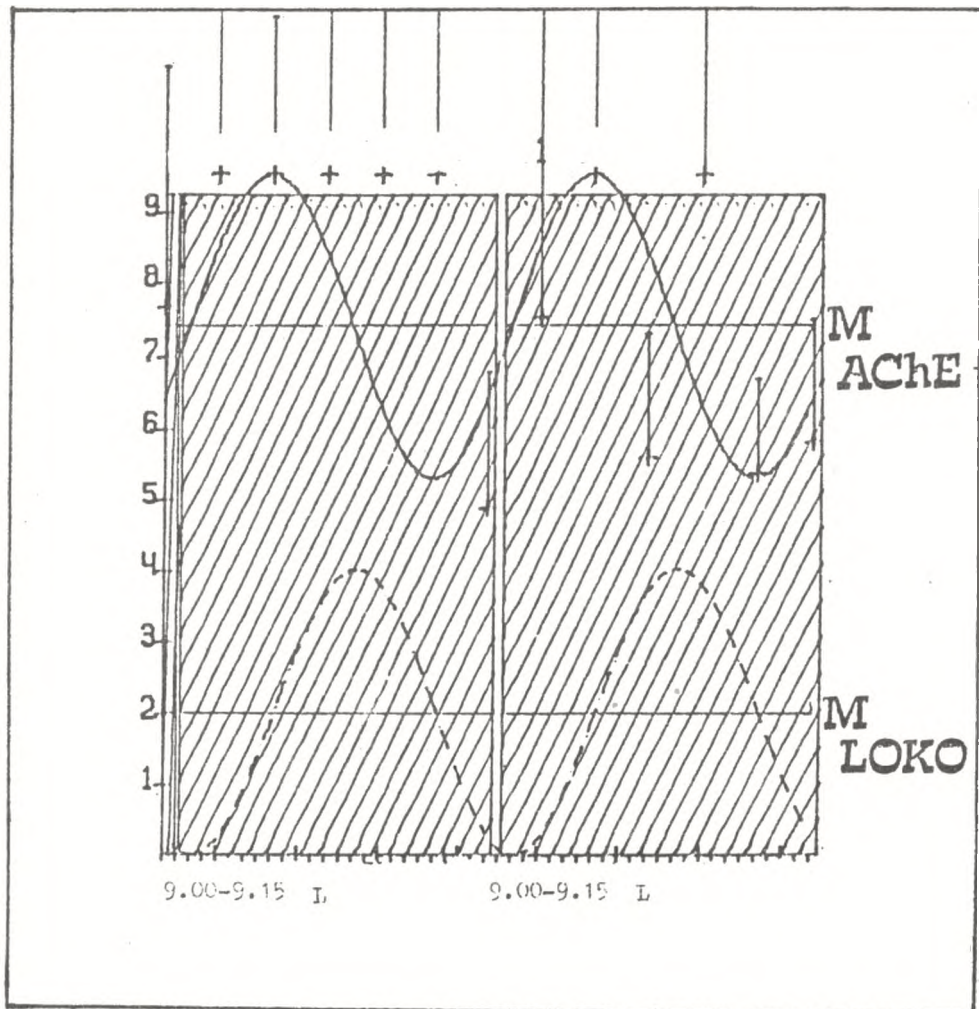
DYSKUSJA

Szyszynkę ssaków charakteryzuje wiele rytmów biochemicznych. Metabolizm indoli, jak również aktywność kluczowych enzymów syntezy melatoniny, wykazuje wyraźną rytmiczność, która jest związana z rytmem dnia



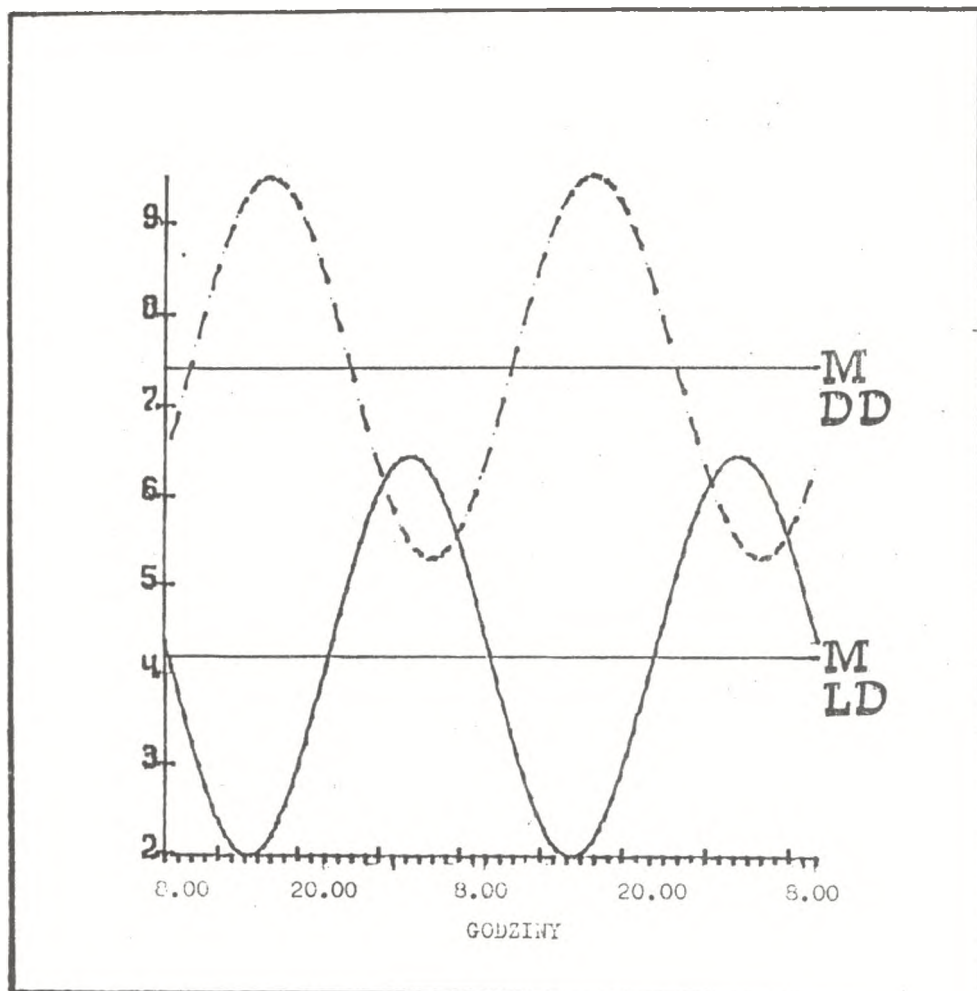
Ryc. 1. Krzywe sinusoidalne przedstawiające okołodobową rytmikę aktywności AChE w szyszynce myszy i okołodobową rytmikę aktywności lokomotorycznej w warunkach LD 12:12.

Faza ciemna doby została zakreskowana



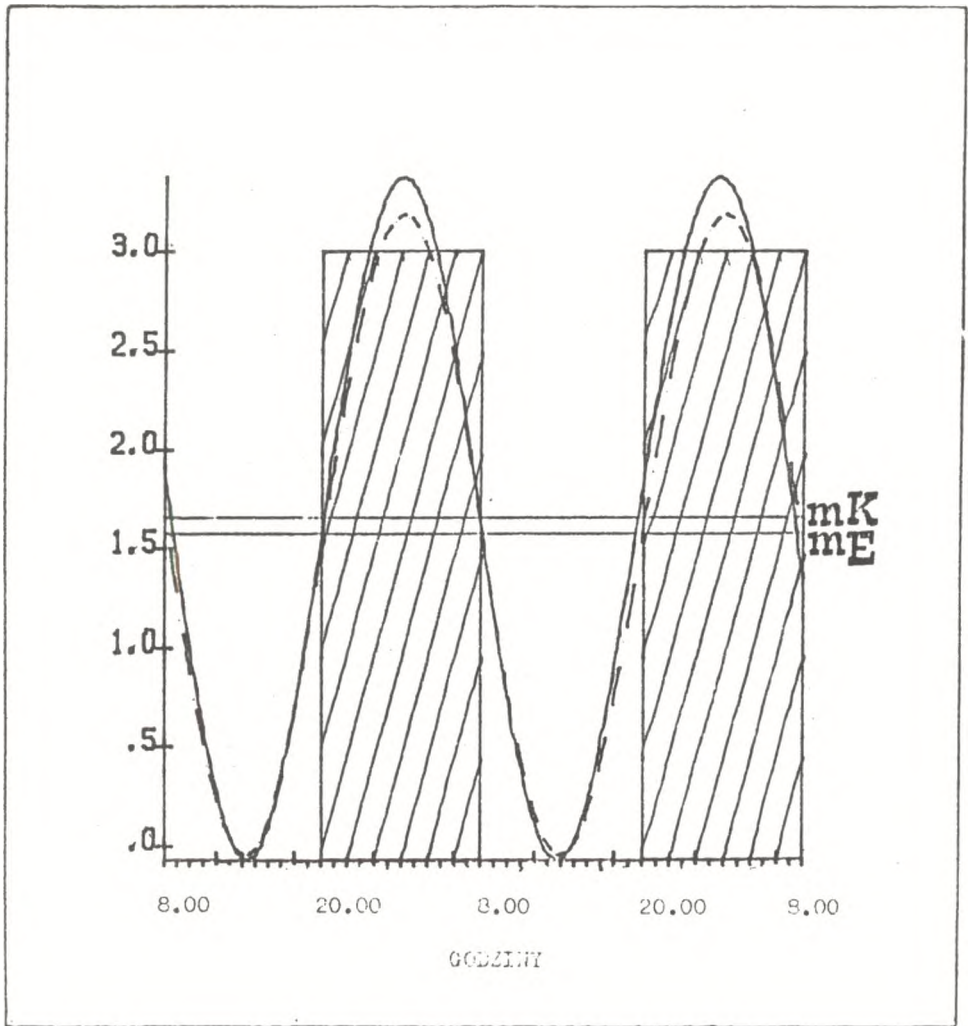
Ryc. 2. Krzywe sinusoidalne przedstawiające okołodobową rytmikę aktywności AChE w szyzynie myszy i okołodobową rytmikę aktywności lokomotorycznej w warunkach DD z 15-minutowym okresem światła

Faza ciemna doby została zakreskowana 9.00-9.15 L - okres światła

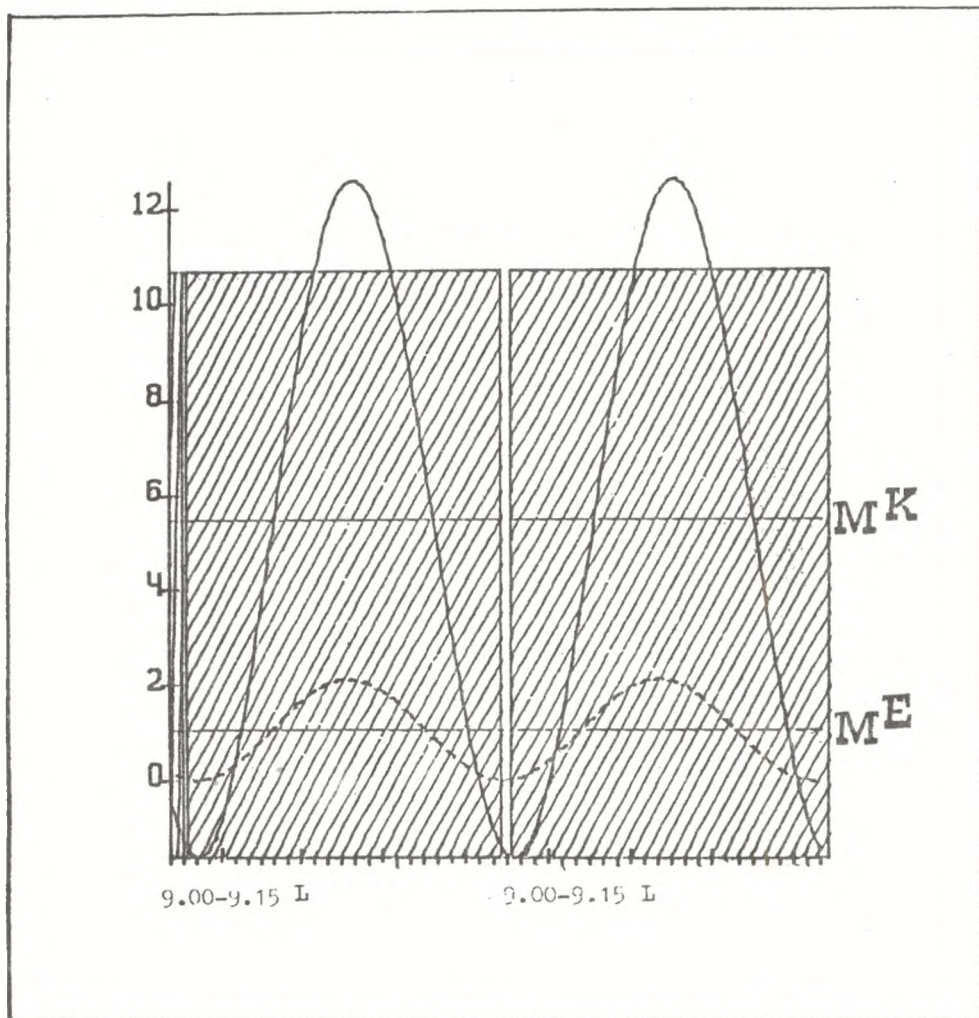


Ryc. 3. Przesunięcie fazy rytmu aktywności AChE w warunkach DD z 15-minutowym okresem światła w stosunku do kontroli LD 12:12

Linia przerywaną przedstawiono rytm aktywności AChE w warunkach DD z 15-minutowym okresem światła. Linia ciągłą przedstawiono rytm aktywności AChE w warunkach LD 12:12

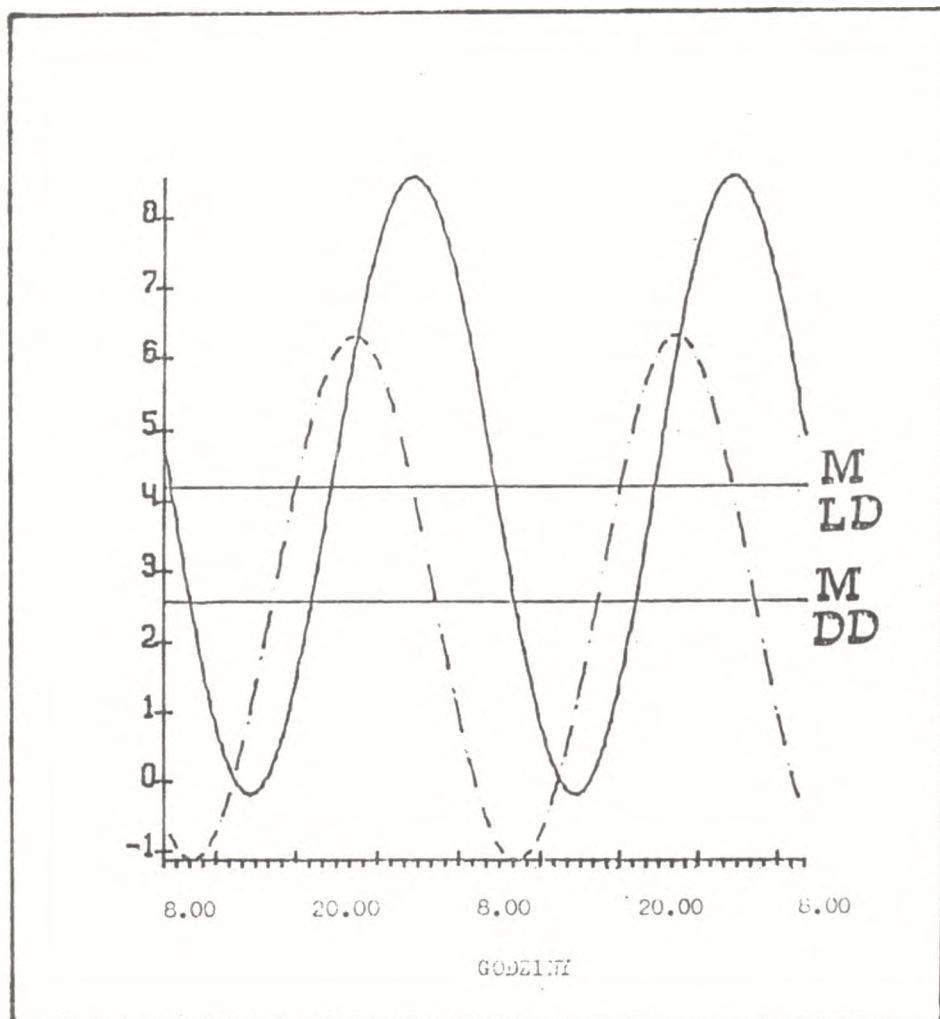


Ryc. 4. Krzywe sinusoidalne przedstawiające rytm aktywności lokomotorwcznej w warunkach LD 12:12 rejestrowany przed pobieraniem materiału /K/ i w trakcie /E/
 Faza ciemna doby została zakreskowana



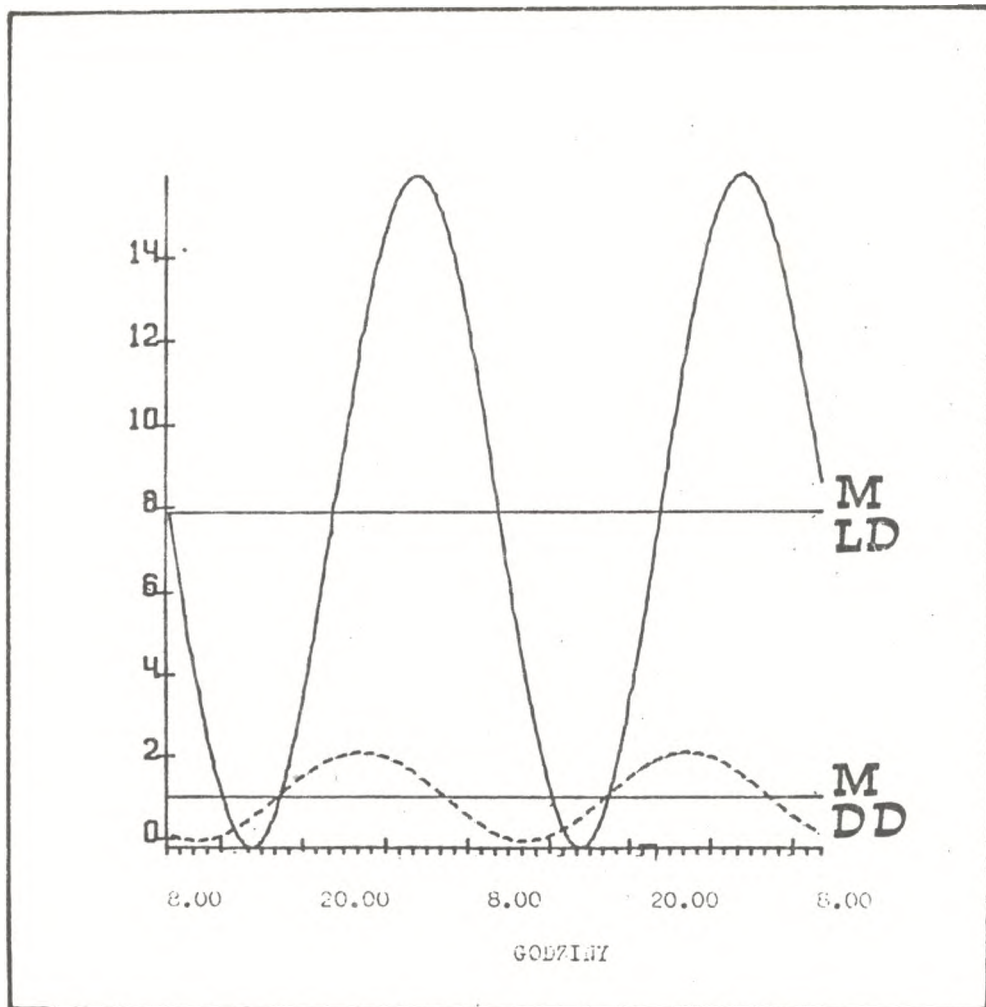
Ryc. 5. Krzywe sinusoidalne przedstawiające rytm aktywności lokomotorycznej w warunkach DD z 15-minutowym okresem światła, rejestrowany przed pobieraniem materiału /K/ i w trakcie /E/

Faza ciemna doby została zakreskowana



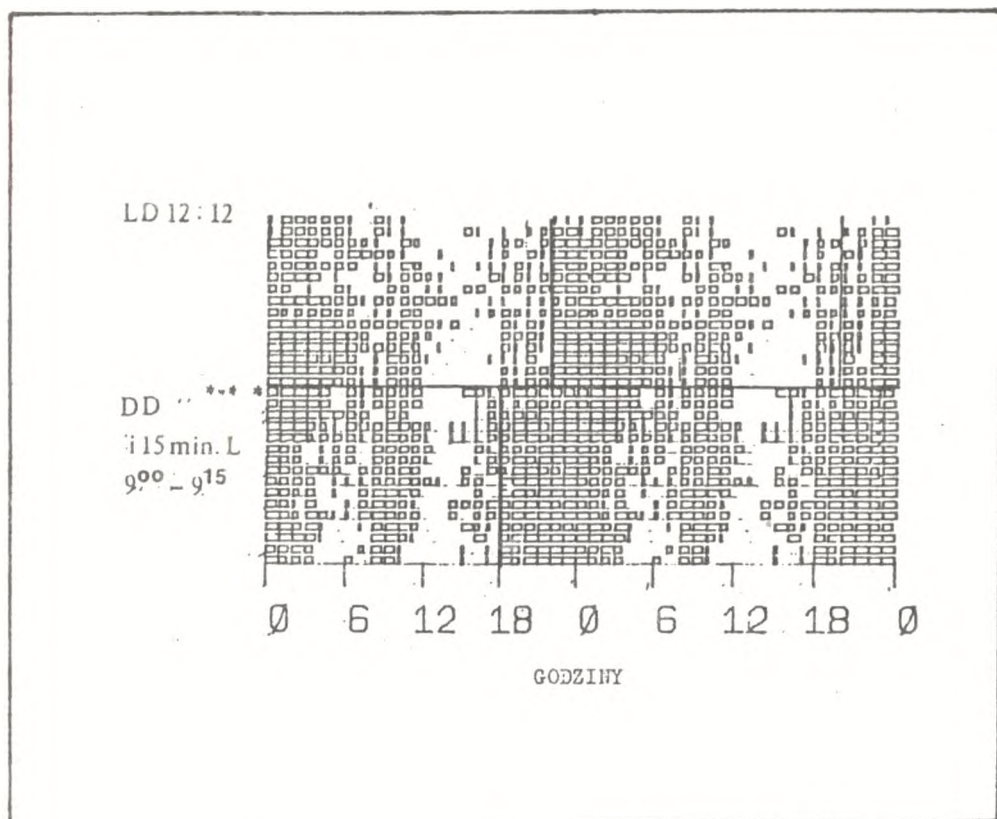
Ryc. 6. Przesunięcie fazy rytmu aktywności lokomotorycznej w warunkach DD z 15-minutowym okresem światła w stosunku do kontroli LD 12:12 (przed pobieraniem materiału)

Linia przerywaną przedstawiono rytm aktywności lokomotorycznej w warunkach DD z 15-minutowym okresem światła. Linia ciągłą przedstawiono rytm aktywności lokomotorycznej w warunkach LD 12:12



Ryc. 7. Przesunięcie fazy rytmu aktywności lokomotorycznej w warunkach DD z 15-minutowym okresem światła w stosunku do kontroli LD 12:12 (w trakcie pobierania materiału)

Linia przerywana przedstawiono rytm aktywności lokomotorycznej w warunkach DD z 15-minutowym okresem światła. Linia ciągłą przedstawiono rytm aktywności lokomotorycznej w warunkach LD 12:12



Ryc. 8. Chronogram ilustrujący przesunięcie fazy rytmu aktywności lokomotorycznej, rejestrowanej przez cały okres eksperymentu, tzn. przez dwa tygodnie, w warunkach LD 12:12, a następnie przez dwa tygodnie w warunkach DD z 15-minutowym okresem światła

i nocy. Badania chronobiologiczne przeprowadzone na ssakach wykazały, że w mózgu tych zwierząt poziom neurotransmiterów, w tym poziom ACh, jak również aktywność enzymów ich syntezy i hydrolizy, wykazują zmiany o charakterze rytmów okołodobowych (Naber i wsp., 1981; Wirz-Justice, 1987).

Okołodobowe rytmy aktywności ACh, AChE i CAT w mózgu ssaków wykazują ponadto regionalne różnice w swoim przebiegu. Quay i wsp., (1971) wykazały u szczurów hodowanych zespołowo okołodobową rytmikę aktywności AChE w podwzgórzu i mózdzku. W tworze siatkowatym pnia mózgu myszy okołodobową rytmikę aktywności AChE w warunkach LD 12:12 ujawnił Lewandowski (1983 b), a w podwzgórzu i zakręcie obręczy tych samych zwierząt Surowiak i Barbacka-Surowiak (1985). W szyszynce myszy w warunkach LD 12:12 okołodobową rytmikę aktywności tego enzymu wykazał Chyb (1988).

W wyniku badań stwierdzono, że w tych samych warunkach oświetlenia LD 12:12 akrofaza rytmu aktywności AChE przypada na środek fazy ciemnej doby (2.30 h), co jest zasadniczo zgodne z wynikami wyżej cytowanego autora. U zwierząt hodowanych w warunkach stałej ciemności ekspozycja świetlna o określonej porze doby może powodować przesunięcie fazy danego rytmu. Potwierdzają to wyniki niniejszej pracy.

W porównaniu z rytmem aktywności AChE w szyszynce myszy hodowanych w warunkach LD 12:12 zastosowanie w warunkach stałej ciemności 15-minutowego okresu światła między godziną 9.00 a 9.15, przypadającego na okres spoczynku zwierząt nocnych, do których należą myszy, powoduje bardzo znaczne przesunięcie fazy tego rytmu. Akrofaza rytmu aktywności AChE dryfuje w stosunku do akrofazy rytmu AChE grupy kontrolnej (LD 12:12) z godziny 2.30 na 15.58. Dochodzi również do wydłużenia okresu rytmu i obniżenia jego amplitudy. Potwierdzałoby to pierwszą i drugą regułę Aschoffa (Aschoff, 1979), zgodnie z którą u zwierząt nocnych, hodowanych w warunkach stałej ciemności, światło wydłuża okres rytmu wolno biegnącego i jednocześnie obniża wartość amplitudy tego rytmu.

Rytmika aktywności lokomotorycznej zwierząt jest powszechnie uważana za jeden z przejawów pracy ich wewnętrznego mechanizmu odmierzającego czas, a określanego mianem zegara biologicznego. W warunkach LD 12:12 i DD z 15-minutowym okresem światła wykazano, że zmiany aktywności lokomotorycznej mają charakter rytmu okołodobowego. Akrofaza rytmu sponta-

nicznej aktywności lokomotorycznej myszy w warunkach LD 12:12 występuje w środku fazy ciemnej doby, tj. o godzinie 2.44.

W porównaniu z grupą kontrolną (LD 12:12) zastosowanie 15-minutowego okresu światła w warunkach stałej ciemności powoduje przesunięcie fazy rytmu aktywności lokomotorycznej, nieznaczne skrócenie jego okresu i wyraźne obniżenie wartości amplitudy. Podobny dryf rytmu aktywności lokomotorycznej myszy wykazał Lewandowski (1983 a). Potwierdza to drugą regułą Aschoffa, zgodnie z którą u zwierząt nocnych zastosowanie światła w warunkach stałej ciemności obniża wartość amplitudy badanego rytmu.

Niezgodne z pierwszą regułą Aschoffa skrócenia okresu rytmu oraz obserwowane różnice między rytmem aktywności lokomotorycznej zwierząt, rejestrowanym przed pobieraniem materiału, jak i w trakcie, szczególnie wyraźne w warunkach DD z 15-minutowym okresem światła, mogły być spowodowane samą procedurą pobierania materiału (stres). Mogło to mieć również wpływ na przebieg rytmu aktywności AChE. Istnienie korelacji pomiędzy rytmiką aktywności lokomotorycznej a rytmiką aktywności AChE stwierdzili Wood i Rose (1979) w korze motorycznej szczura, a Lewandowski (1983 a) w tworze siatkowatym pnia mózgu myszy.

W niniejszej pracy w warunkach LD 12:12 zarówno akrofaza rytmu aktywności lokomotorycznej, jak i akrofaza rytmu aktywności AChE w szyszynce myszy wypadały w tym samym czasie, tj. w środku ciemnej fazy doby. W warunkach DD z 15-minutowym okresem światła rytmy te przebiegają niezależnie od siebie, gdyż akrofaza rytmu aktywności AChE przypada na godzinę 15.58, a akrofaza rytmu aktywności lokomotorycznej na godzinę 21.29. Wskazywałoby to na desynchronizację obu wymienionych rytmów.

Literatura

- Aschoff J., 1979. Circadian Rhythm: Influences of Internal and External Factors on the Period Measured in Constant Conditions. *Z. Tierpsychol.* 49, 225-249.
- Beauregard G., Potier M., Roufogalis B. D., 1980. Modulation of Erythrocyte Acetylcholinesterase by Cardiolipin: Effect of Subunit Coupling

- Revealed by Irradiation Inactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96, 1290-1295.
- Binkley S. A., Riebman J. B., Rielly K. B., 1978. The Pineal Gland: A Biological Clock in Vitro. *Science* 202, 1198-1201.
- Brainard G., Mathews S., Steger R., Reiter R., Asch R., 1984. Day/Night Variations of Melatonin, 5-Hydroxyindole Acetic Acid, Serotonin, Serotonin NAT, Tryptophan, Norpinephrine and Dopamine in the Rabbit Pineal Gland. *Life Sci.* 35, 1615-1622.
- Carmichael S. W., 1984. Acetylcholinesterase Activity of Adrenal Chromatin Vesicles. *Acta Histochem.* 75, 183-188.
- Chyb S., 1988. Okołodobowa rytmika aktywności acetylocholinesterazy (AChE) w szyszynce myszy hodowanych w warunkach LD 12:12. *Rocznik Naukowo-Dydaktyczny WSP w Krakowie. Zeszyt 117*, 81-94.
- Davis R. and Koelle G. B., 1981. Electron Microscope Localization of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in the Superior Cervical Ganglion of the Cat. *J. Neurochem* 30, 826-832.
- Earnest D. and Turek F., 1983. Role for Acetylcholin in Mediating Effect of Light on the Reproduction. *Science.* 219, 77-79.
- Ellman G. L., Courtney K. D., Anders V., Featherstone R. M., 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Erlich S. S. and Apuzzo M. L. J., 1985. Pineal Gland: Anatomy, Physiology and Clinical Significance. *J. Neurosurg.* 63, 321-341.
- Gordon M. N. and Finch C. K., 1984. Topochemical Localization of Choline Acetyltransferase and Acetylcholinesterase in Mouse Brain. *Res.* 308, 364-368.
- Halberg F., 1969. Resolving Power of Electronic Computers in Chronopathology - an Analogy to Microscopy. *Scientia.* 101, 412-419.
- Hoffman K., 1981. The role of Pineal Gland in the Photoperiodic Control of Seasonal Cycles in Hamsters. *Biological Clock in Seasonal Reproductive Cycles*, 237-250.
- Karasek M., Jameson E. W., Handen J. T., Reiter R. J., 1983. Ultrastructure of the Pineal Gland of the Brush Mouse: Influence of Long and Short Photoperiod. *J. Neural. Trans.* 56, 293-308.

- Korf H. W. and Møller M., 1984. The Innervation of the Mammalian Pineal Gland with Special Reference to Central Pinealopetal Projections. *Pineal Res. Review*, 2, 41-86.
- Lehman J. and Fibiger H. C., 1979. Acetylcholinesterase and the Cholinergic Neurons. *Life Sciences*. 25, 1939-1947.
- Lewandowski M., 1983 a. Circadian Changes of Acetylcholinesterase Activity in the Reticular Formation of the Mouse Brain Under the Influence of Different Light Conditions with Reference to Locomotor Activity. *Folia Biol. (Kraków)* 31, 53-64.
- Lewandowski M., 1983 b. Seasonal Differences in Circadian Acetylcholinesterase Activity in the Brain Stem Reticular Formation of the Mouse. *Folia Biol. (Kraków)* 31, 373-379.
- Mastrolia L., Bichi R., Arizzi M., Manelly H., 1986. Acetylcholinesterase and Pseudocholinesterases in Developing Chick Adrenal. *Bas. Appl. Histochem.* 30, 97-108.
- Moore-Ede M. C., Sulzman JF. M., Fuller C. A., 1982. *The Clocks that Time us*. Harvard Univ. Press. 40-43.
- Naber D., Wirz-Justice A., Kafka M. S., 1981. Circadian Rhythm in Rat Brain Opiate Receptor. *Neuroscience Letters*. 21, 45-50.
- Quay W. B., Benne E. L., Morimoto H., Marye H., 1971. Evidence for the Absence of 24-hour Rhythm in Cholinesterase Activity of Brain Regions. *Comp. Gen. Pharmacol.* 2, 402-410.
- Reiter R. J., 1981. Chronobiological Aspects of the Mammalian Pineal Gland. *Eleventh International Congress of Anatomy: Biological Rhythms in Structure and Function*. 223-233.
- Reiter R. J., Hurlbut E. C., Esquifinio A., Champney T. H., Steger R. W., 1984. Changes in Serotonin Levels, N-Acetyltransferase Activity, Hydroxyindole-O-Methyltransferase Activity and Melatonin Levels in the Pineal Gland of the Richardson's Ground Squirrel in Relation to the Light-Dark Cycle. *Neuroendocrinology*. 39, 356-360.
- Reppert S. M., Coleman R. J., Heath H. W., Swedlow J. R., 1984. Pineal N-Acetyltransferase Activity in 10-day Old Rats. A Paradigm for Studying the Developing Circadian System. *Endocrinology*. 115, 918-925.

- Rowe V., Fernandez H., Duell M., Parr J., Battie C., 1981. Molecular Forms of Acetylcholinesterase in the Pineal Gland and Sympathetic Neuronal Cultures. *J. Neurochem.* 37, 861-866.
- Semm P., Demain C., Vollrath L., 1981, Electrical Responses of Pineal Cells to Melatonin and Putative Transmitters. *Neurobiol.* 20, 119-128.
- Silver A., 1974. *The Biology of Cholinesterase.* North-Holland Publ. Co., Amsterdam-Oxford.
- Surowiak J., Barbacka-Surowiak G., 1985, Sezonnyje Izmienienija Sutocznoj Ritmiki Aktiwnostii Acetylcholinesterazy w Gyrus Cingulli Limbiczeskoj Sistemy i w Gipotalamusie Myszej w Usłowiach ST 12:12. *Probl. Chronobiol. Cronopatol. Chronofarmakol. Chronomed.* Ufa, I. 18-19.
- Tang F., Hadjiconstantinou M., Pand. S. F., 1985. Aging and Diurnal Rhythms of Pineal Serotonin, 5-Hydroxyindolo Acetic Acid, Norepinephrine, Dopamine and Serum Melatonin in the Male Rat. *Neuroendocrinology.* 40, 160-164.
- Wirz-Justice A., 1987. Circadian Rhythms in Mammalian Neurotransmitter Receptors. *Progress in Neurobiology.* 29, 219-259.
- 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, 379-380.

THE INFLUENCE OF THE CONSTATNT DARKNESS INTERRUPTED BY A 15-MINUTES TERM OF LIGHT ON THE CIRCADIAN RHYTHM OF ACETYLCHOLINESTERASE (AChE) ACTIVITY IN THE PINEAL GLAND OF THE MOUSE AND LOCOMOTOR RHYTHMICITY

Summary

Circadian changes in acetylcholinesterase (AChE, EG 3.1.1.7) activity in male mouse reared in LD 12:12 and DD with 15-minutes term of light (9.00-9.15) were examined. The material was collected every four hours. AChE activity in the pineal gland was assessed according to Ellman's method (Ellman et al., 1961).

Both in LD 12:12 and DD with 15-minutes term of light a circadian rhythm of AChE activity was found. In LD 12:12 a circadian rhythm of

AChE was characterized by the period of 22.55 hrs and the acrophase occurred in the middle of the dark phase (2.30 h).

In DD with 15-minutes term of light a circadian rhythm of AChE was characterized by the period of 24.22 hrs and the acrophase at 15.58 h. Under these conditions (when compared to LD 12:12) a shift in the phase of the AChE activity rhythm (towards the term of light) together with decline in the rhythm amplitude was found as well as the period of the rhythm was longer. Simultaneously locomotor activity of the mouse (each animal was kept individually) was recorded.

In LD 12:12 the period was 23.45 hrs and the acrophase occurred in the middle of the dark phase (2.44 h). In DD with a 15-minutes term of light the period was 22.36 hrs with the acrophase at 21.29 h.

Under these conditions (when compared to LD 12:12) a shift in the phase of the locomotor activity rhythm (towards the term of light) together with a marked decline on the rhythm amplitude was found as well as the period of the rhythm was shorter.

Moreover in DD with 15-minutes term of light desynchronization between the circadian rhythm of AChE activity and locomotor activity was found.

Грацьян Святкевич

Влияние полной темноты, прерываемой 15-минутной вспышкой света на околосоуточную ритмику активности ацетилхолинэстеразы /АСХЕ/ в эпифизе мыши, а также на ритмику локомоторической активности

Резюме

Исследовано околосоуточные перемены активности ацетилхолинэстеразы /АСХЕ, ЕС 3.1.1.7/ в эпифизе самцов мыши в условиях ЛД 12:12 и ДД с 15-минутной вспышкой света. Материал для ис-

следований всегда брались каждые 4 часа в течение двух суток. Активность ВСХЕ обозначалась методом Элмана и др. /1961/.

Констатировано, что в условиях ДД с 15-минутным световым перерывом произошло дрейфование фазы ритма активности АСХЕ по направлению вспышки, связанное с понижением величины амплитуды и удлинением периода ритма относительно контроля /ЛД 12:12/. Исследованы также околосуточные изменения локомоторической активности животных в тех же условиях освещения.

Подтверждено, что в условиях ДД с 15-минутной вспышкой света последовало смещение фазы ритма локомоторической активности по направлению вспышки, связанное с понижением значения амплитуды и сокращением периода ритма относительно контроля /ЛД 12:12/.