



UNIWERSYTET RZESZOWSKI
WYDZIAŁ BIOLOGICZNO-ROLNICZY

Maria Romerowicz-Misielak

ROZPRAWA DOKTORSKA

**WPLYW TLENKU WĘGLA NA EKSPRESJĘ
GENÓW GONADOTROPIN I GONADOLIEBERYNY
W CENTRALNYM UKŁADZIE NERWOWYM
ŚWINIODZIKA W OKRESIE LATA I ZIMY**

Promotor: Prof. dr hab. Marek Koziorowski

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Fizjologii i Rozrodu Zwierząt
Pozawydziałowego Zamiejscowego Instytutu Biotechnologii Stosowanej
i Nauk Podstawowych

Rzeszów 2013

*Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi
Profesorowi Markowi Koziorowskiemu
za wszelką pomoc jakiej mi udzielił w trakcie pisania tej pracy
ale również w czasie całej dotychczasowej współpracy.*

*Składam serdeczne podziękowania
Pani Profesor Stanisławie Stefańczyk-Krzymowskiej
Kierownikowi Zakładu Lokalnych Regulacji Fizjologicznych
Instytutu Rozrodu i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie
za umożliwienie wykonania pomiarów stężeń hormonów.*

*Pragnę podziękować koleżankom i kolegom
z Zakładu Fizjologii i Rozrodu Zwierząt
Instytutu Biotechnologii Stosowanej i Nauk Podstawowych UR oraz
z Zakładu Lokalnych Regulacji Fizjologicznych
Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie
za wszelką okazaną pomoc oraz
za stworzenie wspaniałej atmosfery naukowej (i nie tylko).*

*Szczególne podziękowania składam moim Najbliższym
za wsparcie i zachętę, ale również za cierpliwość i wyrozumiałość.*

Spis treści

STRESZCZENIE.....	8
ABSTRACT	10
I WSTĘP	12
1. Sezonowość w rozrodzie u ssaków	12
2. Rytm biologiczny; zegar okołodobowy	14
2.1 Niewizualny przekaz informacji świetlnej z otoczenia do mózgu	16
3. Oś reprodukcyjna podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalna (HPG) ssaków.....	18
3.1 Hormon uwalniający gonadotropiny (GnRH) - produkcja, sekrecja i rola w osi reprodukcyjnej	20
3.2 Regulacja transkrypcji genów gonadotropin.....	21
3.3 Szlak sygnalizacyjny GnRH-I.....	22
4. Regulacja sezonowej aktywności osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalnej	23
5. Hipoteza badawcza.....	24
II CELE PRACY	30
III MATERIAŁY I METODY	31
1. Zwierzęta doświadczalne.....	31
1.1 Procedury Chirurgiczne - Zabiegi katetyzacji (kaniulacji) naczyń żylnych	31
2. Harmonogram doświadczeń	33
2.1 Doświadczenie 1.....	33
2.2 Doświadczenie 2.....	35
3. Pobieranie krwi	40
4. Pobieranie struktur centralnego układu nerwowego do analiz ekspresji genów gonadotropin i gonadoliberyny	41
5. Oznaczenia poziomu hormonów w osoczu krwi obwodowej metodą radioimmunologiczną ..	41
5.1 Oznaczanie stężenia LH i FSH.....	41
5.3 Oznaczenie stężenia melatoniny	42

6. Oznaczanie poziomu mRNA - analiza ekspresji genów <i>GnRH</i> , <i>GnRH-R</i> , α , <i>Lhb</i> i <i>Fshβ</i>	42
6.1 Izolacja RNA.....	42
6.2 Reakcja odwrotnej transkrypcji.....	43
6.3 Reakcja łańcuchowa polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym – Real-Time PCR	44
7. Analiza statystyczna	45
IV WYNIKI.....	47
V DYSKUSJA.....	67
1. Wpływ infuzji do zatoki jamistej okołoprzysadkowego kompleksu naczyniowego autologicznej krwi lub autologicznego osocza o fizjologicznym stężeniu tlenu węgla na poziom ekspresji genów <i>GnRH</i> , <i>GnRH-R</i> , <i>Lhb</i> , <i>Fshβ</i> i α	68
2. Wpływ infuzji do zatoki ocznej autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED na poziom melatoniny w krążeniu ogólnym.....	72
3. Wpływy infuzji do zatoki ocznej autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED na poziom ekspresji genów <i>GnRH</i> , <i>GnRH-R</i> , <i>Lhb</i> , <i>Fshb</i> i α	74
VI PODSUMOWANIE.....	80
VII WNIOSEK	81
VIII PIŚMIENNICTWO.....	84

STRESZCZENIE

Badanie biologicznego fenomenu sezonowej reprodukcji i mechanizmów leżących u jego podstaw obejmuje wiele zagadnień. Wśród nich znajdują się: identyfikacja czynników środowiskowych, które regulują te procesy oraz próby wyjaśnienia neurobiologicznej drogi odbierania i przetwarzania sygnałów środowiskowych. Fotoperiod jest głównym i najbardziej wiarygodnym czynnikiem synchronizującym roczne cykle reprodukcyjne sezonowo rozmnażających się zwierząt. Mechanizmy tej regulacji nie są do końca poznane. Dotychczasowe badania wskazują, że w fotoperiodycznej synchronizacji aktywności rozrodczej bierze udział nie jeden a co najmniej kilka systemów regulacyjnych, które mają swój początek w siatkówce oka i kończą się w generatorze pulsów GnRH.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy są następstwem wykazania sezonowej zmienności sekrecji CO w obszarze oka i mają za cel określenie drogą pośrednią czy tlenek węgla drogą przeciwprądowego przenikania w obszarze zatoki jamistej może bezpośrednio docierać do struktur mózgowych i wpływać na regulacje fizjologiczne u samców związane z rozrodem.

Do doświadczeń użyto 48 dojrzałych płciowo samców krzyżówki dzika europejskiego i świni domowej. Zwierzęta zostały przydzielone do dwóch analogicznych grup doświadczalnych.

W doświadczeniu pierwszym prowadzono 48-godzinną infuzję do zatoki żyłnej oka autologicznego osocza krwi o doświadczalnie podwyższonym stężeniu tlenu węgla. Taka sama procedura eksperymentalna została przeprowadzona na osobnych grupach zwierząt w okresie długich (czerwiec n=6) oraz krótkich (grudzień n=6) dni świetlnych. Odniesieniem do obu grup eksperymentalnych były prowadzone równolegle kontrolne grupy zwierząt (czerwiec n=6; grudzień n=6), którym w tych samych warunkach do zatoki żyłnej oka przez 48 godzin infundowano autologiczne osocze.

W doświadczeniu drugim prowadzono 48-godzinną infuzję do zatoki żyłnej oka autologicznej krwi poddanej naświetlaniu światłem LED. Taka sama procedura eksperymentalna została przeprowadzona na osobnych grupach zwierząt w okresie długich (czerwiec; n=6) oraz krótkich (grudzień; n=6) dni świetlnych. Odniesieniem do obu grup

eksperymentalnych były prowadzone równolegle kontrolne grupy zwierząt (czerwiec n=6; grudzień n=6), którym w tych samych warunkach do zatoki żyłnej oka przez 48 godzin infundowano autologiczną krew.

W każdej grupie doświadczalnej, w trakcie 48-godzinnej infuzji, od zwierząt w odstępach 2-godzinnych pobierano krew krążenia obwodowego do analiz stężenia hormonu luteotropowego, folikulotropowego oraz melatoniny. Po zakończeniu części eksperymentalnej w celu analizy ekspresji genów gonadoliberyny (*GnRH*), jej receptora (*GnRH-R*) oraz podjednostek gonadotropin (α , *Lh β* , *Fsh β*) od zwierząt, poubojowo, pobierano przysadkę mózgową oraz podwzgórze. Tkanki zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C do momentu wykonania analizy ekspresji genów.

Stężenie hormonów w żyłnej krwi obwodowej oznaczano metodą radioimmunologiczną. Ekspresję genów gonadoliberyny (*GnRH*), jej receptora (*GnRH-R*) oraz podjednostek gonadotropin (α , *Lh β* , *Fsh β*) w tkankach podwzgórza oraz przysadki mózgowej oznaczono metodą Real-Time PCR.

Wyniki badań wykazały, że doświadczalne zwiększenie stężenia CO we krwi żyłnej odpływającej z oka do żyłnej zatoki jamistej okołoprzysadkowego kompleksu naczyniowego u obu grup doświadczalnych samców krzyżówek świni domowej i dzika, spowodowało zarówno w okresie krótkich jak i długich dni świetlnych zmiany w poziomie ekspresji genów osi podwzgórzowo-przysadkowej (*GnRH*, *GnRH-R*, α , *Lh β* , *Fsh β*). Jednocześnie wykazano wzrost sekrecji LH w sezonie letnim i jej obniżenie w sezonie zimowym. Zwiększenie stężenia CO w krwi odpływającej z zatoki ocznej istotnie wpłynęło również na dobowy profil sekrecji melatoniny.

Podsumowując, wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy wskazują, że tlenek węgla wytwarzany pod wpływem światła w oku dociera drogą przeciwpłukowego przenikania w obszarze splotu okołoprzysadkowego z naczyń żylnych do tętniczych zaopatrujących bezpośrednio mózg i wpływa na ekspresję genów osi podwzgórzowo-przysadkowej krzyżówki świni domowej i dzika a w konsekwencji na sekrecję hormonów regulujących procesy rozrodcze.

ABSTRACT

Investigation into the biological phenomenon of seasonal reproduction, and its underlying regulatory mechanisms has focused on a wide variety of topics. These include identification of environmental cues which regulate the process and elucidation of the neurobiological pathway for perception and processing of these environmental cues. Photoperiod is the most reliable cue for timing reproduction in seasonal breeding animals. The mechanisms in this regulation are not well understood. Previous studies indicate that in photoperiodic synchronization of the reproductive activity there are involved at least a few regulatory systems, which start with the retina and end at the GnRH pulse generator.

This work is the next step of previous research which shown that the secretion of CO in the eye into the ophthalmic venous blood of the wild boar and pig crossbreed changes depending on season. The aim of this work is to determine by indirect way whether carbon monoxide by counter-current exchange in the perihypophyseal vascular complex may be destination transported to the brain and influence the neural centers of the brain regulating the reproductive processes.

48 sexually mature wild boar and domestic pig crossebred males were used. The experimental animals were assigned to two treatment groups:

In the first experiment the animals received autologous blood plasma infused into the ophthalmic venous sinus for 48 hours with an experimentally induced increase in CO concentration. The identical procedure was performed during the longest days of summer (n=6) and during the shortest days of winter (n=6). Control groups (June n=6; December n=6) received autologous blood plasma infused into the ophthalmic venous sinus for 48 hours.

In the second experiment the animals received autologous blood infused into the ophthalmic venous sinus for 48 hours with an experimentally induced increase in the CO concentration, achieved by two-hour irradiation by LED light. The identical procedure was performed during the longest days of summer (n=6) and during the shortest days of winter (n=6). Control groups (June n=6; December n=6) received autologous blood infused into the ophthalmic venous sinus for 48 hours.

All animals were sampled at 2-hr intervals for 48 hr for LH, FSH and melatonin content in peripheral blood. In order to analyze the effect of CO on *GnRH* and *GnRH-R mRNA* and gonadotropin subunits (α , *Lh β* , *Fsh β*) *mRNA* levels, animals in each group were sacrificed after 48h infusion with the experimentally induced increase of concentration of CO. The hypothalamus and pituitary gland were immediately removed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis of gene expression.

The peripheral blood samples were used to determine the concentration of hormones using the radioimmunological method. The *GnRH* and *GnRH-R mRNA* and gonadotropin subunits (α , *Lh β* , *Fsh β*) *mRNA* levels were determined by Real-Time quantitative PCR.

The elevated CO concentration in the blood flowing out of the ophthalmic venous sinus in both experimental groups of males of the wild boar and domestic pig crossbred led to changes in the expression of hypothalamo-pituitary axis genes (*GnRH*, *GnRH-R* and gonadotropin subunits: α , *Lh β* and *Fsh β*) during long and short days. There was shown increase in LH secretion in the summer and decrease in LH secretion in the winter. The elevated CO concentration in the blood flowing out of the ophthalmic venous sinus had significant affect on melatonin secretion circadian profile.

To sum up, the results of this study show that light-induced carbon monoxide produced in the eye may be transported in the venous blood and transferred, by counter-current mechanism, to the arterial blood in the perihypophyseal vascular complex and then carbon monoxide can influence the neural centers of the brain regulating the reproductive processes.

I WSTĘP

1. Sezonowość w rozrodzie u ssaków

Konsekwencją złożonych ruchów Ziemi wokół Słońca jest następstwo dnia i nocy, sezonowe zmiany długości dnia oraz kąta padania promieni słonecznych na Ziemię. W wyniku cyklicznych zmian napromieniowania, na powierzchni Ziemi występują regularne zmiany w klimacie (pory roku) o amplitudzie szczególnie nasilonej w strefach średniej i wysokiej szerokości geograficznej. Następstwo pór roku wpływa na wegetację roślin determinując dostępność pożywienia dla zwierząt roślinożernych a w konsekwencji dla mięsożerców. W toku ewolucji zwierzęta wykształciły liczne strategie radzenia sobie z cyklicznie zmieniającymi się warunkami środowiskowymi, zwiększające szanse na przetrwanie surowych warunków życia w zimie lub w porze suchej. U wielu gatunków ssaków natężenie procesów metabolicznych, ilość spożywanego pokarmu, masa ciała, kolor oraz jakość sierści czy jakość pokrywy włosowej zmienia się w określonych cyklach rocznych. Aktywności wymagające wysokich kosztów energetycznych zbiegają się z optymalnymi warunkami klimatycznymi oraz z obfitością lokalnych zasobów żywności.

Wiele gatunków zwierząt żyjących w strefie umiarkowanej dostosowuje swoją fizjologię reprodukcyjną do występujących w cyklu rocznym zmian w środowisku naturalnym. Ograniczenie aktywności rozrodczej do określonego okresu roku, jest jedną z najważniejszych strategii ewolucyjnych zwierząt, zwiększających ich szanse na sukces biologiczny jakim jest posiadanie potomstwa. Proces reprodukcji wymaga ogromnych wydatków energetycznych związanych z aktywnością w okresie rui, ciąży, opieki nad potomstwem czy obroną terytorium. Nowo narodzone potomstwo jest bardziej wrażliwe na niekorzystne warunki środowiska niż jego rodzice. Sezonowość rozrodu zapewnia przyjsię na świat potomstwa w warunkach środowiska, w których będzie ono miało największe szanse na przetrwanie oraz najkorzystniejsze warunki do wzrostu i rozwoju (Wayne i wsp., 1989).

Badanie biologicznego fenomenu sezonowej reprodukcji i mechanizmów leżących u jego podstaw obejmuje wiele zagadnień. Wśród nich znajdują się: identyfikacja czynników

środowiskowych, które regulują te procesy oraz próby wyjaśnienia neurobiologicznej drogi odbierania i przetwarzania sygnałów środowiskowych.

Decyzja o rozpoczęciu okresu rozrodczego podejmowana jest przy udziale różnych bodźców środowiskowych, informujących o aktualnym lub przyszłym stanie środowiska, pełniących rolę czynników modulujących działanie zegara wewnętrznego. Tylko nieliczne sygnały są w stanie wiarygodnie informować, z odpowiednim wyprzedzeniem, o zbliżającej się zmianie warunków środowiskowych. Podstawowym czynnikiem sygnalnym, o cyklicznym i wysoko powtarzalnym charakterze u większości zwierząt jest fotoperiod tj. określony stosunek długości dnia do długości nocy lub też kierunkowa zmiana tego parametru (Karsch i wsp., 1984). Nadrzędność tego czynnika, w sezonowej synchronizacji aktywności rozrodczej zwierząt nad zmiennymi środowiskowymi takimi jak np., temperatura czy opady deszczu, ma swój wyraz w klasyfikacji tych gatunków zwierząt do dwóch grup. W zależności od długości ciąży, gatunki fotoperiodyczne są klasyfikowane, jako zwierzęta dnia długiego lub zwierzęta dnia krótkiego. Odpowiednie wyprzedzenie aktywności seksualnej gwarantuje przyjście na świat potomstwa w optymalnych warunkach środowiskowych. Ssaki z bardzo krótkim okresem ciąży takie jak chomiki (Bruce i Hindle, 1934) czy myszy (Petterborg i Reiter, 1980) swoją aktywność rozrodczą rozpoczynają po przesileniu zimowym w odpowiedzi na wydłużający się dzień. W tej samej grupie zwierząt są również konie, u których z kolei ciąża trwa znacznie dłużej, bo około 300 dni. Zwierzęta takie jak jeleń, dzik, sarna, niedźwiedź, koza i owca, z kilkumiesięcznym okresem ciąży, aktywność rozrodczą podejmują zwykle jesienią, kiedy dzień zaczyna się skracać (Hafez, 1950; Ortavant i wsp., 1964). Sezonowość rozrodu występuje głównie u dzikich gatunków zwierząt i jest wynikiem naturalnej selekcji. Domestykacja i sztuczna selekcja przyczyniły się do zminimalizowania wpływu sezonu na aktywność rozrodczą zwierząt.

Istotność zagadnienia sezonowego rozrodu, wynika z faktu, że jest to odwracalny proces płodności. Uważa się, że zrozumienie mechanizmów, które nim rządzą, doprowadzi do nowego spojrzenia na systemy regulacyjne rozrodu szczególnie u gatunków, które są istotne do produkcji żywności, włókien, futra, jak również do rozmnażania się człowieka.

Wiele różnych gatunków zwierząt rozmnażających się sezonowo jest wykorzystywanych do badania szerokiego spektrum tego zjawiska. W niniejszej pracy, jako model do badania wpływu tlenu węgla na ekspresję genów podjednostek gonadotropin w strukturach centralnego układu nerwowego wykorzystano świniodzik, krzyżówkę samicy świni domowej (*Sus scrofa f. domestica*) i samca dzika europejskiego (*Sus scrofa scrofa*).

Okres rozrodczy dzika europejskiego ma miejsce późną jesienią - wczesną zimą. Warchlaki przychodzą na świat wiosną, kiedy warunki klimatyczne i źródło pożywienia maksymalizuje szanse na przetrwanie. Po wydania na świat potomstwa, locha dzika pozostaje w anestrus do następnej zimy. Początkowo anestrus jest związane z laktacją, ale po odstawieniu małych lochy pozostają w anestrus do następnego sezonu rozrodczego.

Świnia domowa nie przejawia silnej sezonowości w rozrodzie, ale wykazuje wyraźne obniżenie płodności późnym latem i wczesną jesienią, w tym samym czasie, kiedy dzik europejski, jej przodek, pozostaje w anestrus. Sezonowe obniżenie płodności u świni przejawia się niższym współczynnikiem porodów, opóźnionym dojrzewaniem loszek (Love, 1978; Peltoniemi i wsp., 1999). U samców obserwuje się sezonową fluktuację w produkcji nasienia. Wraz ze skracającym się dniem zwiększa się objętość ejakulatu, całkowita liczba plemników w ejakulacie i procentowy udział ruchliwych plemników. Jesienią i wczesną zimą wzrasta poziom hormonów płciowych w plazmie nasienia oraz poziom testosteronu w osoczu krwi (Strzeżek, 1998).

Świniodzik jest szczególnie użytecznym modelem w badaniu mechanizmów rządzących sezonowym rozrodem. U tego zwierzęcia, podobnie jak u dzika został zachowany wyraźny fotoperiodyzm, natomiast w odróżnieniu od niego jest zwierzęciem znacznie bardziej łagodnym, co ułatwia przeprowadzanie wszelkich procedur doświadczalnych. Zaletą są również jego duże rozmiary, co w porównaniu ze zwierzętami modelowymi takimi jak gryzonie, umożliwia przeprowadzanie długoterminowych procedur doświadczalnych oraz zapewnia odpowiednią ilość materiału do badań.

2. Rytm biologiczny; zegar okołodobowy

W mózgu ssaków, funkcję zegara biologicznego pełni jądro nadskrzyżowaniowe (ang. *suprachiasmatic nuclei*; SCN). Ten obszar mózgu stanowi rdzeń systemu

fotoendokrynnego, skomplikowanego obwodu nerwowego, który synchronizuje funkcje organizmu z cyklicznie zmieniającymi się warunkami oświetlenia (cyklem dzień - noc). Pośredniczy on m.in. w (1) regulacji zachowań rytmicznych wynikających z fotorecepcji, (2) reakcji źrenicy na światło czy (3) regulacji syntezy melatoniny w szyszynce (Van Gelder, 2001).

Istota unikalnej pracy zegara okołodobowego opiera się na generacji interwałów czasowych (~24 godzinnych) w pojedynczych neuronach SCN przez oscylującą, w funkcji czasu światło-ciemność, pętlę sprzężeń zwrotnych na poziomie transkrypcji i translacji genów zegara, takich jak *Bmal1*, *Clock*, *Per* i *Cry* (Dunlap, 1999; Reppert i Weaver, 2002; Young i Kay, 2001). Kompleksem aktywującym w pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego jest heterodimer powstający w wyniku dimeryzacji białka BMAL1 (*brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-like*) i CLOCK (ang. *circadian locomotor output cycles kaput*) (BMAL1/CLOCK) lub NPAS2 (ang. *neuronal PAS domain-containing protein*) (BMAL1/NPAS2) (Gekakis i wsp., 1998; Reick i wsp., 2001; Hogenesch i wsp., 1998). Kompleksy BMAL1/CLOCK (lub NPAS2) przyłączają się do enhancera E-box na promotorach genów *Period 1 (Per1)*, *Period 2 (Per2)*, *Period (Per)* oraz *Cryptochrome (Cry)* aktywując ich ekspresję (Reick i wsp., 2001; Griffin i wsp., 1999; Kume i wsp., 1999; Gekakis i wsp. 1998). Białkowe produkty tych genów (PER i CRY) tworzą ujemne kompleksy transkrypcyjne wiążące się z heterodimerami BMAL1/CLOCK (lub NPAS2) uniemożliwiając im aktywację transkrypcji genów *Per* i *Cry* (Yamada i Forger, 2010). Kinaza kazeinowa 1ε (CK1ε) oraz kinaza kazeinowa 1δ (CK1δ), fosforylują białka PER i CRY kierując je na drogę degradacji proteosomalnej, zamykając w ten sposób pętlę transkrypcyjno-translacyjną (Virshup i wsp., 2007). Dimer BMAL1/CLOCK jest również aktywatorem transkrypcji genów *Rora* (ang. *retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha*) i *Rev-erba* (receptor jądrowy Rev-Erba; NR1D1). Produkty tych genów przyłączają się do sekwencji promotorowej genu *Bmal1* stymulując (RORα) lub tłumiąc (REV-ERBα) jego transkrypcję (Preitner i wsp., 2002; Reppert i Weaver, 2002; Becker-Weimann i wsp., 2004).

Przy braku sygnałów środowiskowych mogących modulować działanie zegara okołodobowego, jego mechanizmu dodatnich i ujemnych sprzężeń zwrotnych oscyluje

w ~24-godzinny rytmie dzień-noc. Czynniki zewnętrzne takie jak światło, ale również temperatura czy dostępność pożywienia, mogą przyspieszać bądź opóźniać ten system, synchronizując jego działanie na podstawie informacji pochodzących ze środowiska (Pittendrigh, 1993; Takahashi, 1995).

2.1 Niewizualny przekaz informacji świetlnej z otoczenia do mózgu

U kręgowców, funkcję fotoreceptora w procesie „wejścia światła” w regulację rytmu okołodobowego pełni siatkówka (Berson, 2003; Berson i wsp., 2002). Rolę niewzrokowych (okołodobowych) fotoreceptorów w siatkówce ssaków stanowi mała populacja komórek zwojowych, mająca zdolność do bezpośredniego pochłaniania fotonów światła (ang. *intrinsically photosensitive retinal ganglion cells*; ipRGCs) przy maksimum czułości około 482 nm (Peirson i wsp., 2004). Komórki ipRGCs zawierają melanopsynę, światłoczuły pigment z rodziny opsyn i uważa się, że to właśnie on pełni w siatkówce rolę głównego chronobiologicznego detektora światła (Hall, 2000; Von Schantz i wsp., 2000).

Kodowana przez gen *Opn4* melanopsyna, należy do nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G (Hermann i wsp., 2005; Provencio i wsp., 1998). Łańcuch białkowy siedmiokrotnie przechodzi przez błonę komórkową tworząc w obrębie błony siedem hydrofobowych domen transbłonowych. W siódmej domenie transbłonowej melanopsyny występuje lizyna (Lys²⁹⁴), do której przyłącza się chromofor - 11-*cis*-retinal. Melanopsyna występuje tylko w ok. 2% komórek zwojowych, jednak ich wypustki dendrytyczne nakładają się na siebie i tworzą „fotorecepcyjną sieć” obejmującą cały obszar siatkówki (Berson i wsp., 2002; Hattar i wsp., 2002; Gooley i wsp., 2001; Provencio i wsp., 2002). Komórki zwojowe siatkówki wysyłają swoje aksony do struktur odpowiedzialnych za wytwarzanie i regulację rytmów okołodobowych: jąder nadskrzyżowaniowych przedniej części podwzgórza - miejsca głównego zegara biologicznego ssaków; kompleksu ciała kolankowatego bocznego (ang. *intergeniculate leaflet*; IGL), który uczestniczy w modulacji rytmów okołodobowych; brzuszno-bocznego jądra przedwzrokowego (ang. *ventrolateral preoptic nucleus*; VLPO) - struktury zaangażowanej w kontrolę rytmu sen-czuwanie; brzusznej części obszaru okołokomorowego (ang. *ventral subparaventricular zone*; vSPZ) - rejonu mózgu uczestniczącego w kompleksowej regulacji rytmów okołodobowych oraz do struktury odpowiedzialnej za odruch zwężania źrenicy pod

wpływem światła - przedpokrywowego jądra oliwki (ang. *olivary pretectum nucleus*; OPN) (Berson, 2003; Dacey i wsp., 2005; Gooley i wsp., 2003; Hannibal i wsp., 2002; Hannibal i wsp., 2004; Hattar i wsp., 2002). W uzasadnieniu dominującej roli melanopsyny w systemie niewizualnego odbioru i kodowania informacji świetlnej, w licznych publikacjach, przedstawia się badania na genetycznie modyfikowanych, pozbawionych pręcików i czopków, szczepach myszy (*rd/rd*, *rd/rd cl*), których brak nie zmienia chronobiologicznej odpowiedzi na światło (supresja nocnych poziomów melatoniny, hamowanie nocnej aktywności ruchowej, synchronizacja rytmu aktywności ruchowej do cyklu oświetlenia, przesunięcie faz okołodobowego rytmu aktywności ruchowej nie wpływa na odruch zwężania źrenicy pod wpływem światła) (Brainard i Hanifin, 2005; Foster, 2002; Freedman i wsp., 1999; Lucas i Foster, 1999; Lucas i wsp., 1999; Lucas i wsp., 2003; Melyan i wsp., 2005; Montell, 2005; Morin i wsp., 2003; Mrosovsky i Hattar, 2003; Mrosovsky i wsp., 2001; Von Schantz i wsp., 2000). Mechanizm fototransdukcji z udziałem melanopsynowych komórek zwojowych siatkówki nie jest do końca poznany. W badaniach na zwierzętach wykazano, że w systemie „widzenia chronobiologicznego” udział biorą zarówno światłoczułe komórki zawierające melanopsynę jak i klasyczne, utrzymujące z komórkami ipRGCs kontakt synaptyczny, fotoreceptory, pręciki i czopki (Do and Yau, 2010; Belenky i wsp., 2003; Pepe, 2001; Provencio i wsp., 1998).

W wyniku ekspozycji na światło, w komórkach melanopsynowych dochodzi do opóźnionej, ale jednocześnie długo utrzymującej się depolaryzacji błony komórkowej (Panda i wsp., 2005; Provencio i wsp., 2000). Przypuszcza się, że pochłonięcie fotonów światła przez kompleks melanopsyna-11-*cis*-retinal prowadzi do aktywacji białka G_q/G_{11} z następującą stymulacją fosfolipazy C (PLC) i wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia wolnych jonów wapniowych $[Ca^{2+}]_i$, wywołującym falę wapniową (Melyan i wsp., 2005; Panda i wsp., 2005; Qiu i wsp., 2005). Pobudzone komórki zwojowe siatkówki indukują dalszy impuls, przez wydzielenie neurotransmiterów szlaku siatkówkowo-podwzgórzowego: kwasu glutaminowego i peptydu stymulującego przysadkową cyklazę adenylową (ang. *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*; PACAP), do jąder nadskrzyżowaniowych (Hannibal i wsp., 2002). Na szlaku eferentnym informacja,

zakodowana w rytmicznej aktywności jądra nadskrzyżowaniowego, jest przetwarzana i ulega propagacji w organizmie na drodze humoralnej i/lub nerwowej.

Głównym efektem systemu fotoendokrynnego jest szyszynka, gruczoł odpowiedzialny za syntezę neurohormonu - melatoniny. Przetworzony w SCN sygnał jest przesyłany do jądra przykomorowego a następnie do pokrywy międzymózgowia. Po opuszczeniu mózgu, sygnał dociera do jądra pośrednio-bocznego rdzenia kręgowego, gdzie osiąga zwój górny szyjny, którego włókna zazwojowe unerwiają szyszynkę. Nocą, gdy aktywność neuronów jądra nadskrzyżowaniowego zmniejsza się, następuje wzrost pobudzenia elektrofizjologicznego zazwojowych włókien współczulnych, z których zakończeń uwalniana jest norepinefryna (NE), dominujący neurotransmitter w regulacji syntezy melatoniny u ssaków (Arendt, 1995; Reiter, 1991; Zawilska i Nowak, 1999). Szlak noradrenalinowy kieruje informację o warunkach oświetlenia do receptorów β_1 i częściowo α_1 adrenergicznych szyszynki. Stymulacja pinealocytów norepinefryną zapoczątkowuje sekwencję molekularnych procesów. Aktywacja receptorów α_1 prowadzi do podniesienia wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia ($[Ca^{2+}]_i$). W wyniku pobudzenia receptorów β_1 następuje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP, co prowadzi do stymulacji kinazy białkowej A (PKA) (Fain i wsp., 2001; Foster, 2005) a w konsekwencji do aktywacji kluczowego w procesie syntezy melatoniny enzymu *N*-acetyltransferazy (ang. *aralkylamine N-acetyltransferase*; AANAT). U wszystkich ssaków wraz z nastaniem nocy wzrasta stopień syntezy melatoniny w szyszynce, skąd jest ona bezpośrednio wydzielana do krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego (Reiter, 1991). Cykliczne zmiany amplitudy stężenia melatoniny w krążeniu ogólnym, dostarczają komórkom docelowym informacji o panujących warunkach oświetlenia środowiska – następstwie dnia i nocy (Reiter, 1993). Sezonowe zmiany długości dnia są odczytywane w organizmie na podstawie różnic w czasie trwania podniesionej, nocnej sekrecji melatoniny (Reiter, 1973).

3. Oś reprodukcyjna podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalna (HPG) ssaków

Podstawową strukturą w hormonalnej regulacji rozrodu ssaków jest zespół trzech gruczołów dokrewnych: podwzgórze-przysadka-gonady, zwany również osią rozrodczą (ang. *hypothalamo-pituitary-gonadal axis*; HPG). Wzajemna regulacja ogniw osi HPG

odbywa się na zasadzie mechanizmów sprzężeń zwrotnych, i jest kluczowa w utrzymaniu właściwej synchronizacji funkcji wszystkich narządów układu rozrodczego.

Komórki neurosekrecyjne podwzgórza, syntetyzują hormon uwalniający gonadotropiny (ang. *gonadotropin-releasing hormone*; GnRH) (Bronson, 1990; Levine, 2003; Herbison, 2005), który pełni nadrzędną rolę w neuroendokrynnym szlaku syntezy i sekrecji hormonów przysadkowych: luteinizującego, nazywanego również lutropiną (ang. *luteinizing hormone* - LH) i folikulotropowego, zwanego również folitropiną (ang. *follicle-stimulating hormone* - FSH), odpowiednio zmieniając aktywność osi HPG. U większości gatunków ssaków, neurony GnRH w centralnym układzie nerwowym występują w obszarze przedwzrokowym i przyległych obszarach przedniej części podwzgórza (Wray, 2001). Nie tworzą one skupisk nerwowych, ale luźną sieć, rozciągającą się na wiele struktur cytoarchitektonicznych, której zakończenia znajdują się na kapilarach przysadkowego układu wrotnego na poziomie wyniosłości pośrodkowej (ang. *median eminence*; ME) (Apter, 1997). Ta funkcjonująca w skoordynowany sposób sieć neuronów, zwana również generatorem pulsów GnRH, jest zasadniczym elementem regulującym funkcje reprodukcyjne (Knobil, 1990). Specyficzny, zmienny wzór uwalniania GnRH, na który składa się częstotliwość i amplituda pulsów, jest kluczem utrzymania prawidłowych funkcji rozrodczych oraz steroidogenezy gonadowej. GnRH jest uwalniany w zsynchronizowanych pulsach z zakończeń nerwowych około 1000 neuronów do krążenia wrotnego przysadki z częstotliwością, co 30-120 minut.

Komunikacja między podwzgórzem a przysadką mózgową odbywa się na drodze krótkiej pętli sprzężenia zwrotnego. Docierając do przysadki mózgowej GnRH łączy się z specyficznymi receptorami (ang. *gonadotropin-releasing hormone receptor*; GnRH-R) zlokalizowanymi w błonie plazmatycznej komórek gonadotropowych w przednim płacie przysadki. Aktywacja receptora GnRH, poprzez regulację w mechanizmie sprzężenia zwrotnego dodatniego przynajmniej czterech genów: (1) wspólnej podjednostki α gonadotropin, (2) specyficznej podjednostki β hormonu luteinizującego ($Lh\beta$) oraz (3) folikulotropowego ($Fsh\beta$) (Hamernick i Nett, 1988; Gharib i wsp., 1990), jak również (4) genu *GnRH-R* (Sealfon i Millar, 1995), prowadzi do syntezy i sekrecji LH i FSH (Clayton i Catt, 1981; Clarke i wsp., 1983). Z krążeniem obwodowym, LH i FSH docierają do

gonad, gdzie łączą się ze swoimi receptorami, regulując procesy reprodukcyjne: steroidogenezę i gametogenezę (Burger i wsp., 2004). Lutropina wpływa na czynność komórek osłonki wewnętrznej pęcherzyków jajnikowych, pobudzając wydzielanie androgenów. Wyrzut LH w połowie cyklu wywołuje owulację, a w fazie lutealnej pobudza ciało żółte do sekrecji progesteronu (Velardo, 1960). U samców lutropina wpływa na produkcję testosteronu (Weissenberg i wsp., 1982). Folitropina promuje rozwój pęcherzyków jajnikowych, wpływając na podziały mitotyczne komórek ziarnistych, stymuluje aktywność aromatazy i wydzielanie estradiolu (Velardo, 1960; Weissenberg i wsp., 1982). Hormony steroidowe mogą dostarczać negatywnego lub pozytywnego sprzężenia kontrolując produkcję zarówno GnRH na poziomie podwzgórza jak i gonadotropin z przysadki mózgowej (Nakai i wsp., 1978; Conn i Crowley, 1994; McNeilly i wsp., 2003).

3.1 Hormon uwalniający gonadotropiny (GnRH) - produkcja, sekrecja i rola w osi reprodukcyjnej

Wyizolowany po raz pierwszy z podwzgórza ssaków GnRH (zwany GnRH-I) (Schally i wsp., 1971; Matsuo i wsp., 1971; Baba i wsp., 1971) jest hormonem białkowym składającym się z 10 aminokwasów (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pr-Gly-NH₂), który oprócz swojej dobrze znanej funkcji endokrynnej, jest potencjalnie istotnym autokrynnym i/lub parakrynnym regulatorem w jajnikach, łożysku, macicy i układzie immunologicznym (Emons i wsp., 1998; Islami i wsp., 2001; Kang i wsp., 2001; Zhao i wsp., 2000; Chegini i wsp., 2002; Chen i wsp., 2002; Chou i wsp., 2003a; Chou i wsp., 2003b; Sakamoto i wsp., 2003). U ssaków, poza GnRH-I, został zidentyfikowany również drugi podtyp GnRH (GnRH-II, z uwagi na to, że po raz pierwszy został wyizolowany z mózgu kurcząt, zwany również kurczęcym (Miyamoto i wsp., 1984)), różniący się sekwencją aminokwasów, lokalizacją i pochodzeniem embrionalnym (Miyamoto i wsp., 1984; White i wsp., 1998). Ta druga, prawdopodobnie najstarsza forma GnRH różni się od GnRH-I trzema aminokwasami w pozycji 5, 7 i 8 (His⁵Trp⁷Tyr⁸GnRH-I) i z doskonale zachowaną strukturą jest obecna u wszystkich badanych dotąd kręgowców, począwszy od ryb kostnoszkieletowych kończąc na człowieku (White i wsp., 1998; Millar, 2003). Biologiczne funkcje GnRH-I i GnRH-II są jednak różne. Podczas gdy GnRH-I odgrywa główną rolę w regulacji reprodukcji przez stymulację uwalniania z przysadki LH i FSH,

GnRH-II uczestniczy głównie w regulacji dojrzewania płciowego, zachowań reprodukcyjnych, żywienia i równowagi energetycznej (Cheng i Leung, 2005).

GnRH-I, jest wytwarzany w neuronach GnRH-ergicznym podwzgórza w postaci dużego prohormonu, gdzie następnie zostaje poddany enzymatycznemu przekształceniu do decapeptydu. Aktywna forma hormonu jest przechowywana w granulach sekrecyjnych, transportowanych w dół aksonu do okolicy zewnętrznej wyniosłości pośrodkowej (Fink, 1988; Seeburg i wsp., 1987). Regulacja wydzielania GnRH-I w podwzgórzu ssaków jest złożonym systemem, na który składają się wewnętrzne cechy komórek nerwowych tworzących generator pulsów, jak również wzajemne pobudzające i hamujące oddziaływania neuroprzekaźników i neurohormonów będące wypadkową działania bodźców środowiska zewnętrznego (np. fotoperiodu) i wewnętrznego (np. steroidów gonadowych, stanu odżywienia organizmu).

3.2 Regulacja transkrypcji genów gonadotropin

Gonadotropiny przysadkowe, LH i FSH należą do rodziny hormonów glikoproteinowych, posiadających wiele strukturalnych podobieństw. Każdy z członków tej rodziny, do której należą również przysadkowy hormon tyreotropowy (ang. *thyroid-stimulating hormone*; TSH) i gonadotropina łożyskowa (ang. *chorionic gonadotropin*; CG), jest heterodimerem, składającym się z glikoproteinowej podjednostki α o sekwencji aminokwasowej identycznej dla wszystkich hormonów tej rodziny oraz odrębnej podjednostki β , która stanowi o biologicznej specyficzności hormonu (Cone i wsp., 2003). Głównym ośrodkowym czynnikiem koordynującym endokrynną mechanizm gonadotropowy jest gonadoliberyna (GnRH-I). Zmienny wzorzec pulsacyjnie uwalnianego GnRH-I decyduje o podstawowym i okołooowulacyjnym uwalnianiu gonadotropin, lecz pełni też krytyczną rolę w aktywacji transkrypcji genów α , *Lhb* i *Fshb*, których promotory odznaczają się specyficzną wrażliwością na częstotliwość pulsów GnRH-I. W badaniach wykorzystujących model owarietomizowanych samic szczura wykazano, że transkrypcja genu podjednostki α jest najbardziej wydajna przy wysokiej częstotliwości pulsów GnRH-I (1 puls/8-30 minut), ale *mRNA* α jest syntetyzowany również w niższej częstotliwości pulsów. Największa stymulacja poziomu *mRNA* podjednostki *Lhb* ma miejsce w odpowiedzi na pośrednią częstotliwość pulsów GnRH-I (1 puls/30-60 minut), natomiast

transkrypcja genu podjednostki *Lhb* jest faworyzowana w wolniejszych interwałach pulsów (1 puls GnRH/120-240 minut) (Haisenleder i wsp., 1991; Shupnik, 1990). Mechanizm, w którym informacja zakodowana we frekwencji pulsów GnRH-I reguluje transkrypcję każdej z podjednostek gonadotropin nadal pozostaje niewyjaśniony. Najprawdopodobniej ma on również rytmiczną naturę i opiera się, na co najmniej trzech mechanizmach subkomórkowych: szlakach sygnalizacyjnych, które są stymulowane i tłumione, białkach, które są produkowane i degradowane, czynnikach transkrypcyjnych przyłączających się i odłączających od DNA.

3.3 Szlak sygnalizacyjny GnRH-I

Ścieżki sygnałowe, przez które GnRH-I może wywoływać swe efekty docelowe, są niezwykle różnorodne. Punktem uchwytu dla tego hormonu jest receptor metabotropowy (GnRH-R) związany funkcjonalnie z białkami $G_{q/11\alpha}$, posiadającymi 7 domen transbłonowych. Receptor ten ulega ekspresji zarówno w przysadce, gonadach, macicy i łożysku, jak i w narządach niezaangażowanych bezpośrednio w reprodukcję, np. w nerkach, wątrobie, mięśniu sercowym i mięśniach szkieletowych (Stojilkovic i wsp., 1994; Ruf i wsp., 2003; Millar i wsp., 2004). Związanie się GnRH-I ze swoim receptorem inicjuje aktywację klasycznych efektorów sygnalizacji przez początkową rekrutację fosfolipazy C, która przez hydrolizę fosfatydyloinozytolu uwalnia diacyloglicerol i 1,4,5-trójfosforan inozytolu (IP_3). Gwałtowny wzrost stężenia IP_3 w komórce odpowiada za natychmiastową mobilizację wewnątrzkomórkowego wapnia (Ca^{2+}) co skutkuje wzrostem uwalniania gonadotropin z przysadki mózgowej. Wzrost poziomu diacylogliceroli prowadzi do aktywacji kilku izoenzymów kinazy białkowej C, co aktywuje złożoną sieć sygnalizacyjną decydującą o skutkach działania GnRH (Liu i wsp., 2002; Millar i wsp., 2004). W mechanizmie zależnym od PKC aktywacji ulegają wszystkie cztery szlaki kinaz aktywowanych mitogenem (*MAP kinase*): p42 MAPK (ang. *p42 MAP kinase/extracellular signal-regulated kinase 2*), JNK (ang. *c-jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase*), p38MAPK (ang. *p38 MAP kinase/cytokine suppressive anti-inflammatory drug binding protein*), BMK (ang. *big MAP kinase/extracellular signal-regulated kinase 5*) (Naor i wsp., 2000). Kaskady MAPK są kluczowym składnikiem wewnątrzkomórkowej sygnalizacji indukowanej receptorem związanym z białkami G (GPCR) i mogą odgrywać rolę w transkrypcyjnej regulacji genów kodujących gonadotropiny.

4. Regulacja sezonowej aktywności osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalnej

Fotoperiod jest głównym i najbardziej wiarygodnym czynnikiem synchronizującym roczne cykle reprodukcyjne sezonowo rozmnażających się zwierząt (Paul i wsp., 2009; Prendergast, 2010). Mechanizmy tej regulacji nie są do końca poznane. Dotychczasowe badania wskazują, że w fotoperiodycznej synchronizacji aktywności rozrodczej bierze udział nie jeden a co najmniej kilka systemów regulujących, które mają swój początek w siatkówce oka i kończą się w generatorze pulsów GnRH (Malpaux i wsp., 2002; Adams i wsp., 2006; Ciechanowska i in., 2010). Rola melatoniny w transdukcji sygnału o warunkach oświetlenia na oś reprodukcyjną była i nadal jest przedmiotem uwagi licznych autorów. Przeprowadzone na owcach badania wykazały, że regulujący wpływ melatoniny na układ podwzgórzowo-przysadkowy odbywa się za pośrednictwem receptorów melatoninowych obecnych w środkowo-podstawnej części podwzgórza (ang. *mediobasal hypothalamus*; MBH), w miejscu gdzie brak jest neuronów GnRH (Malpaux i wsp., 1998). Działanie melatoniny w tym mechanizmie nie jest zatem bezpośrednie, lecz odbywa się przez sieć połączeń interneuronalnych w skład której wchodzi m.in. nerwowe szlaki dopaminergiczne (Goodman i wsp., 2010), noradrenergiczne (Goodman i wsp., 1995), serotonergiczne (Le Corre i Chemineau, 1993), opioidergiczne (Skinner i Herbison, 1997) oraz GABAergiczne (Scott i Clarke, 1993). Sygnały melatoninowe kodujące fotoperiod są takie same zarówno u zwierząt dnia krótkiego jak i długiego, zatem ich interpretacja w przełożeniu na aktywność osi rozrodczej musi być różna (Gerlach i Aurich, 2000). U zwierząt, u których długi, bądź wydłużający się dzień jest sygnałem do podjęcia aktywności rozrodczej, takich jak koń, czy chomik, wydłużenie czasu podniesionego poziomu sekrecji melatoniny prowadzi do spadku wydzielania GnRH a tym samym potencjału rozrodczego. Jednak ten sam, wystarczająco długi sygnał melatoninowy u zwierząt dnia krótkiego, takich jak np. owca, zmienia pulsacyjną sekrecję GnRH z podwzgórza, prowadząc do podniesienia pulsacyjności lub wyższej amplitudy pulsów sekrecji LH z przysadki mózgowej (Grosse i in. wsp., 1993). W procesie interpretacji sygnału melatoninowego istotny jest udział jajnikowych steroidów płciowych (estradiol) dostarczanych do mózgu. U owiec, sezonowe anestrus w warunkach długiego dnia jest wynikiem podniesionej receptywności podwzgórza na ujemne sprzężenie estradiolu (E_2),

w którym uczestniczy układ dopaminergiczny (Bertrand i wsp., 1998; Havern i wsp., 1994). Mechanizmem odpowiedzialnym za ten proces jest zmieniający się w zależności od sezonu potencjał przepuszczalności bariery krew-mózg dla steroidów (Thiery i Malpoux, 2003, Thiery i wsp. 2006). Badania przeprowadzone przez Peacock (1991) na owarietomizowanych loszkach wykazały jednak, że teoria negatywnego sprzężenia zwrotnego hormonów steroidowych nie tłumaczy w pełni wpływu sezonu na aktywność osi podwzgórzowo-przysadkowej. Sekrecja LH u tych zwierząt zmieniała się w odpowiedzi na fotoperiod mimo braku estradiolu. W 2003 roku na scenę endokrynologii rozrodu weszła kisspeptyna, jako kluczowy regulator różnorodnych aspektów rozrodu, a przede wszystkim stymulacji sekrecji gonadoliberyny/hormonu luteinizującego (GnRH/LH) (De Roux i wsp., 2003; Funes i wsp., 2003; Seminara i wsp., 2003). W badaniach na owcach wykazano, że aktywność metaboliczna komórek produkujących kisspeptynę (neurony KiSS-1) obecnych w podwzgórzu w neuronach jądra łukowatego (ang. *nucleus arcuatus*; ARC) może być regulowana przez hormony steroidowe (estradiol i progesteron), sugerując, że komórki te mogą być częścią systemu sprzężeń zwrotnych regulujących układ rozrodczy. Jednocześnie na neuronach KiSS-1 jądra łukowatego, została potwierdzona obecność receptorów steroidowych, a tym samym możliwość bezpośredniego działania steroidów na komórki produkujące kisspeptynę. Wykazano również sezonowe zmiany w poziomie *KiSS-1 mRNA* w ARC; w czasie sezonowego anestrus poziom ekspresji genu *KiSS-1* był istotnie niższy niż w okresie rozrodczym. Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu hormonów steroidowych na neurony KiSS-1 w części przedwzrokowej podwzgórza (ang. *preoptic area*; POA) (Smith i wsp., 2007).

Fotoperiodyczna regulacja aktywności osi rozrodczej u sezonowo rozmnażających się zwierząt nie jest do końca poznana. Uzupełnienie brakujących ogniw złożonej sieci wzajemnych oddziaływań regulujących sezonową wrażliwość podwzgórza na hormony steroidowe może przyczynić się do zrozumienia mechanizmów, które rządzą tym odwracalnym i powtarzalnym procesem płodności.

5. Hipoteza badawcza

Zaburzenia na fizjologicznej drodze światła z oka do mózgu są najprawdopodobniej jedną z przyczyn występowania sezonowych zaburzeń afektywnych (SAD - ang. *seasonal*

affective disorder) (Oren i wsp., 2013; Wehr i wsp., 2001). Uwaga naukowców zajmujących się tym problemem, skupiona jest na poszukiwaniu cząsteczki lub cząsteczek, które pełnią rolę absorbujących światło receptorów i/lub mediatorów a których dysfunkcja sprzyja podatności na SAD. Melanopsyna wydaje się być dobrym kandydatem do pełnienia tej funkcji, nie daje jednak odpowiedzi na wszystkie pytania. Badania haplotypów genu melanopsyny w tym polimorfizmów pojedynczego nukleotydu wykazały, że jeden wariant zmiany sensu (P10L) ponad 5-krotnie podnosi ryzyko wystąpienia SAD, szczególnie dla homozygot dla tego wariantu genetycznego w porównaniu z innymi genotypami. Wariant ten jest jednak obecny tylko u 5% osób borykających się z problemem SAD (Roecklein i wsp., 2009). W 1996 roku, Oren, opublikował teoretyczny model "humoralnej fototransdukcji", jako komplementarną do mechanizmu działania melanopsyny drogę niewizualnego przekazu do mózgu informacji o warunkach oświetlenia. Model ten zakłada, że obecne w oku chromofory, takie jak hem, czy powstające w wyniku jego rozpadu barwniki żółciowe, absorbują fotony i docierając do mózgu niosą informację o aktualnych warunkach świetlnych (Oren, 1996; Oren i wsp., 2013).

Produktami degradacji hemu w enzymatycznej reakcji katalizowanej przez oksygenazę hemową (ang. *heme oxygenase*; HO) są równomolowe ilości tlenku węgla (CO), jonów żelaza (Fe^{2+}) i biliwerdyny która jest natychmiast przekształcana w bilirubinę (Maines, 1997; Mancuso, 2004). Podobnie jak tlenek azotu (NO), tlenek węgla pełni w organizmie istotną rolę w sygnalizacji międzykomórkowej. Jego udział w procesach fizjologicznych został potwierdzony w m.in. w układzie nerwowym, immunologicznym oraz w układzie krążenia (Wang i wsp., 1997; Morita i wsp., 1997). Dostępne są również wyniki badań, które podkreślają udział tlenku węgla w regulacji funkcji układu rozrodczego, poprzez modulację uwalniania GnRH z podwzgórza (Errico i wsp., 2010; Lamar i wsp., 1996; Mancuso i wsp., 1997).

Oksygenaza hemowa występuje w postaci trzech izoform: HO-1, HO-2 oraz HO-3. Z dwóch funkcjonalnych izoform (HO-1 i HO-2) HO-1 jest łatwo indukowalna i ulega ekspresji w wyniku działania różnych bodźców stymulujących m.in.: dużego stężenia hemu, metaloporfiryny, promieniowania UVA, stresu oksydacyjnego czy tlenku azotu

i jego donorów. W warunkach prawidłowych HO-1 występuje w dużych ilościach w wątrobie i śledzionie, gdzie bierze udział w katabolizmie hemoglobiny uwolnionej z rozpadających się erytrocytów. Jej obecność została potwierdzona w czerwonych ciałkach krwi jak również w siatkówce oka gdzie najprawdopodobniej pełni funkcje protekcyjną w odpowiedzi na stres świetlny (Kutty i wsp., 1995; Cao i wsp., 2000). Izoforma HO-2 jest enzymem konstytutywnym, którego największe ilości stwierdza się w neuronach i komórkach śródbłónka; w mniejszych ilościach występuje w większości tkanek (Gibbons i Farrugia, 2004; Pouokam i wsp., 2011; Ryter i wsp., 2006; Takasuka i wsp., 2011).

Z uwagi na to, że światło jest jednym z czynników indukującym ekspresję HO-1 oraz potwierdzoną obecność tego enzymu w siatkówce oka (silnie unaczynionej) i erytrocytach, można sądzić, że w oku, w wyniku indukcji oksygenazy hemowej-1 dochodzi do wzrostu stężenia tlenu węgla, które jest zależne od intensywności promieniowania świetlnego. Do niedawna, CO i NO, były uważane za cząsteczki sygnałowe, których działanie jest jedynie lokalne. Badania ostatnich lat wykazały jednak możliwość ich transportu wraz z krwią żyłą. Powstały w wyniku utleniania tlenu azotu reaktywny jon nitrozoniowy łączy się z grupą sulfhydrylową cysteiny w cząsteczce hemoglobiny prowadząc do powstania S-nitrozohemoglobiny. Białko to, ze względu na swoją stabilność pełni w organizmie funkcje magazynowania i transportowania tlenu azotu (Jia i wsp., 1996; Singel i Stamler, 2005). S-nitrozohemoglobina obecna w czerwonych ciałkach krwi, staje się nośnikiem tlenu węgla, który w tej postaci wraz z krwią żyłą może być transportowany z oka do mikrokrążenia mózgu (Kozma i wsp., 1999; Wu i Wang, 2005; Furchgott i Jothianandan, 1991). W 2012 roku ukazała się praca podsumowująca badania dotyczące udziału tlenu węgla w mechanizmie przekazu do mózgu informacji o długości dnia świetlnego. Z doświadczeń przeprowadzonych na krzyżówce świni domowej i dzika, jednoznacznie wynika, że stężenie tlenu węgla w krwi żyłnej odpływającej z oka, jest sezonowo i dobowo zmienne, osiągając latem prawie trzykrotnie wyższe wartości w stosunku do zimy (Koziorowski i wsp., 2012). U niektórych gatunków zwierząt, w tym u świniowatych, krew żylna odpływająca z oka spływa do położonej obok oka żyłnej zatoki ocznej (łac. *venus ophthalmicus sinus*), aby następnie dotrzeć do zatoki jamistej

(łac. *sinus cavernosus*). W okołoprzysadkowym kompleksie naczyniowym (naczynia żyłne zatoki jamistej - sieć dziwna tętnicy szyjnej) następuje zbliżenie dwóch strumieni krwi, żylnego i tętniczego, przepływających w przeciwnych kierunkach. Taki układ naczyń, umożliwia wymianę cząsteczek na zasadzie przeciwprądowego mechanizmu przenikania zgodnie z gradientem stężeń. Wcześniejsze badania wykazały, że w okołoprzysadkowym kompleksie naczyniowym możliwe jest przenikanie do krwi zaopatrującej mózg steroidowych feromonów (Krzymowski i wsp., 1999; Stefańczyk-Krzymowska i wsp., 2000), hormonów steroidowych, progesteronu i testosteronu (Skipor i wsp., 2000; Skipor i wsp., 2003). Skoro możliwy jest transfer substancji o stosunkowo dużej masie cząsteczkowej (kilkaset do ~ 1000 Da), wielokrotnie mniejsze cząsteczki CO (28,01 Da) powinny stosunkowo łatwo, zgodnie z gradientem stężeń, pokonywać bariery ścian naczyń żylnych zatoki jamistej i sieci dziwnej tętnicy szyjnej zewnętrznej zaopatrującej mózg. Zgodnie z powyższym modelem, sezonowo zmienna ilość uwalnianego w oku do krwi żylniej tlenu węgla, i wraz z nią przenoszona do żylniej zatoki jamistej, powinna spowodować wahania jego stężenia w krwi tętniczej zaopatrującej mózg.

W badaniach *in vitro* wykazano, że tlenek węgla może uczestniczyć w molekularnym mechanizmie kontrolującym rytm okołodobowy ssaków. Białko NPAS2 poprzez możliwość wiązania hemu Fe(II) staje się wrażliwe na działanie gazowych cząsteczek sygnałowych, NO i CO (Dioum i wsp., 2002, Gilles-Gonzalez i Gonzalez 2004, Airola i wsp., 2010, Lukat-Rodgers i wsp., 2010). Wewnątrzkomórkowe stężenie tlenu węgla wpływa na powinowactwo NPAS2 do CO i zdolność do tworzenia dimerów NPAS2/BMAL1 pełniących funkcję czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję genów zegara okołodobowego. Wzrost stężenia CO powyżej $1\mu\text{M}$ powoduje rozpad kompleksu BMAL1/NPAS2 (Dioum i wsp., 2002; Gilles-Gonzales i Gonzales 2004). Wielosynaptycznym szlakiem, informacja pochodząca z mieszczącego się w jądrze nadskrzyżowaniowym zegara okołodobowego jest przekazywana do szyszynki i wyrażana w zmiennym profilu syntezy i uwalniania melatoniny (Kalsbeek i wsp., 2000; Teclemariam-Mesbah i wsp., 1999). Zatem dobowy rytm metabolizmu hemu i zdolność białka NPAS2 do oddziaływania z tlenkiem węgla może stanowić jeden z mechanizmów regulujących rytmy biologiczne (Dioum i wsp., 2002).

Występowanie tlenu azotu i tlenu węgla w obszarach endokrynych podwzgórza nasunęło przypuszczenie o możliwości udziału tych gazów w bezpośredniej regulacji wydzielania hormonów. Anatomiczna lokalizacja neuronów nitrergicznych (posiadających zdolność syntezy NO) w bezpośredniej bliskości neuronów GnRH w podwzgórzu sugeruje, że NO może być ważnym regulatorem sekrecji GnRH (Bhat i wsp., 1995; Herbison i wsp., 1996). Wyniki licznych badań *in vivo* jak i *in vitro* wskazują, że tlenek azotu, poprzez szlak sygnałowy cGMP, odgrywa istotną rolę w regulacji uwalniania z podwzgórza gonadoliberyny. Nadal jednak, sprzeczne wyniki badań nie pozwalają jednoznacznie stwierdzić, czy sygnalizacja NO/cGMP działa stymulująco czy też hamująco na uwalnianie GnRH.

Aktywność konstytutywnej (HO-2), a w mniejszym stopniu również indukowanej (HO-1) formy oksygenazy hemowej jest obserwowana w obszarach mózgu, które biorą udział w centralnej regulacji reprodukcji oraz odpowiedzi na stres. HO-2 została zlokalizowana w komórkach nerwowych przodomózgowia, hipokampa, podwzgórza (jądra nadwzrokowe), śródmózgowia, wzgórza, mózdzku i pnia mózgu (Mancuso, 2004; Brann i wsp., 1997). Indukowalna forma oksygenazy hemowej została zlokalizowana w neuronach jąder brzuszno-przyśrodkowych (ang. *ventromedial hypothalamus*; VMH), jąder przykomorowych (ang. *paraventricular nucleus*; PVN) i części przedwzrokowej (POA) podwzgórza (Mancuso, 2004; Brann i wsp., 1997). Wykazano również obecność oksygenazy hemowej w przednim płacie przysadki mózgowej (Alexandreaanu i Lawson, 2003). W nielicznych dotąd badaniach, opartych na modelu *in vitro*, wykazano, że związki które zmieniają endogenne poziomy tlenu węgla mają stymulujący wpływ na uwalnianie z podwzgórza GnRH (Lamar i wsp., 1996; Errico i wsp., 2010). Doświadczenia przeprowadzone na owariotomizowanych samicach szczura wykazały, że substraty oksygenazy hemowej powodują wzrost uwalniania z przedniego płata przysadki mózgowej gonadotropin i prolaktyny (Alexandreaanu i Lawson, 2003). Wyniki powyższych badań sugerują, że tlenek węgla może być pozytywnym regulatorem sekrecji gonadotropin.

Udział tlenu węgla, jednego z produktów katabolizmu hemu, w mechanizmie transdukcji informacji o długości dnia do mózgu został już potwierdzony (Koziorowski i wsp., 2012; Gilun i wsp., 2013; Dioum i wsp., 2002). W nielicznych badaniach wykazano również że

CO może regulować uwalnianie hormonów podwzgórza i przysadki mózgowej (Lamar i wsp., 1996; Errico i wsp., 2010). Sezonowo zmienne stężenie tlenu węgla w obszarach mózgu biorących udział w regulacji osi reprodukcyjnej nasuwa przypuszczenie, że ta cząsteczka gazowa może uczestniczyć w mechanizmie sezonowej regulacji rozrodu. Zbadanie wpływu CO na sezonowo zmienną ekspresję genów i białek hormonów sterujących reprodukcją, mogło by wnieść nieco więcej światła w zrozumienie mechanizmów rządzących tym odwracalnym procesem płodności.

II CELE PRACY

Fotoperiod jest głównym czynnikiem środowiskowym modulującym aktywność osi rozrodczej u sezonowo rozmnażających się zwierząt. U samców mieszańców świni domowej i dzika stężenie tlenu węgla w krwi żyłnej odpływającej z oka, jest sezonowo i dobowo zmienne, osiągając latem wyższe wartości w stosunku do zimy. Własna hipoteza badawcza zakłada, że w warunkach fizjologicznych odpływający z oka w krwi żyłnej tlenek węgla może być bezpośrednio transportowany do mózgu poprzez przeciwpłukowe przenikanie w obszarze spłotu okołoprzysadkowego do naczyń tętniczych zaopatrujących mózg a sezonowo zmienne stężenie tlenu węgla w krwi żyłnej odpływającej z oka może nieść informację o warunkach oświetlenia.

W związku z powyższym zaplanowano doświadczenia mające na celu sprawdzenie:

1. czy u mieszańców świni domowej i dzika w warunkach fizjologicznych sezonowość aktywacji osi rozrodczej odbywa się na poziomie ekspresji genów?
2. czy w okresie krótkich dni świetlnych imitacja fizjologicznego wzrostu poziomu tlenu węgla we krwi odpływającej z oka i drogą przeciwpłukowego przenikania z pominięciem krążenia ogólnego przenoszonego bezpośrednio do mózgu wpłynie na poziom ekspresji genów osi przysadkowo-podwzgórzowej sterującej rozrodem oraz profil sekrecji melatoniny?
3. czy w okresie długich dni świetlnych wzrost stężenia poziomu tlenu węgla w krwi odpływającej z oka i docelowo przenoszonego bezpośrednio do mózgu wpłynie na poziom ekspresji genów osi przysadkowo-podwzgórzowej sterującej rozrodem oraz profil sekrecji melatoniny?

III MATERIAŁY I METODY

1. Zwierzęta doświadczalne

Wszystkie procedury doświadczalne na zwierzętach przeprowadzono zgodnie z zaleceniami Lokalnej Komisji Etycznej w Lublinie (nr 8/2007) i wytycznymi określonymi w Ustawie o Ochronie Zwierząt z roku 1997, oraz po wydaniu pozytywnej opinii przez Powiatowego Lekarza Weterynarii w Kolbuszowej.

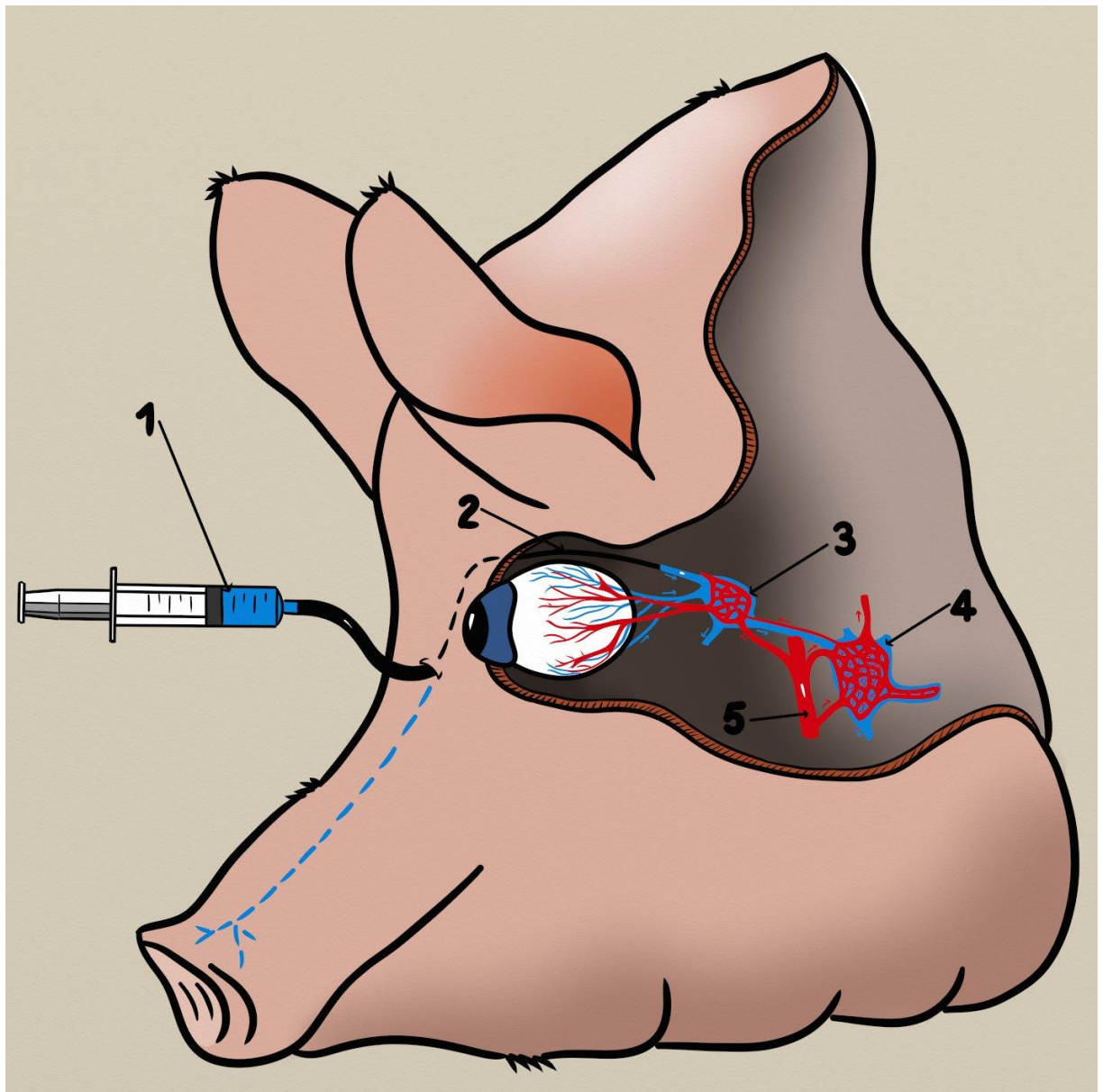
Badania zostały przeprowadzone na 48 dojrzałych płciowo (12-sto miesięcznych) samcach krzyżówki dzika europejskiego i świni domowej (świniodzik) o masie ciała 100-120kg, pochodzących z Hodowli Doświadczalnej Pozawydziałowego Zamiejscowego Instytutu Biotechnologii Stosowanej i Nauk Podstawowych Uniwersytetu Rzeszowskiego. Zwierzęta miały zapewniony dostęp do pełnowartościowej paszy oraz wody *ad libitum*. Latem (długi dzień świetlny) świniodziki przebywały na zewnątrz budynku, na zadaszonym wybiegu, w warunkach naturalnego oświetlenia. Średnie natężenie światła słonecznego mierzone na poziomie oczu zwierząt w czasie dnia wynosiło ~30.000 lx. Średnia temperatura otoczenia podczas dnia i nocy wynosiła odpowiednio 24°C i 12°C. Zimą (krótki dzień świetlny) zwierzęta przebywały w pomieszczeniach zwierzętarni z zainstalowanymi oknami, w których natężenie światła słonecznego w ciągu dnia na poziomie oczu zwierząt wynosiło ~50 lx. Temperatura otoczenia zarówno podczas dnia, jak i nocy była stała i wynosiła ~12°C. 7 dni przed zaplanowanymi procedurami eksperymentalnymi, zwierzęta były umieszczane w pojedynczych boksach hodowlanych.

Badania były prowadzone podczas najdłuższych (czerwiec) i najkrótszych (grudzień) dni roku. W czerwcu dla szerokości geograficznej Kolbuszowej (50°N) średnia długość dnia wynosi 16 godzin i 23 minuty, natomiast średni czas całkowitego oświetlenia, 17 godzin i 52 minuty. W grudniu średnia długość dnia wynosi 8 godzin i 17 minut, a średni czas całkowitego oświetlenia 9 godzin i 34 minuty.

1.1 Procedury Chirurgiczne - Zabiegi kateteryzacji (kaniulacji) naczyń żylnych

Dwanaście godzin przed planowanym postępowaniem chirurgicznym zwierzęta zostały pozbawione dostępu do pokarmu, przy zachowaniu swobodnego dostępu do wody *ad libitum*. Wszystkie zabiegi chirurgiczne były wykonywane w znieczuleniu ogólnym

zgodnie z zasadami aseptyki. Zwierzętom podawano premedykację w postaci domięśniowej iniekcji atropiny (0.05 mg/kg I.M; Biowet, Gorzów Wielkopolski) a następnie azaperonu (2 mg/kg I.M; Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgia). Po wystąpieniu sedacji rozpoczynano podawanie do żyły brzeżnej ucha tiopentalu sodu (około 10 mg/kg I.V; Thiopental; Sandoz GmbH) do momentu uzyskania stanu anestezji. Następnie zwierzęta umieszczano na stole operacyjnym, w pozycji na grzbiecie i implantowano kaniule (o.d. 2.4 mm; i.d. 1.8 mm) do następujących naczyń żylnych: (1) do żyły szyjnej zewnętrznej (łac. v. *jugularis externa*), w celu infuzji tiopentalu sodu do utrzymania stanu narkozy podczas operacji oraz w celu pobierania krwi krążenia obwodowego do procedur doświadczalnych (przygotowania do infuzji krwi oraz osocza o podwyższonym stężeniu tlenu węgla), jak również do analiz stężenia hormonu luteotropowego (LH), folikulotropowego (FSH) oraz melatoniny (Kotwica i wsp., 1978); (2) do żyły grzbietowej nosa (łac. v. *dorsalis nasi*) w kierunku dogłównym przez żyłę kątową oka aż do osiągnięcia zatoki żyłnej oka, w celu infuzji autologicznego osocza lub krwi z eksperymentalnie podwyższonym stężeniem tlenu węgla (Rysunek 1). Obie kaniule zostały wyprowadzone na grzbiet zwierzęcia, co pozwoliło na bezstresowe pobieranie krwi w trakcie wykonywania czynności doświadczalnych. Po zakończeniu procedur chirurgicznych zwierzęta zostały przyporządkowane do grup doświadczalnych (n=6) zgodnie z przyjętym harmonogramem doświadczeń.



Rysunek 1. Schemat unaczynienia okolicy nosa i oka; miejsce wprowadzenia kaniuli do infuzji autologicznej krwi lub osocza o fizjologicznym lub doświadczalnie podniesionym stężeniu CO; (1) kaniula wprowadzona do żyły grzbietowej nosa; (2) żyła kątowna oka; (3) zatoka żyły ocznej i sieć dziwna tętnicy ocznej zewnętrznej; (4) sieć dziwna w okołoprzysadkowej zatoce jamistej; (5) tętnica gardłowa odchodząca od tętnicy szczękowej.

2. Harmonogram doświadczeń

2.1 Doświadczenie 1.

W doświadczeniu pierwszym prowadzono 48-godziną infuzję do zatoki żylniej oka autologicznego osocza krwi, o podwyższonym stężeniu tlenu węgla, w stosunku do fizjologicznego stężenia CO w krwi odpływającej z oka (Tabela 1). Przygotowane osocze

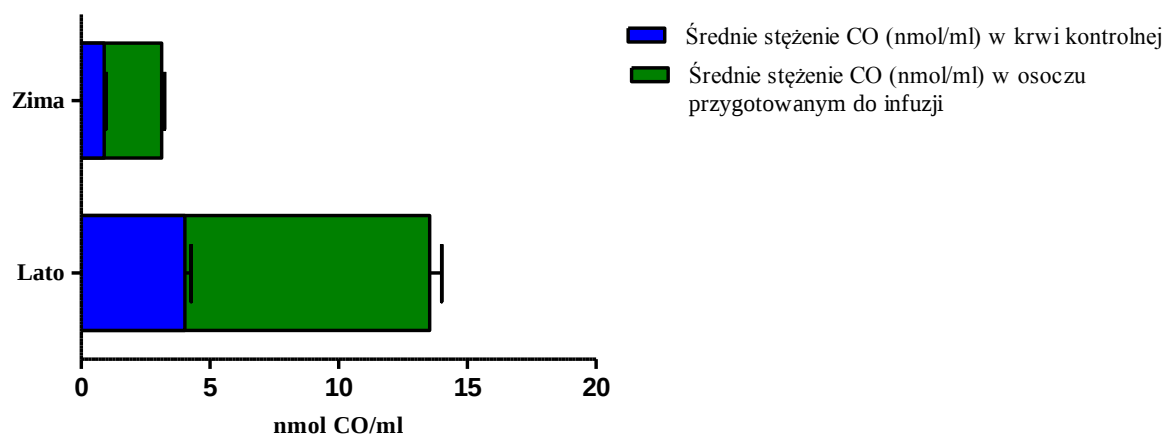
było wprowadzane do żyły kątovej oka przy pomocy pompy infuzyjnej z prędkością 8,3 ml osocza/godzinę. Taka sama procedura eksperymentalna została przeprowadzona na osobnych grupach zwierząt w okresie długich (czerwiec n=6) oraz krótkich (grudzień n=6) dni świetlnych. Odniesieniem do obu grup eksperymentalnych były prowadzone równolegle kontrolne grupy zwierząt (czerwiec n=6; grudzień n=6), którym w tych samych warunkach do zatoki żylniej oka przez 48 godzin infundowano autologiczne osocze.

2.1.1 Procedura przygotowania autologicznego osocza krwi o podwyższonym stężeniu tlenu węgla

Procedura wzbogacania osocza krwi w tlenek węgla została doświadczalnie opracowana na Politechnice Gdańskiej, na Wydziale Chemicznym, w Katedrze Inżynierii Chemicznej i Procesorowej.

Dla każdego zwierzęcia osocze o podwyższonym stężeniu tlenu węgla, przeznaczone do infuzji, przygotowywane było na bazie autologicznej krwi pobranej na heparynę (10 UI/ml, Polfa) z żyły szyjnej zewnętrznej. 50 ml osocza zebranego po odwirowaniu pełnej krwi (10 min, 3000xg, 4°C) przenoszono do fiolki chromatograficznej o pojemności 50 ml. Do tak przygotowanej porcji osocza wprowadzano 0,8 cm³ czystego chromatograficznie, gazowego CO, po czym mieszano przez 30 minut na mieszadle rolkowym. Osocze o podwyższonej zawartości CO przy pomocy pompy infuzyjnej, (z prędkością 8,3 ml osocza/godzinę) wprowadzano do żyły kątovej oka a dalej zatoki żylniej oka. Wykonano kontrolne pomiary stężenia CO w krwi żylniej pobranej z żyły kątovej oka (przed przystąpieniem do infuzji) oraz w przygotowanym do infuzji osoczu wzbogaconym w CO (Tabela 1). Pomiary zostały wykonane metodą chromatografii gazowej zgodnie z procedurą opisaną przez Koziorowski i wsp. (2012). Pozostałe po odwirowaniu elementy morfotyczne krwi, rozcieńczano płynem fizjologicznym Ringera do objętości odpowiadającej pobranej krwi pełnej. Tak przygotowaną zawiesinę, po wcześniejszym 30-minutowym mieszaniu, wprowadzano do krążenia ogólnego przez żyłę szyjną zewnętrzną.

Tabela 1. Średnie stężenie tlenu węgla (nmol/ml) w krwi odpływającej z obszaru oka oraz w autologicznym osoczu pobranym z żyły szyjnej zewnętrznej infundowanym do zatoki żyłnej oka, wzbogaconym CO.



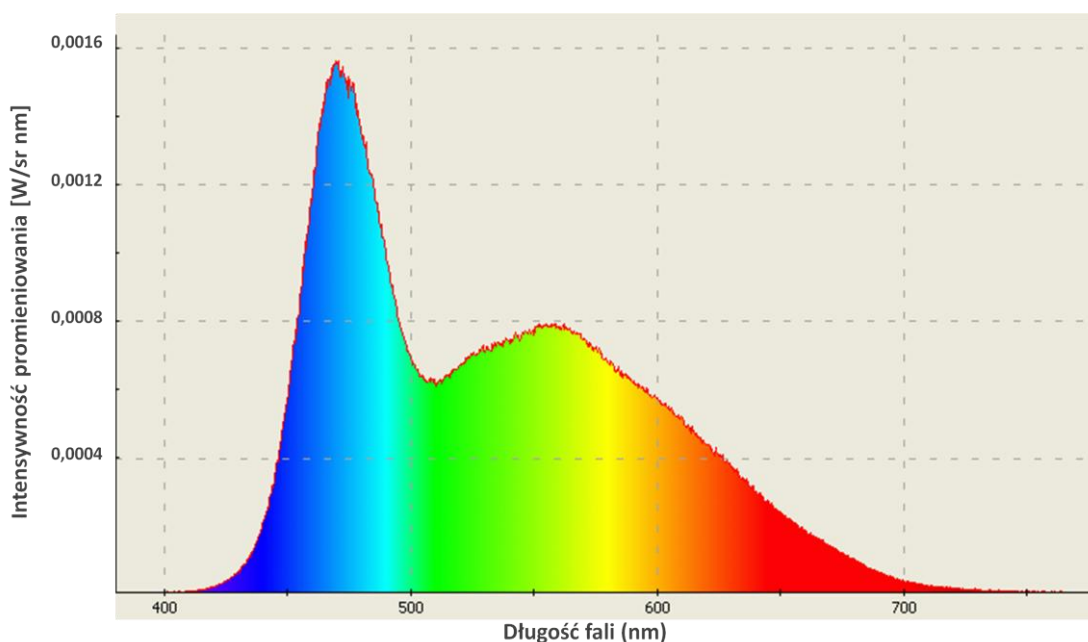
	Średnie stężenie CO (nmol/ml) w krwi kontrolnej	Średnie stężenie CO (nmol/ml) w osoczu przygotowanym do infuzji	Współczynnik wzrostu stężenia CO w osoczu przygotowanym do infuzji
Lato	4,03 ± 0,238	13,54 ± 0,471***	3,36
Zima	0,89 ± 0,073	3,13 ± 0,110**	3,52

2.2 Doświadczenie 2.

W doświadczeniu drugim prowadzono 48-godziną infuzję do zatoki żyłnej oka, krwi autologicznej, o podwyższonym stężeniu tlenu węgla, w wyniku naświetlania światłem LED (ang. *light-emitting diodes*), (Rysunek 3). Taka sama procedura eksperymentalna została przeprowadzona na osobnych grupach zwierząt w okresie długich (czerwiec; n=6) oraz krótkich (grudzień; n=6) dni świetlnych. Odniesieniem do obu grup eksperymentalnych były prowadzone równolegle kontrolne grupy zwierząt (czerwiec n=6; grudzień n=6), którym w tych samych warunkach do zatoki żyłnej oka przez 48 godzin infundowano autologiczną krew. W obu grupach kontrolnych, autologiczna krew przechodziła przez ten sam układ doświadczalny, nie była jednak poddana naświetlaniu światłem LED.

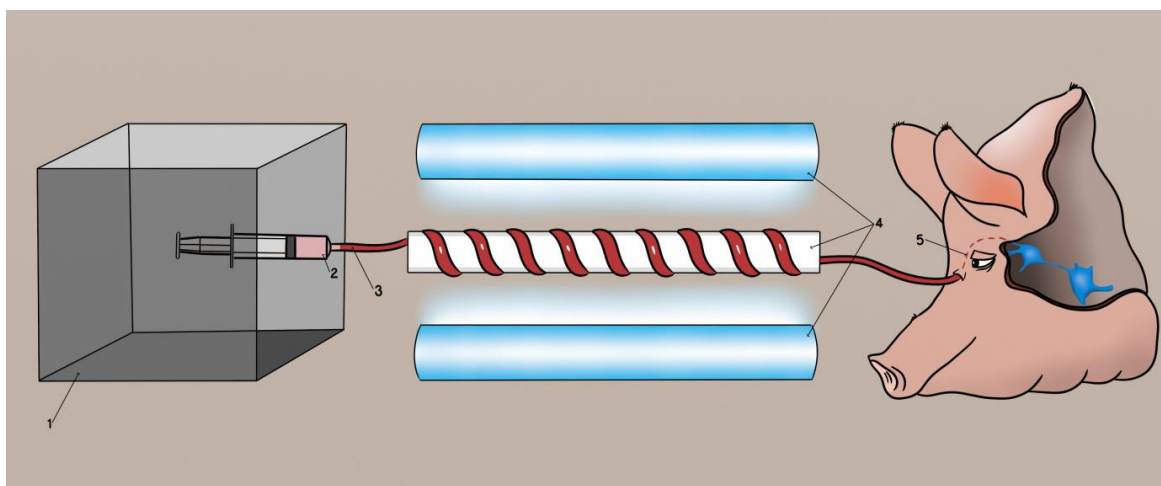
2.2.1 Procedura przygotowania autologicznej krwi o podwyższonym w wyniku naświetlania światłem LED stężeniu tlenu węgla

Od zwierząt pobierano na heparynę (10 UI/ml, Polfa) 50ml krwi z żyły szyjnej zewnętrznej. Wzrost stężenia tlenu węgla w krwi otrzymywano przez dwu-godzinne naświetlanie autologicznej krwi światłem LED o podwyższonej emisji niebieskiego widma, o natężeniu $10652,02 \pm 1419,70$ lx. Zgodnie z informacją producenta, maksimum emisji występowało w obszarze światła niebieskiego (~442nm; szerokość pasma ~55nm), natomiast drugi szczyt emisji występował przy długości fali ~545nm (szerokość pasma ~100nm) (Rysunek 2).



Rysunek 2. Charakterystyka spektralna widma emisyjnego lampy LED

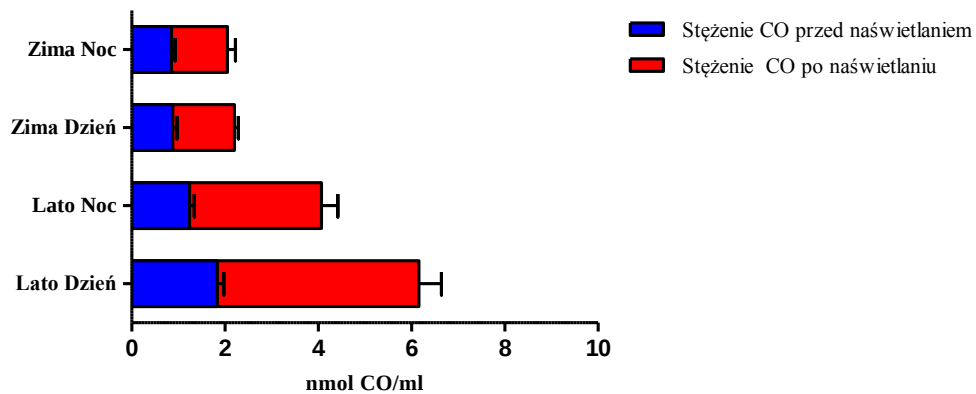
Autologiczna krew, wprowadzana była za pomocą pompy infuzyjnej do 6-cio metrowej kaniuli nawiniętej na świetlówkę o średnicy 2,5cm z prędkością 8,3ml/godzinę. Po przejściu przez spiralę, naświetlona krew była bezpośrednio wprowadzana do zatoki żyłnej oka dzięki połączeniu naświetlanego układu z kaniulą wprowadzoną do żyły kątowej oka (Rysunek 3).



Rysunek 3. Schemat układu doświadczalnego dotyczącego infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznej krwi naświetlanej światłem LED; (1) pompa infuzyjna, (2) strzykawka z krwią autologiczną, (3) kaniula implantowana do żyły grzbietowa nosa, przez którą wprowadzana była naświetlana krew, (4) lampy LED, (5) żyła grzbietowa nosa.

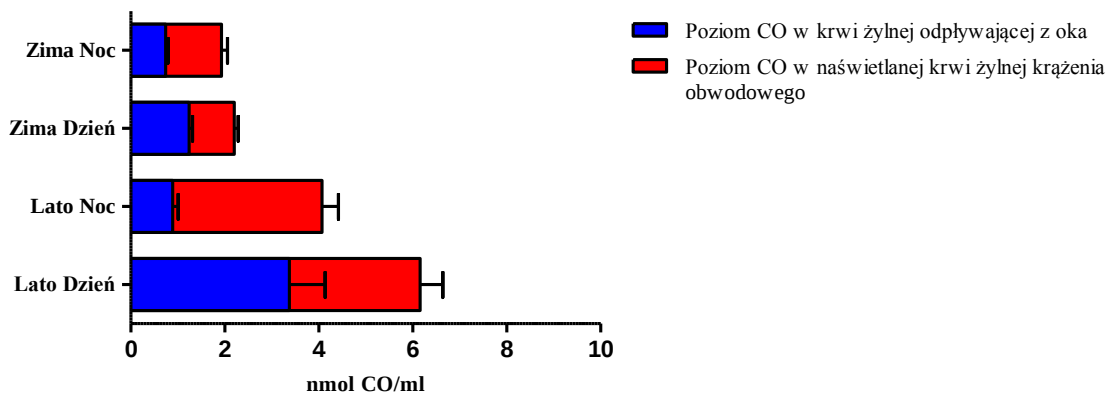
Długość kaniuli oraz czas naświetlania zostały dobrane doświadczalnie, by w wyniku naświetlania krwi przepływającej przez kaniulę ze stałą prędkością (8,3ml/godzinę) otrzymać około 3-krotny wzrost stężenia tlenu węgla w stosunku do fizjologicznego poziomu CO w krwi kontrolnej. W celu kontroli układu doświadczalnego wykonano pomiary stężenia tlenu węgla w krwi żyłnej krążenia obwodowego przed oraz po naświetlaniu (Tabela 2), oraz pomiary stężenia CO w krwi przed oraz po przejściu z prędkością 8,3ml/godzinę przez 6-cio metrową kaniulę bez naświetlania (Tabela 4). Wykonano pomiary stężenia tlenu węgla w krwi żyłnej odpływającej z oka w warunkach fizjologicznych w okresie długiego oraz krótkiego dnia świetlnego celem ustalenia dokładnych proporcji zmiany stężenia tlenu węgla w zatoce ocznej w trakcie infuzji naświetlanej krwi (Tabela 3). Pomiary stężenia CO zostały wykonane metodą chromatografii gazowej zgodnie z procedurą opisaną przez Koziorowski i wsp. (2012).

Tabela 2. Stężenie tlenku węgla (nmol/ml) w krwi obwodowej pobranej z żyły szyjnej zewnętrznej przed, oraz po 2-godzinny naświetlaniu światłem LED w okresie długiego [A], oraz krótkiego [B] dnia świetlnego. Wyniki przedstawiono, jako średnia $\pm$ SEM, *** $P \leq 0.001$.



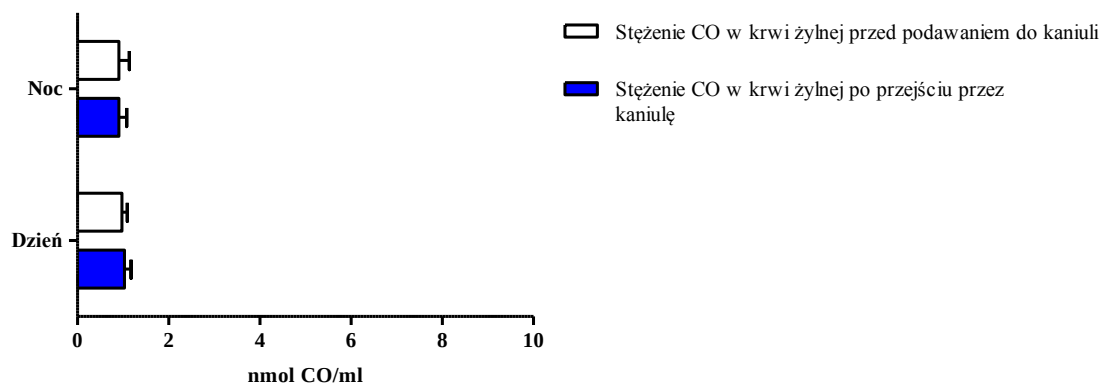
	Stężenie CO (nmol/ml) w krwi kontrolnej	Stężenie CO (nmol/ml) w krwi naświetlanej	Krotność wzrostu stężenia CO we krwi po jej naświetleniu
Lato Dzień	1,837 $\pm$ 0,14	6,161 $\pm$ 0,48***	3,35
Lato Noc	1,244 $\pm$ 0,10	4,068 $\pm$ 0,35***	3,27
Zima Dzień	0,880 $\pm$ 0,09	2,204 $\pm$ 0,08***	2,50
Zima Noc	0,853 $\pm$ 0,08	2,053 $\pm$ 0,17***	2,41

Tabela 3. Fizjologiczny poziom tlenu węgla (nmol/ml krwi) w krwi żyłnej odpływającej z oka oraz poziom tlenu węgla w krwi żyłnej krążenia obwodowego po 2-godzinym naświetlaniu światłem LED, w okresie długiego [A] oraz krótkiego [B] dnia świetlnego, średnia $\pm$ SEM, *** $P \leq 0.001$.



	Poziom CO w krwi żyłnej odpływającej z oka	Poziom CO w krwi krążenia obwodowego po 2-godzinym naświetlaniu światłem LED infundowanej do zatoki żyłnej oka	Krotność wzrostu stężenia CO po 2-godzinym naświetlaniu w stosunku do fizjologicznego poziomu CO w krwi żyłnej odpływającej z oka
Lato Dzień	3,375 $\pm$ 0,76	6,161 $\pm$ 0,48***	1,83
Lato Noc	0,890 $\pm$ 0,12	4,068 $\pm$ 0,35***	4,57
Zima Dzień	1,242 $\pm$ 0,07	2,204 $\pm$ 0,08***	1,78
Zima Noc	0,742 $\pm$ 0,05	1,929 $\pm$ 0,13***	2,60

Tabela 4. Stężenie tlenku węgla (nmol/ml) w krwi pobranej z żyły szyjnej zewnętrznej przed podaniem do kaniuli, oraz po przejściu z prędkością 8,3ml/godzinę przez 6-cio metrową kaniulę bez naświetlania.



	Stężenie CO w krwi żyłnej przed podaniem do kaniuli	Stężenie CO w krwi żyłnej po przejściu przez kaniulę
Dzień	0,973±0,12	1,033±0,14
Noc	0,907±0,23	0,910±0,17

3. Pobieranie krwi

W każdej grupie doświadczalnej, w trakcie 48-godzinnej infuzji, od zwierząt w odstępach 2-godzinnych pobierano krew do analiz stężenia hormonu luteotropowego, folikulotropowego oraz melatoniny. Krew krążenia obwodowego była pobierana do heparynizowanych probówek (10 UI/ml, Polfa) z żyły szyjnej zewnętrznej w objętości 10ml. Bezpośrednio po pobraniu, krew była wirowana (3000xg przez 10 minut w temperaturze 4°C). Zebrane osocze przechowywano w temperaturze -20°C do czasu dalszych analiz. Nocą krew pobierano przy świetle czerwonym (lampa do ciemni fotograficznej emitująca światło czerwone niewielkiej mocy) i przy świetle małej latarki, unikając bezpośredniej ekspozycji oczu zwierząt na światło.

4. Pobieranie struktur centralnego układu nerwowego do analiz ekspresji genów gonadotropin i gonadoliberyny

Po zakończeniu części eksperymentalnej w celu analizy ekspresji genów gonadotropin oraz gonadoliberyny w strukturach centralnego układu nerwowego, od zwierząt, poubojowo, pobierano przysadkę mózgową oraz podwzgórze. Ubój zwierząt był wykonywany w lokalnej rzeźni. Po ogłuszeniu i uboju, zwierzęta były dekapitowane, rozcinano czaszkę i pobierano cały mózg, z którego następnie, z zachowaniem zasad sterylności, izolowano przysadkę mózgową i podwzgórze. Pobrane struktury umieszczano w ciekłym azocie. Czas pomiędzy ubojem a zabezpieczeniem tkanek w ciekłym azocie wynosił średnio 8 minut.

5. Oznaczenia poziomu hormonów w osoczu krwi obwodowej metodą radioimmunologiczną

5.1 Oznaczanie stężenia LH i FSH

Pomiar stężenia lutropiny i folitropiny został wykonany w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie w Zakładzie Lokalnych Regulacji Fizjologicznych. Stężenie LH (Zięcik i wsp., 1979) i FSH w osoczu krwi oznaczono metodą radioimmunologiczną z wykorzystaniem hormonu znakowanego radioaktywnym izotopem jodu ^{125}J . Znakowanie hormonu LH (Porcine Luteinizing Hormone Antygen, AFP-11043B; Hormone & Pituitary Program; Torrance, USA) i FSH (Follicle-Stimulating Hormone Antygen, AFP-10640B; Hormone & Pituitary Program; Torrance, USA) przeprowadzono radioaktywnym jodem (^{125}J ; PerkinElmer and Analytical Science; Boston, USA) metodą chloraminową (Greenwood i wsp., 1963). Drugie przeciwciała zostały wytworzone w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie. Wartości stężeń LH i FSH w badanych próbach obliczano na podstawie krzywej kalibracyjnej uzyskanej dla odpowiednich wzorców: 0,075; 0,15; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 ng/próbę. Do strącania prób używano roztworu glikolu etylowego. Radioaktywność osadu mierzono w liczniku promieniowania gamma (LKB Wallac-Clinigamma, Rockville, MD, czas pomiaru 1 minuta) o wydajności dla jodu 70%. W zastosowanych warunkach analizy oznaczony limit czułości dla LH i FSH wynosił odpowiednio 0,07 ng/próbę i 0,04 ng/próbę

a współczynniki zmienności wewnątrz seryjnej i między seryjnej wynosiły odpowiednio 3,0% i 9,0% oraz 2,4 i 12,2%. Stężenie hormonów w próbach wyliczano przy pomocy programu komputerowego do analizy wyników pomiarów RIA.

5.3 Oznaczenie stężenia melatoniny

Stężenie melatoniny w badanych próbach osocza oznaczano metodą radioimmunologiczną z wykorzystaniem komercyjnych zestawów RIA (Bühlman Laboratories AG, Schönenbuch, Switzerland). Stosowano melatoninę znakowaną ^{125}J (B-MEL-TR), przeciwciała antymelatoninowe (B-MEL-AS) i drugie przeciwciała (B-AB-2). Krzywa standardowa obejmowała stężenia melatoniny: 0,5; 1,5; 5; 15 i 50 pg/ml. Radioaktywność strąconej frakcji stałej mierzono w liczniku do pomiaru promieniowania γ (Perkin Elmer 1470 Wizard) o wydajności dla jodu $>78\%$. Czułość oznaczeń melatoniny wynosiła 0,9 pg/ml, a współczynniki zmienności wewnątrz seryjnej i między seryjnej 7,9% i 11,7%. Stężenie melatoniny w próbach wyliczano przy pomocy programu komputerowego do analizy wyników pomiarów RIA.

6. Oznaczanie poziomu mRNA - analiza ekspresji genów *GnRH*, *GnRH-R*, α , *Lh β* i *Fsh β*

6.1 Izolacja RNA

Całkowity komórkowy RNA został wyizolowany z tkanek przy pomocy zestawu TRI Reagent (Sigma Aldrich) opartego o zmodyfikowaną metodę Chomczyński i Sacchi (1987). Tkanek zawieszano w 1ml odczynnika TRI Reagent a następnie homogenizowano przy użyciu systemu FastPrep24 (MP Biomedicals) z wykorzystaniem macierzy ceramicznej (Lysing Matrix D; MP Biomedicals). Otrzymany homogenat inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Po zakończeniu inkubacji lizat komórkowy przenoszono do nowej probówki (typu Eppendorf). Następnie dodawano do niego 0,2 ml chloroformu (Sigma Aldrich) i energicznie wytrząsano przez 15 sekund. Tak powstałą mieszaninę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 3 minuty. Po zakończeniu inkubacji, próby wirowano przy prędkości 12 000 x g, przez 15 minut w temperaturze 4°C, prowadząc do rozdziału mieszaniny na frakcje. Frakcja wodna (górna), zawierająca RNA,

została przeniesiona do nowej probówki. Następnie, w celu wytrącenia osadu RNA, dodawano 0,5 ml izopropanolu. Po 10 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, próby ponownie wirowano (12 000 x g, 10 min., 4°C) otrzymując osad RNA. Osad płukano 75% alkoholem etylowym (1 ml), a następnie wirowano (7500 x g, 5 min., 4°C) i usuwano nadsącz. Pozostały osad RNA pozostawiano do odparowania resztek etanolu. Otrzymane RNA rozpuszczano w wodzie wolnej od rybonukleaz. Stężenie ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) i czystość wyizolowanego RNA określano spektrofotometrycznie przy użyciu spektrofotometru kropłowego NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Stopień czystości preparatów RNA określano na podstawie stosunku absorbancji przy długości fal 260/280 nm. Daną próbę RNA uznawano za czystą, gdy wartość $A(260)/A(280)$ zawierała się w granicach 1,6-2,0. Otrzymane preparaty RNA oceniano także elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym w buforze TBE celem kontroli integralności wyizolowanego RNA. W tym celu 1 μg RNA wymieszano z buforem obciążającym i naniesiono na żel zawierający bromek etydyny. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy napięciu 5V/cm przez 45 minut. Prążki RNA uwidoczniono w świetle UV z wykorzystaniem systemu detekcji żeli Fusion FX.

6.2 Reakcja odwrotnej transkrypcji

Przed przystąpieniem do przygotowania reakcji odwrotnej transkrypcji dokonano trawienia DNazą I (Sigma Aldrich) celem oczyszczenia preparatów RNA z pozostałości genomowego DNA. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT) została przeprowadzona przy użyciu odwrotnej transkryptazy wirusa białaczki mysiej M-MLV (Promega) z wykorzystaniem starterów oligo(dT)15. Przygotowany roztwór wstępny; 1 μg RNA wraz z 1 μl oligo(dT) denaturowano termicznie przez 10 minut w temperaturze 70°C, po czym schładzano w lodzie. Następnie dodawano mieszaninę do reakcji RT (odwrotna transkryptaza, bufor, dNTP; Promega). Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono przez 60 minut w temperaturze 42°C. Odwrotną transkryptazę inaktywowano termicznie przez ogrzewanie próbek przez 5 minut w temperaturze 90°C. Uzyskane cDNA przechowywano w temperaturze -20°C do czasu wykonania reakcji Real-Time PCR.

6.3 Reakcja łańcuchowa polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym – Real-Time PCR

Poziom ekspresji badanych genów oznaczono metodą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym przy pomocy aparatu StepOne Plus (Applied Biosystems). Powstawanie produktów PCR monitorowano przez pomiar sygnału fluorescencji emitowanej przez swoiste sondy hydrolizujące (TaqMan), znakowane fluorescencyjnie umiejscowione pomiędzy parą starterów PCR.

Reakcję przeprowadzono z wykorzystaniem gotowej mieszaniny reakcyjnej TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems - Life Technologies). Do oceny ekspresji badanych genów wykorzystano sondy dostarczone przez Applied Biosystems (Tabela 5).

Gen	Gene Expression Assays (Applied Biosystems)
<i>Lhβ</i>	Ss03382452_u1
<i>Fshβ</i>	Ss03382019_g1
<i>α</i>	Ss03394998_m1
<i>GnRH-1</i>	Ss03394548_m1
<i>GnRH-R</i>	Ss03394546_m1
<i>GAPDH</i>	Ss03375435_u1

Tabela 5. Gene Expression Assays

W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 20 µl/dołek wchodziły następujące składniki: 10 µl TaqMan Gene Expression Assay Master Mix 2x (Applied Biosystems), 2 µl specyficznej sondy TaqMan (TaqMan assay), 70ng cDNA, DNase-free water do końcowej objętości 20µl. Stężenie cDNA w reakcji wybrano po serii doświadczeń próbnych na podstawie zadowalających wyników. Zoptymalizowany profil temperaturowo-czasowy reakcji Real-Time PCR był następujący: 95°C - 10 minut (wstępna denaturacja), następnie 40 cykli: 95°C - 15 sekund (denaturacja nici), 60°C - 1minuta (przyłączanie starterów), (elongacja), odczyt fluorescencji. Reakcję PCR na płytkach 96-dołkowych przeprowadzono trzykrotnie dla każdej badanej próbki. Jako kontrolę ujemną/negatywną przeprowadzono dla każdej reakcji amplifikację z dodatkiem wody zamiast cDNA. W celu

normalizacji badań wykorzystano gen referencyjny - dehydrogenazę fosforanu aldehydu glicerynowego (ang. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*; GAPDH). Wyniki reakcji zapisywano i analizowano za pomocą programu StepOne Plus Software v 2.1. Ocenę ekspresji badanych genów dokonywano metodą analizy względnej, pozwalającej wyliczyć względną różnicę poziomu ekspresji badanego genu między próbkami nieznanymi a próbą referencyjną.

7. Analiza statystyczna

Wszystkie wyniki zostały przedstawione, jako średnie arytmetyczne $\pm$ błąd standardowy średniej (SEM). W celu określenia odpowiedzi osi HPG na zmiany stężenia tlenu węgla przez cały okres trwania doświadczenia (48 godzin) analizowano profile LH zintegrowane w formie pola powierzchni pod krzywą stężeń (AUC). Dobowe profile melatoniny były analizowane metodą opisaną przez Barassin i wsp. (1999) zgodnie z poniższym równaniem:

$$y = Y0 + [Ymax / ((1 + \exp(A * (IT50 - x))) * (1 + \exp(B * (x - DT50))))]$$

gdzie:

y liczba punktów danych

x punkt czasowy danej

$Y0$ podstawowy poziom melatoniny w ciągu dnia

$Ymax$ najwyższy poziom melatoniny nocą

$IT50$ punkt czasowy, w którym poziom melatoniny osiągnął 50% maksymalnego nocnego poziomu

$DT50$ punkt czasowy, w którym poziom melatoniny spadał o 50% z maksymalnego nocnego poziomu

A i B wartości nachylenia krzywej do punktów danych $IT50$ i $DT50$

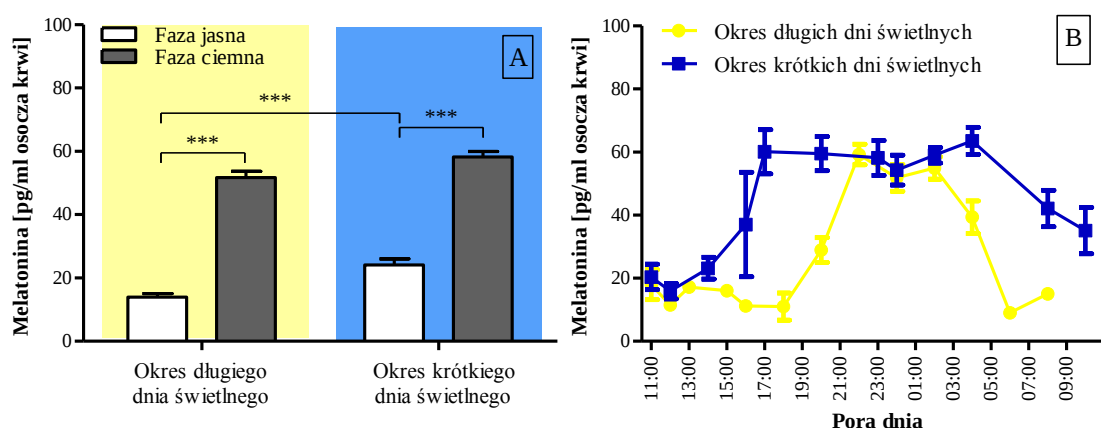
Amplitudę wzrostu melatoniny definiowano, jako różnice między wartościami Y_{max} i Y_0 ; czas trwania nocnego, podniesionego poziomu melatoniny definiowano, jako różnice między wartościami $DT50$ i $IT50$.

Analiza statystyczna danych dotyczących ekspresji genów oraz poziomu hormonów została wykonana przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z post testem Bonferoniego. Do analizy wyników zawartości CO w krwi oraz osoczu, posłużono się testem nieparametrycznym Manna-Whitney'a. Wszystkie analizy statystyczne wykonano w programie GraphPad Prism 5.0.4. Za poziom istotności statystycznej przyjęto $P \leq 0.05$.

IV WYNIKI

Analiza dobowego i sezonowego profilu uwalniania melatoniny do krążenia ogólnego po 48-godzinnej infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznej krwi lub osocza

Sezonowe i dobowe zmiany poziomu melatoniny w krwi obwodowej zwierząt grup kontrolnych, zostały przedstawione, jako dobowe profile uwalniania melatoniny do krążenia ogólnego (Wykres 1B), oraz jako średnie stężenie melatoniny w krwi obwodowej (pg/ml osocza krwi) (Wykres 1A).



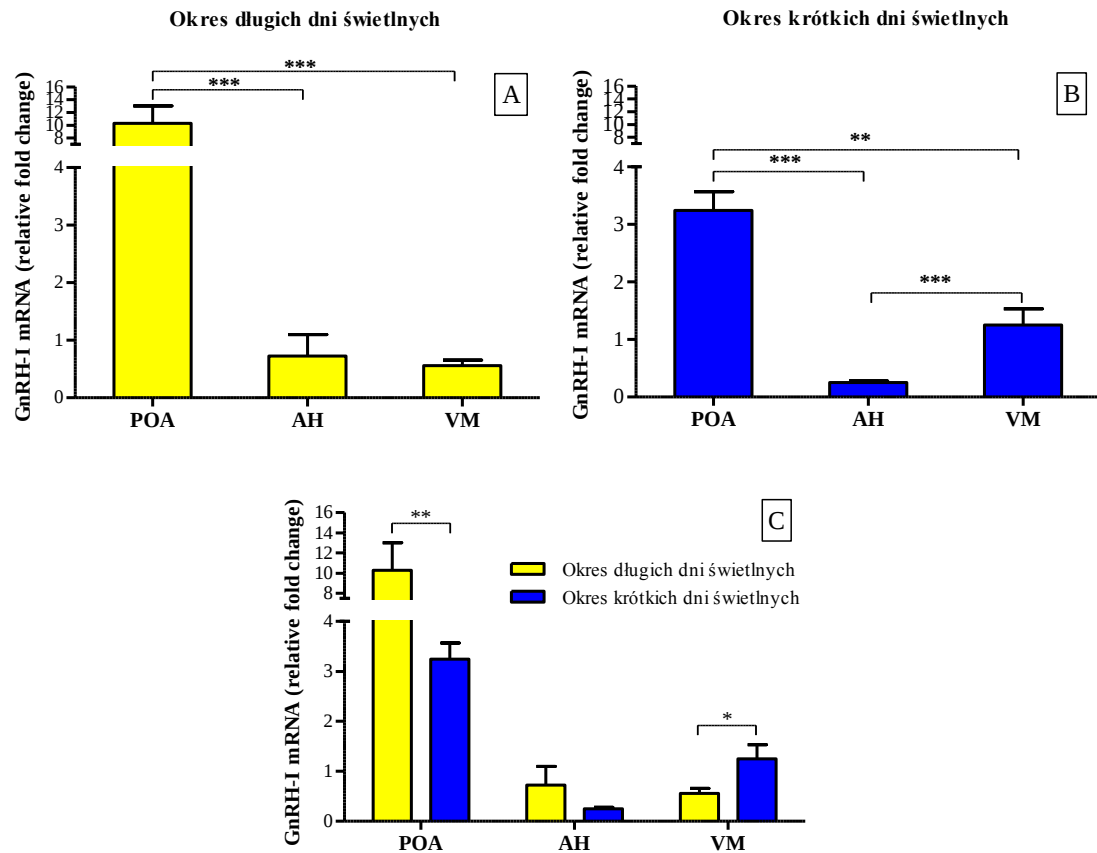
Wykres 1. Poziom [A] oraz dobowe profile [B] melatoniny (pg/mL) w osoczu krwi obwodowej zwierząt grup kontrolnych którym do żyłnej zatoki oka infundowano autologiczną krew lub osocze w okresie długich (n=12) oraz krótkich (n=12) dni świetlnych, średnia $\pm$ SEM, * $P \leq 0.001$ [A].**

U wszystkich zwierząt obserwowano wyraźny rytm sekrecji melatoniny z wysokim poziomem tego hormonu w trakcie fazy ciemnej, zarówno w okresie krótkich jak i długich dni świetlnych. Nie zanotowano różnic w amplitudzie sekrecji melatoniny podczas fazy ciemnej, istotna zmiana [$8,31 \pm 0,22$ godzin; $P \leq 0,001$] dotyczyła natomiast czasu trwania podniesionego poziomu sekrecji melatoniny, który w okresie długich dni świetlnych wynosił $8,17 \pm 0,16$ godzin, natomiast w okresie krótkich dni świetlnych, $16,48 \pm 0,26$ godzin (Wykres 1B). Poziom melatoniny w krążeniu obwodowym w fazie jasnej w okresie krótkich dni świetlnych [$24,11 \pm 1,97$ pg/ml osocza krwi] był istotnie wyższy ($P \leq 0.001$) od

poziomu tego hormonu w fazie jasnej w okresie długich dni świetlnych [$13,99 \pm 1,06$ pg/ml osocza krwi] (Wykres 1A).

Poziom GnRH mRNA w podwzgórzu po 48-godzinnej infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznej krwi lub osocza

Poziom mRNA genu *GnRH-I* został określony w trzech częściach podwzgórza: przedwzrokowej (POA), przedniej (ang. *anterior hypothalamus*; AH) oraz brzuszno-przyśrodkowej (VM). Najwyższy stopień ekspresji genu gonadoliberyny w podwzgórzu oznaczono w jego części przedwzrokowej. Poziom *GnRH-I mRNA* w obszarze przedwzrokowym, w okresie długich dni świetlnych [$10,290 \pm 2,73$ jednostek względnej ekspresji (j.w.e.)] był kilkunastokrotnie wyższy ($P \leq 0.001$) od poziomu ekspresji tego genu w części przedniej [$0,724 \pm 0,35$ j.w.e.] oraz brzuszno-przyśrodkowej [$0,556 \pm 0,10$ j.w.e.] podwzgórza (Wykres 2A). Również w okresie najkrótszych dni roku poziom *GnRH-I mRNA* w obszarze przedwzrokowym [$3,246 \pm 0,33$ j.w.e.] pozostawał istotnie wyższy ($P \leq 0.01$) w stosunku do pozostałych analizowanych obszarów podwzgórza [$0,251 \pm 0,03$ j.w.e. (AH); $1,251 \pm 0,28$ j.w.e. (VM)] (Wykres 2B). Istotne różnice w poziomie mRNA gonadoliberyny obserwowano również w zależności od analizowanego okresu świetlnego. W okresie krótkich dni świetlnych poziom *GnRH-I mRNA* w części przedwzrokowej podwzgórza [$3,246 \pm 0,33$ j.w.e.] był istotnie niższy ($P \leq 0.01$) od poziomu ekspresji tego genu w POA w okresie długich dni świetlnych [$10,290 \pm 2,73$ j.w.e.]. W części VM podwzgórza w okresie krótkich dni świetlnych obserwowano istotny wzrost ($P \leq 0.05$) poziomu *GnRH-I mRNA* w stosunku do poziomu tego genu w okresie długich dni świetlnych (Wykres 2C).

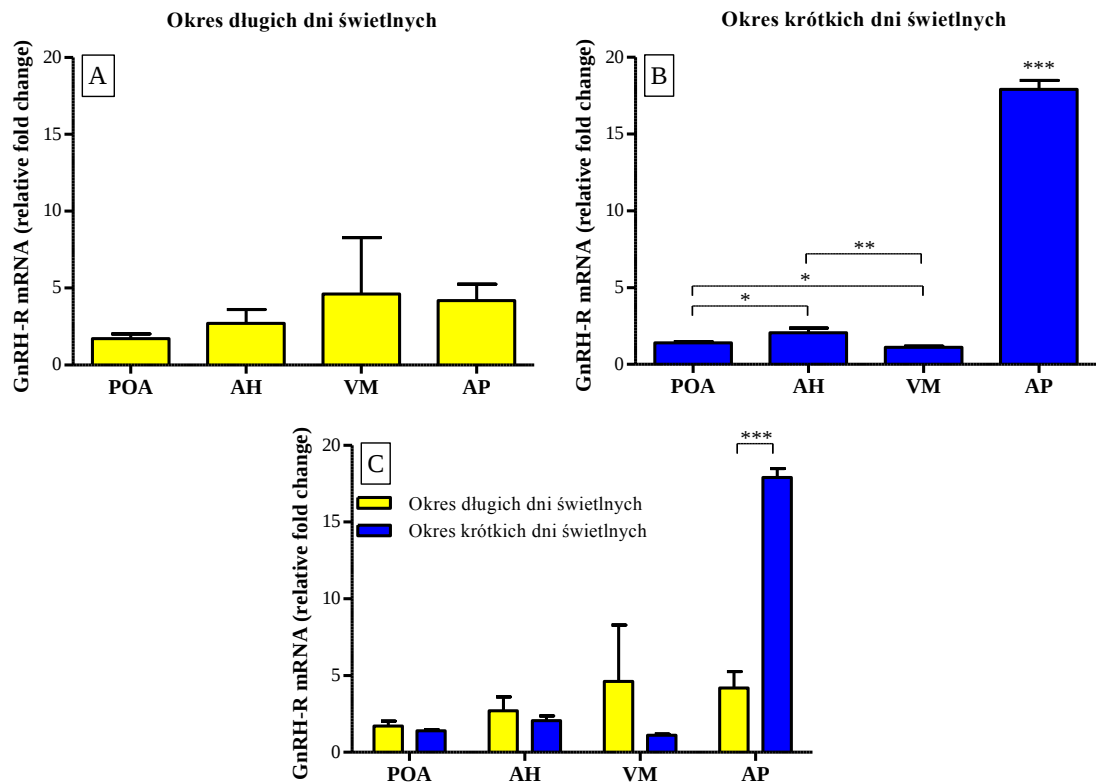


Wykres 2. Poziom *GnRH-I* mRNA w części przedwzrokowej (POA), przedniej (AH) oraz brzuszno-przyśrodkowej (VM) podwzgórza zwierząt grup kontrolnych którym do żyłnej zatoki oka infundowano autologiczną krew lub osocze w okresie długich (n=12) [A, C] oraz krótkich (n=12) [B, C] dni świetlnych, średnia $\pm$ SEM, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Poziom *GnRH-R* mRNA w podwzgórzu oraz przedniej części przysadki mózgowej po 48-godzinnej infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznej krwi lub osocza

Poziom mRNA genu *GnRH-R* po 48-godzinnej infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznej krwi, został określony w trzech częściach podwzgórza: przedwzrokowej, przedniej, brzuszno-przyśrodkowej oraz w przedniej części przysadki mózgowej (ang. *anterior pituitary*; AP). W okresie długich dni świetlnych nie obserwowano istotnych różnic

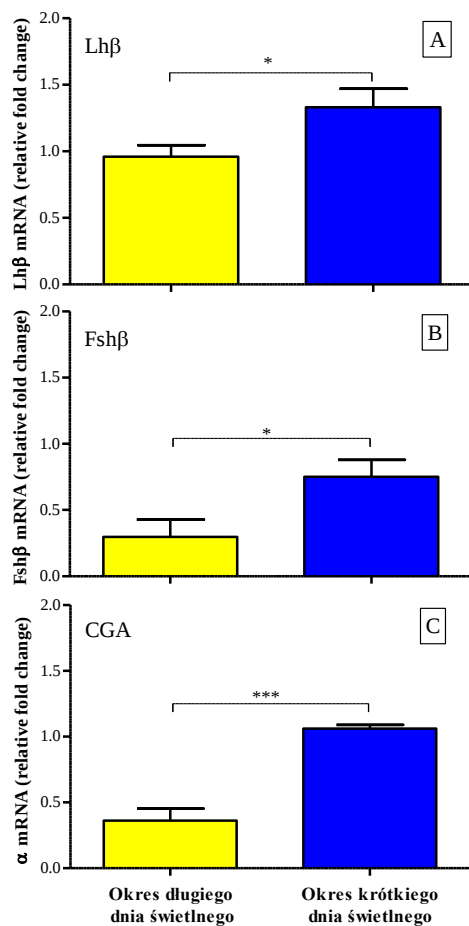
w poziomie ekspresji genu receptora gonadoliberyny w analizowanych częściach podwzgórza i przysadki mózgowej (Wykres 3A). Podczas najkrótszych dni roku poziom *mRNA GnRH-R* w przedniej części przysadki mózgowej [$17,90 \pm 0,59$ j.w.e] był istotnie wyższy niż w podwzgórzu [(POA) $1,413 \pm 0,06$; (AH) $2,052 \pm 0,33$; (VM) $1,102 \pm 0,09$ j.w.e] (Wykres 3B). W przedniej części przysadki mózgowej w okresie krótkich dni świetlnych poziom *mRNA GnRH-R* [$17,90 \pm 0,59$ j.w.e.] był kilkakrotnie wyższy ($P \leq 0.001$) niż podczas najdłuższych dni roku [$4,197 \pm 1,06$ j.w.e.] (Wykres 3C).



Wykres 3. Poziom *GnRH-R mRNA* w części przedwzrokowej, (POA), przedniej (AH) oraz brzusno-przyśrodkowej (VM) podwzgórza oraz w przedniej części przysadki mózgowej (AP) zwierząt grup kontrolnych którym do żyłnej zatoki oka infundowano autologiczną krew lub osocze w okresie długich (n=12) [A, C] oraz krótkich (n=12) [B, C] dni świetlnych, średnia $\pm$ SEM, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Poziom mRNA podjednostek gonadotropin w przedniej części przysadki mózgowej zwierząt grup kontrolnych po 48-godzinnej infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznej krwi lub osocza

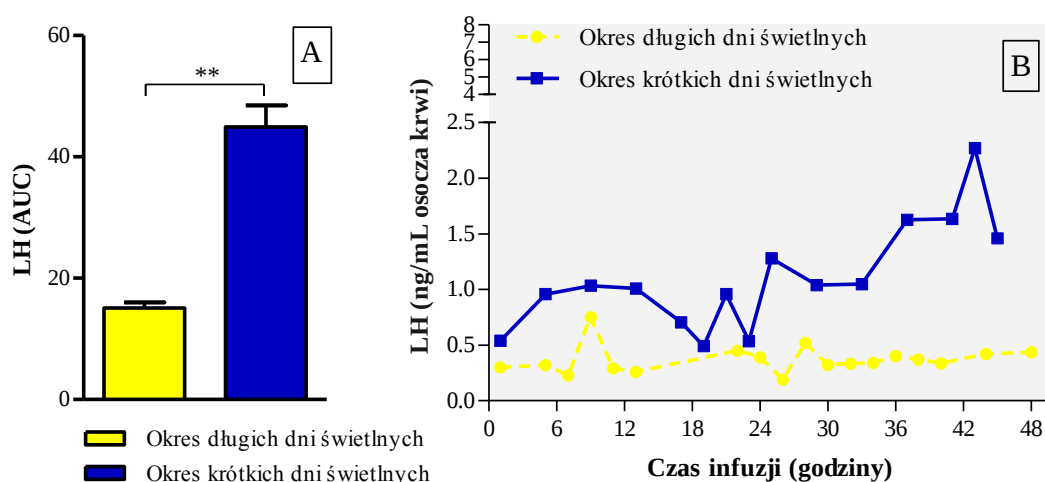
Poziom ekspresji genów podjednostek gonadotropin $Lh\beta$ [$1,33 \pm 0,14$ j.w.e.], $Fsh\beta$ [$0,751 \pm 0,13$ j.w.e.] oraz wspólnej podjednostki α [$1,062 \pm 0,03$ j.w.e.] w przedniej części przysadki mózgowej w okresie krótkich dni świetlnych był istotnie wyższy od poziomu ekspresji tych genów podczas najdłuższych dni roku [$(Lh\beta)$ $0,959 \pm 0,09$; $(Fsh\beta)$ $0,298 \pm 0,13$; (α) $0,363 \pm 0,09$ j.w.e.] (Wykres 4).



Wykres 4. Poziom $Lh\beta$ [A], $Fsh\beta$ [B] oraz α [C] mRNA w przedniej części przysadki mózgowej (AP) zwierząt grup kontrolnych którym do żyłnej zatoki oka infundowano autologiczną krew lub osocze w okresie długich (n=12) oraz krótkich (n=12) dni świetlnych, średnia $\pm$ SEM, * $P \leq 0,05$, * $P \leq 0,001$**

Analiza sezonowych zmian poziomu LH w osoczu krwi obwodowej po 48-godzinnej infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznej krwi lub osocza

Wyniki pomiaru stężenia hormonu luteotropowego w grupach kontrolnych zostały przedstawione w jednostkach pola powierzchni pod krzywą (AUC - ang. *area under curve*) (Wykres 5A) oraz jako przykładowe 48-godzinne profile uwalniania LH (ng/ml) do krążenia obwodowego (Wykres 5B).

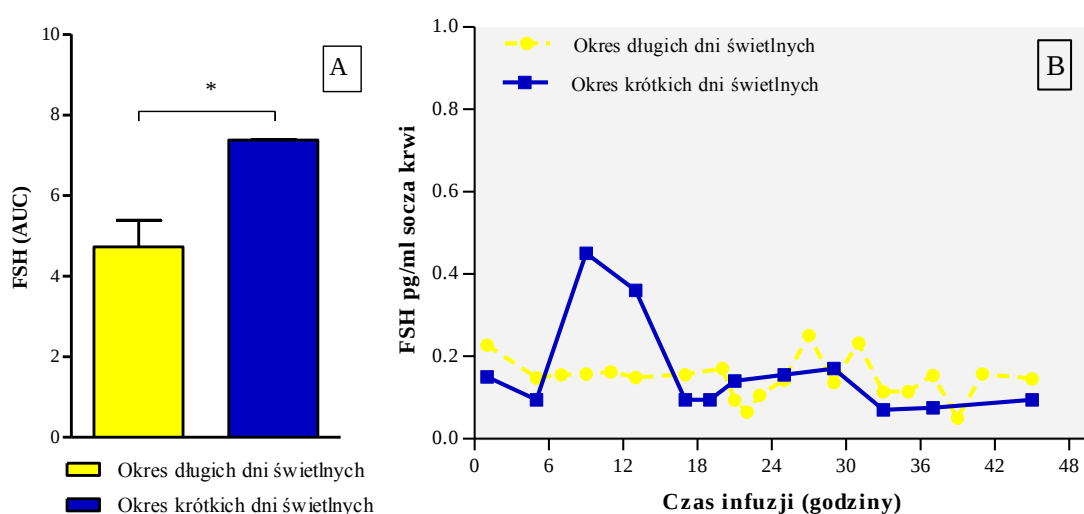


Wykres 5. Poziom LH (AUC) w osoczu krwi obwodowej zwierząt grup kontrolnych, którym do żyłnej zatoki oka infundowano autologiczną krew lub osocze w okresie długich (n=6) oraz krótkich (n=6) dni świetlnych, średnia ± SEM, ** $P < 0.01$ [A], oraz przykładowe profile LH w surowicy krwi (ng/mL) u jednego osobnika z każdej z grup [B].

Poziom hormonu luteotropowego w osoczu krwi obwodowej zwierząt w okresie krótkiego dnia świetlnego [$44,92 \pm 3,57$ jednostek AUC] był 3-krotnie wyższy ($P \leq 0.01$) od poziomu LH, który zanotowano dla analogicznej grupy doświadczalnej w okresie długiego dnia świetlnego [$15,06 \pm 0,94$ jednostek AUC] (Wykres 5).

Analiza sezonowych zmian poziomu FSH w osoczu krwi obwodowej po 48-godzinnej infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznej krwi lub osocza

Wyniki pomiaru stężenia hormonu folikulotropowego w grupach kontrolnych przedstawiono w jednostkach pola powierzchni pod krzywą (AUC) uwalniania FSH do krążenia obwodowego (Wykres 6A) oraz jako przykładowe 48-godzinne profile FSH (pg/ml) (Wykres 6B).



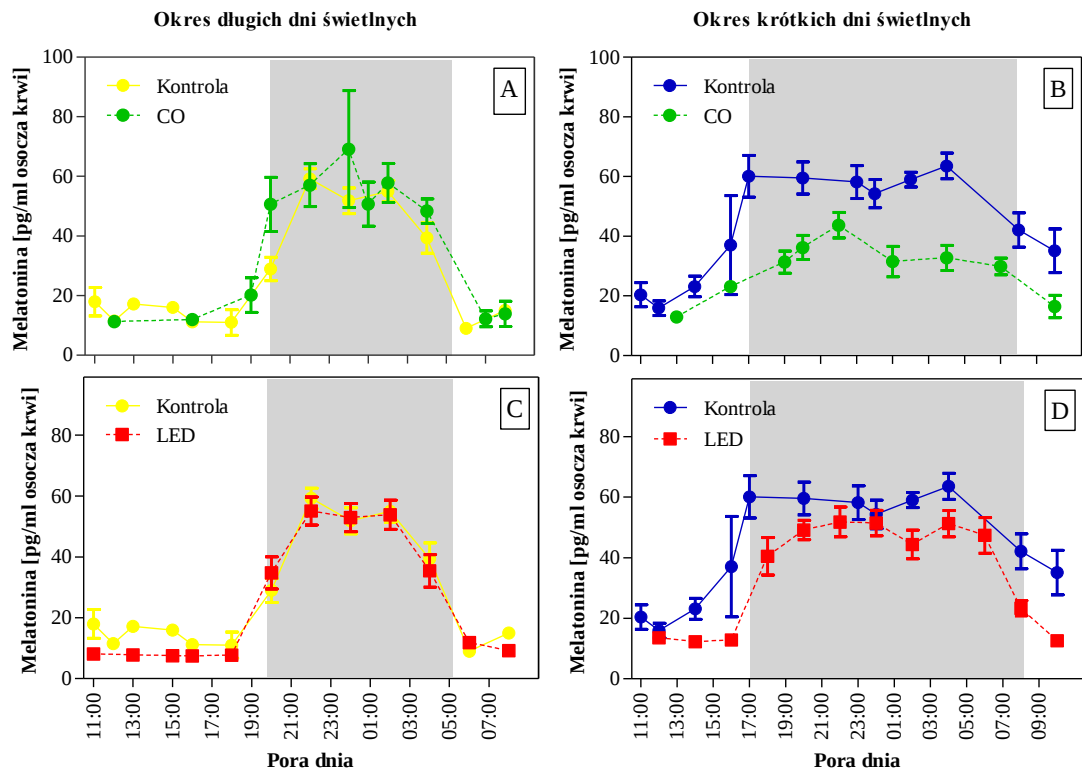
Wykres 6. Poziom FSH (AUC) w osoczu krwi obwodowej zwierząt grup kontrolnych którym do żyłnej zatoki oka infundowano autologiczną krew lub osocze, w okresie długich (n=12) oraz krótkich (n=12) dni świetlnych, średnia $\pm$ SEM, ** $P \leq 0.05$ [A], oraz przykładowe profile FSH w surowicy krwi (ng/mL) u jednego osobnika z każdej z grup [B].

Poziom hormonu folikulotropowego w osoczu krwi obwodowej zwierząt w okresie krótkich dni świetlnych [$7,38 \pm 0,01$ jednostek AUC] był istotnie wyższy ($P \leq 0.05$) od poziomu FSH w osoczu krwi obwodowej analogicznej grupy zwierząt w okresie długich dni świetlnych [$4,73 \pm 0,65$ jednostek AUC] (Wykres 6).

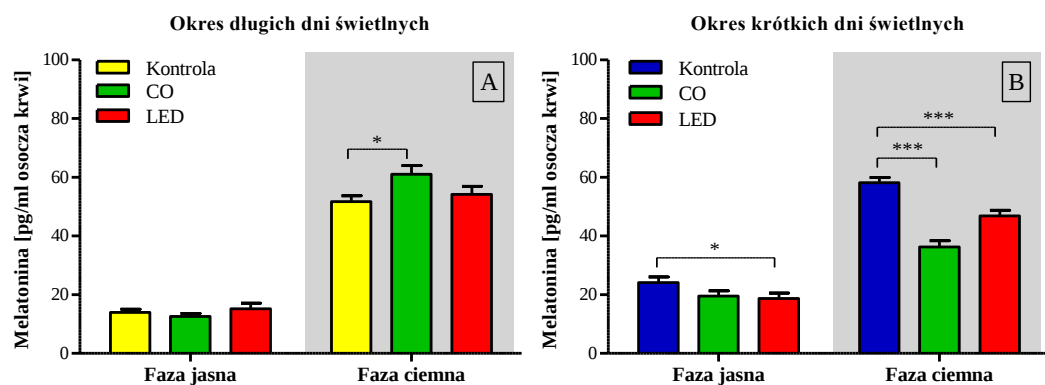
Analiza sezonowego i dobowego profilu uwalniania melatoniny do krążenia ogólnego w trakcie 48-godzinnej infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED

Sezonowe i dobowe zmiany poziomu melatoniny w krwi obwodowej w trakcie 48-godzinnej infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla, oraz autologicznej krwi naświetlanej światłem LED, zostały przedstawione, jako dobowy profil uwalniania melatoniny do krążenia ogólnego (Wykres 7), oraz jako średnie stężenie melatoniny w krwi obwodowej (Wykres 8).

Podczas fazy ciemnej okresu krótkich dni świetlnych obserwowano istotny spadek ($P \leq 0.001$) poziomu melatoniny [$36,32 \pm 2,08$ pg/ml osocza krwi] towarzyszący infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla, w stosunku do grupy kontrolnej [$58,25 \pm 1,75$ pg/ml osocza krwi]. Amplituda wzrostu wydzielania melatoniny podczas fazy ciemnej w drugiej grupie doświadczalnej (CO) [$18,25 \pm 2,87$] spadła ponad 2-krotnie ($P \leq 0.05$) w odniesieniu do grupy kontrolnej [$39,41 \pm 4,84$]. Infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznego osocza wzbogaconego CO podczas fazy ciemnej okresu długich dni świetlnych towarzyszył wzrost ($P \leq 0.05$) poziomu melatoniny [$61,06 \pm 2,97$ pg/ml osocza krwi] w porównaniu do poziomu tego hormonu w tym samym okresie w grupie kontrolnej [$51,67 \pm 2,05$ pg/ml osocza krwi]. Podczas fazy jasnej nie obserwowano istotnych zmian w stężeniu melatoniny w krążeniu ogólnym, które towarzyszyłyby zwiększonemu stężeniu tlenu węgla w zatoce żyłnej oka. W trzeciej grupie doświadczalnej (LED), w trakcie infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznej krwi naświetlanej światłem LED, skróceniu o ponad dwie godziny [$2,34 \pm 0,35$ godziny; $P \leq 0.05$] uległ okres podniesionego poziomu uwalniania melatoniny w fazie ciemnej [$14,14 \pm 0,42$ godzin] w porównaniu do grupy kontrolnej [$16,48 \pm 0,26$ godzin]. W okresie długich dni świetlnych, nie obserwowano istotnych różnic w sposobie uwalniania, oraz poziomie melatoniny towarzyszących infuzji do zatoki jamistej oka krwi autologicznej naświetlanej światłem LED.



Wykres 7. Dobowe profile melatoniny (pg/mL) w osoczu krwi obwodowej zwierząt w trakcie 48-godzinnej infuzji do zatoki ocznej ub autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla (CO) lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED (LED), w okresie długich [A, C] oraz krótkich [B, D] dni świetlnych.

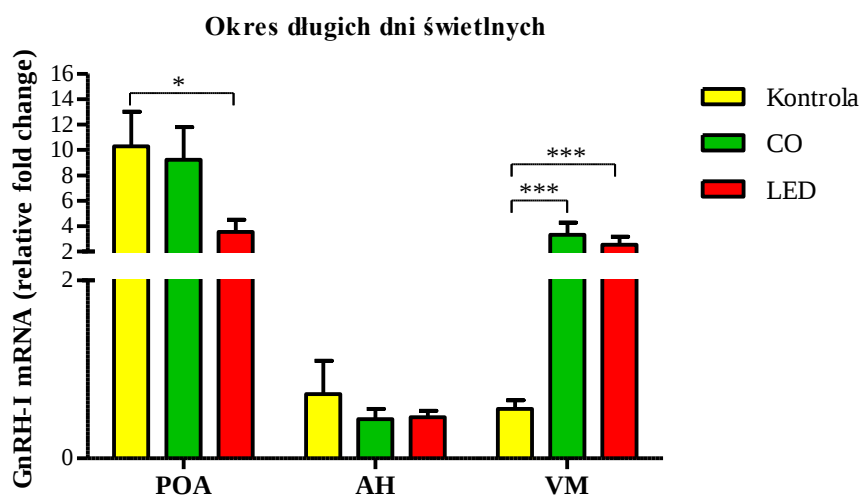


Wykres 8. Poziom melatoniny (AUC) w osoczu krwi obwodowej zwierząt w trakcie 48-godzinnej infuzji do zatoki ocznej autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla (CO; n=6) lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED (LED; n=6) w okresie długich [A] oraz krótkich [B] dni świetlnych, średnia $\pm$ SEM, * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$.

Poziom *GnRH-I* mRNA w podwzgórzu zwierząt po 48-godzinnej infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED

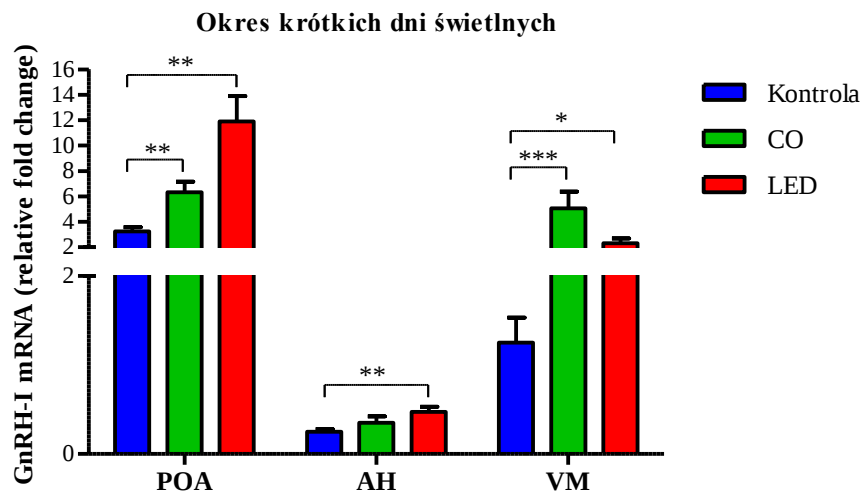
Poziom mRNA genu *GnRH-I* został określony w trzech częściach podwzgórza: przedwzrokowej, przedniej oraz brzuszo-przyśrodkowej.

W okresie długich dni świetlnych w wyniku infuzji do zatoki ocznej krwi naświetlanej światłem LED poziom *GnRH-I* mRNA w części przedwzrokowej podwzgórza [$3,557 \pm 0,96$ j.w.e.] istotnie się obniżył ($P \leq 0,05$) w stosunku do grupy kontrolnej [$10,290 \pm 2,73$ j.w.e.]. W części brzuszo-przyśrodkowej podwzgórza obserwowano istotny wzrost ($P \leq 0,001$) poziomu *GnRH-I* mRNA zarówno po infuzji autologicznego osocza o podniesionej zawartości CO [$3,330 \pm 0,94$ j.w.e.] jak również w wyniku infuzji autologicznej krwi naświetlanej światłem LED [$2,536 \pm 0,64$ j.w.e.] względem kontroli [$0,556 \pm 0,10$ j.w.e.] (Wykres 9).



Wykres 9. Poziom *GnRH-I* mRNA w części przedwzrokowej, (POA), przedniej (AH) oraz brzuszo-przyśrodkowej (VM) podwzgórza zwierząt po 48-godzinnej infuzji do zatoki autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla (CO; n=6) lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED (LED; n=6) w okresie długich dni świetlnych, średnia $\pm$ SEM, * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$.

W okresie krótkich dni świetlnych w części przedwzrokowej podwzgórza (POA) obserwowano istotny wzrost poziomu ekspresji genu *GnRH-I* po infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznego osocza o podniesionej zawartości CO [$6,337 \pm 0,83$ j.w.e.; $P \leq 0.01$] jak również autologicznej krwi naświetlanej światłem LED [$11,91 \pm 1,99$ j.w.e.; $P \leq 0.01$] w stosunku do kontroli [$3,246 \pm 0,33$ j.w.e.]. W części przedniej podwzgórza istotny wzrost ($P \leq 0.01$) poziomu *GnRH-1* mRNA względem kontroli [$0,251 \pm 0,03$ j.w.e.] obserwowano jedynie po infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznej krwi naświetlanej światłem LED [$0,472 \pm 0,06$ j.w.e.] (Wykres 10).

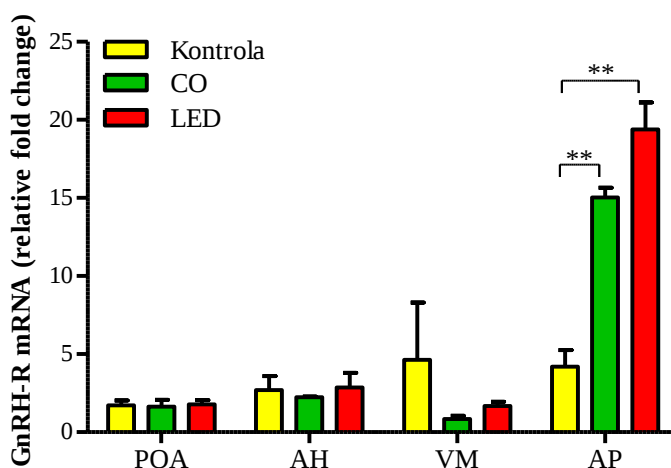


Wykres 10. Poziom *GnRH-I* mRNA w części przedwzrokowej, (POA), przedniej (AH) oraz brzuszno-przyśrodkowej (VM) podwzgórza zwierząt po 48-godzinnej infuzji do zatoki ocznej autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla (CO; n=6) lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED (LED; n=6) w okresie krótkich dni świetlnych, średnia $\pm$ SEM, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Poziom *GnRH-R* mRNA w podwzgórzu oraz przedniej części przysadki mózgowej po 48-godzinnej infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED

Poziom mRNA genu *GnRH-R* został określony w podwzgórzu w części: przedwzrostkowej, przedniej i brzuszo-przyśrodkowej oraz w przedniej części przysadki mózgowej.

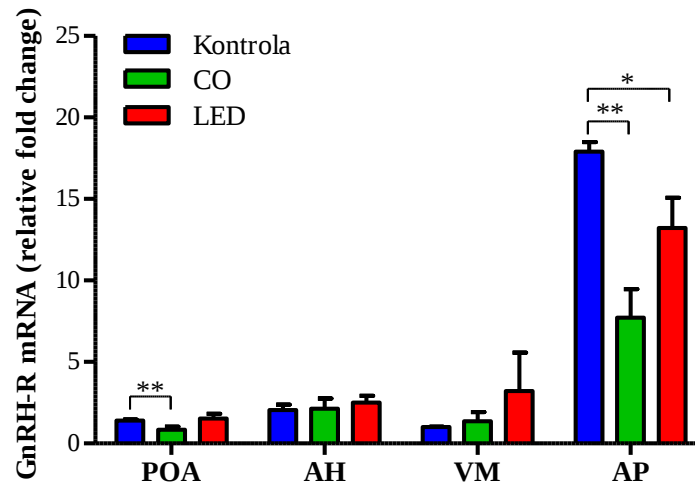
W okresie długich dni świetlnych poziom ekspresji genu receptora gonadoliberyny (*GnRH-R*) w przedniej części przysadki mózgowej istotnie wzrósł w odniesieniu do kontroli [$4,197 \pm 1,06$ j.w.e.] zarówno po infuzji do zatoki ocznej autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla [$15,020 \pm 0,64$ j.w.e.; $P \leq 0.01$] jak i autologicznej krwi naświetlanej światłem LED [$19,390 \pm 1,71$ j.w.e.; $P \leq 0.01$] (Wykres 11).



Wykres 11. Poziom *GnRH-R* mRNA w części przedwzrostkowej, (POA), przedniej (AH) oraz brzuszo-przyśrodkowej (VM) podwzgórza oraz w przedniej części przysadki mózgowej (AP) zwierząt po 48-godzinnej infuzji do zatoki ocznej autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla (CO; n=6) lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED (LED; n=6) w okresie długich dni świetlnych, średnia $\pm$ SEM, ** $P \leq 0.01$.

W okresie najkrótszych dni roku obserwowano spadek poziomu ekspresji genu receptora gonadoliberyny w przedniej części przysadki mózgowej po infuzji do zatoki ocznej autologicznego osocza o podniesionej zawartości CO [$7,718 \pm 1,75$ j.w.e.; $P \leq 0.01$] oraz autologicznej krwi naświetlanej światłem LED [$13,23 \pm 1,84$ j.w.e.; $P \leq 0.05$] w stosunku

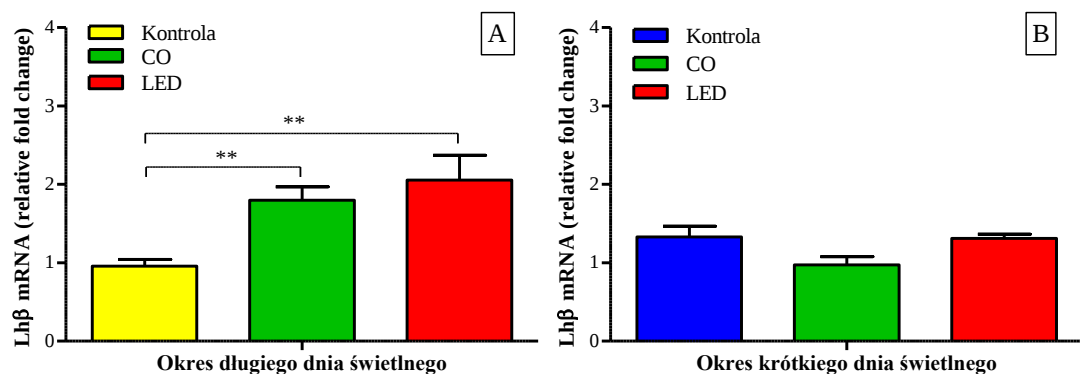
do kontroli [$17,90 \pm 0,59$ j.w.e.]. Również w części przedwzrokowej podwzgórza obserwowano spadek ($P \leq 0.01$) poziomu ekspresji genu receptora gonadoliberyny w wyniku infuzji do zatoki ocznej autologicznego osocza o podniesionej zawartości CO [$0,841 \pm 0,18$ j.w.e.] w odniesieniu do kontroli [$1,413 \pm 0,06$ j.w.e.] (Wykres 12).



Wykres 12. Poziom *GnRH-R mRNA* w części przedwzrokowej, (POA), przedniej (AH) oraz brzusno-przyśrodkowej (VM) podwzgórza oraz w przedniej części przysadki mózgowej (AP) zwierząt po 48-godzinnej infuzji do zatoki ocznej autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla (CO; n=6) lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED (LED; n=6) w okresie krótkich dni świetlnych, średnia $\pm$ SEM, * $P \leq 0.05$ ** $P \leq 0.01$.

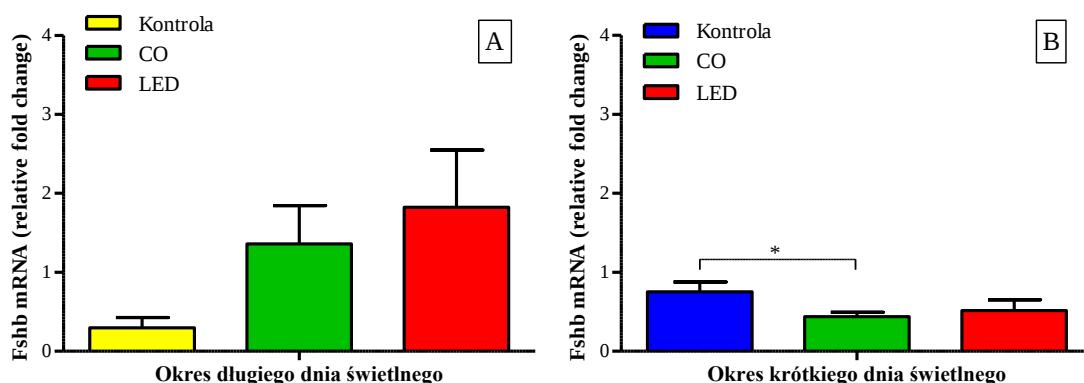
Poziom mRNA podjednostek gonadotropin w przedniej części przysadki mózgowej zwierząt po 48-godzinnej infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED

Poziom mRNA genów *Lhβ*, *Fshβ* oraz *α* został określony w przedniej części przysadki mózgowej.



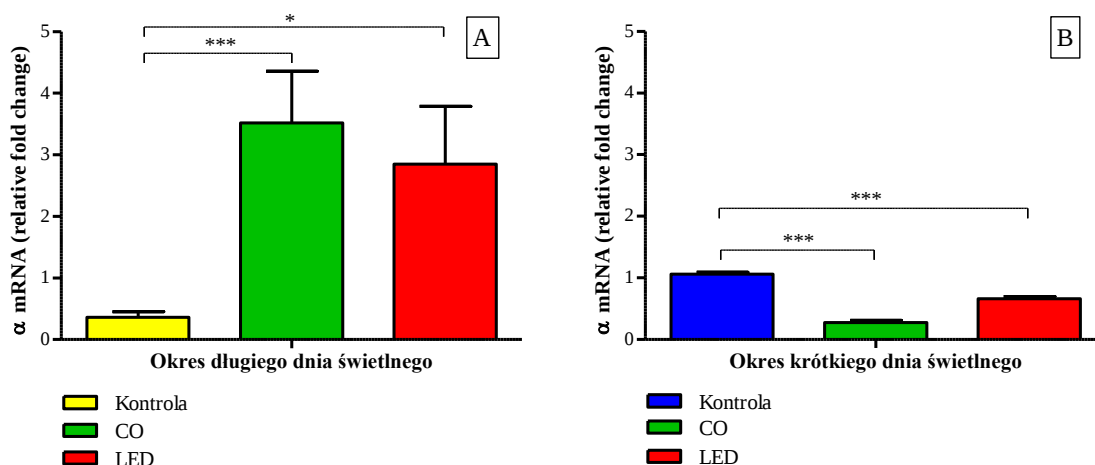
Wykres 13. Poziom *Lhβ* mRNA w przedniej części przysadki mózgowej (AP) zwierząt po 48-godzinnej infuzji do zatoki ocznej autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla (CO; n=6) lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED (LED; n=6) w okresie długich [A] oraz krótkich [B] dni świetlnych, średnia ± SEM, ** $P \leq 0.01$.

Istotne zmiany w poziomie ekspresji genu podjednostki *Lhβ* w przedniej części przysadki mózgowej w obu grupach eksperymentalnych obserwowano jedynie w okresie długich dni świetlnych. Zarówno w wyniku infuzji autologicznego osocza o podniesionej zawartości CO [$1,797 \pm 0,18$ j.w.e.; $P \leq 0.01$] jak również autologicznej krwi naświetlanej światłem LED [$2,054 \pm 0,32$ j.w.e.; $P \leq 0.01$] nastąpił wzrost poziomu *Lhβ* mRNA w odniesieniu do grupy kontrolnej [$0,959 \pm 0,09$ j.w.e.] (Wykres 13).



Wykres 14. Poziom *Fshb* mRNA w przedniej części przysadki mózgowej (AP) zwierząt po 48-godzinnej infuzji do zatoki ocznej autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla (CO; n=6) lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED (LED; n=6) w okresie długich [A] oraz krótkich [B] dni świetlnych, średnia $\pm$ SEM, * $P \leq 0.01$.

Latem nie obserwowano istotnych zmian w poziomie ekspresji genu podjednostki *Fshb* związanych ze zwiększeniem w zatoce żyłnej oka stężenia CO. Zimą nastąpił spadek poziomu ekspresji genu podjednostki *Fshb* [$0,438 \pm 0,06$ j.w.e.; $P \leq 0.05$] w porównaniu z grupą kontrolną [$0,751 \pm 0,13$ j.w.e] (Wykres 14).



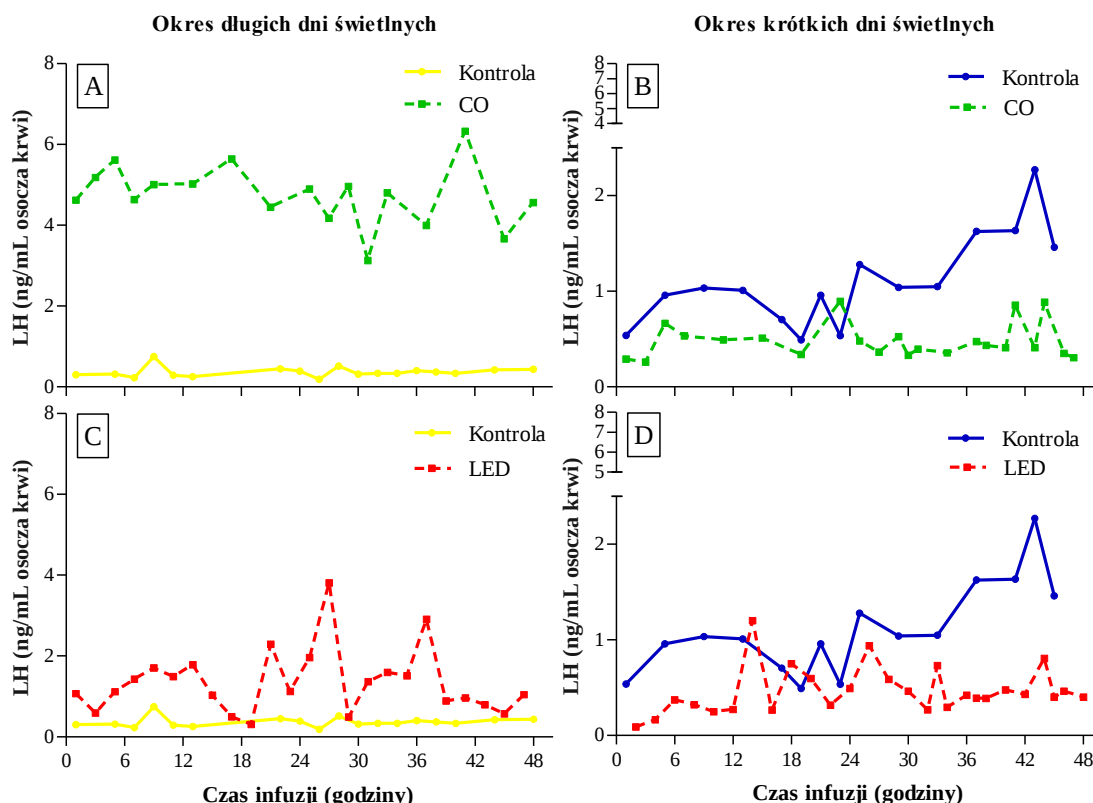
Wykres 15. Poziom α mRNA w przedniej części przysadki mózgowej (AP) zwierząt po 48-godzinnej infuzji do zatoki ocznej autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla (CO; n=6) lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED (LED; n=6) w okresie długich [A] oraz krótkich [B] dni świetlnych, średnia $\pm$ SEM, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Poziom ekspresji genu podjednostki α istotnie zmienił się w obu grupach eksperymentalnych zarówno latem jak i zimą. W okresie długich dni świetlnych obserwowano istotny wzrost poziomu α mRNA w wyniku infuzji autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla [$3,518 \pm 0,84$ j.w.e.; $P \leq 0.001$] oraz w wyniku infuzji autologicznej krwi naświetlanej światłem LED [$2,850 \pm 0,94$ j.w.e; $P \leq 0.05$] względem kontroli [$0,363 \pm 0,09$ j.w.e]. W okresie najkrótszych dni roku poziom α mRNA istotnie spadł po infuzji autologicznego osocza o podniesionej zawartości CO [$0,272 \pm 0,04$ j.w.e.; $P \leq 0.001$] jak również w wyniku infuzji autologicznej krwi naświetlanej światłem LED [$0,661 \pm 0,04$ j.w.e.; $P \leq 0.001$] w odniesieniu do kontroli [$1,062 \pm 0,03$ j.w.e.] (Wykres 15).

Poziom LH w osoczu krwi obwodowej zwierząt po 48-godzinnej infuzji do zatoki żyłnej autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED

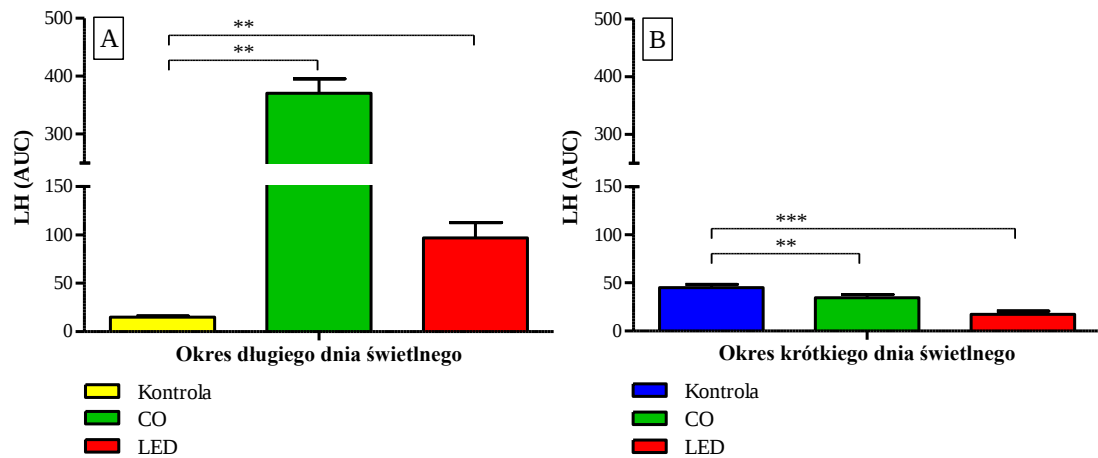
Wyniki pomiaru stężenia hormonu luteotropowego zostały przedstawione, jako przykładowe 48-godzinne profile uwalniania LH (ng/ml) do krążenia obwodowego (Wykres 16) oraz w jednostkach pola powierzchni pod krzywą (AUC) uwalniania LH (Wykres 17).

Poziom hormonu luteotropowego w osoczu krwi obwodowej zwierząt doświadczalnych w trakcie 48-godzinnej infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla w okresie długiego dnia świetlnego [$370,5 \pm 25,01$ jednostek AUC] był ponad 23 - krotnie wyższy ($P \leq 0.01$) od poziomu LH u zwierząt grupy kontrolnej [$15,06 \pm 0,94$ jednostek AUC] (Wykres 16A; Wykres 17A). Podczas infuzji do zatoki ocznej autologicznej krwi naświetlanej światłem LED w okresie długich dni świetlnych, w osoczu krwi obwodowej zwierząt poddanych tej procedurze poziom hormonu luteotropowego [$96,79 \pm 16,18$ jednostek AUC] był 6-krotnie wyższy ($P \leq 0.01$) od poziomu LH w grupie kontrolnej [$15,06 \pm 0,96$ jednostek AUC] (Wykres 16C; Wykres 17A).



Wykres 16. Przykładowe profile LH (ng/mL) w osoczu krwi obwodowej pojedynczych osobników w trakcie 48-godzinnej infuzji do zatoki ocznej autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla (CO) lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED (LED), w okresie długich [A, C] oraz krótkich [B, D] dni świetlnych

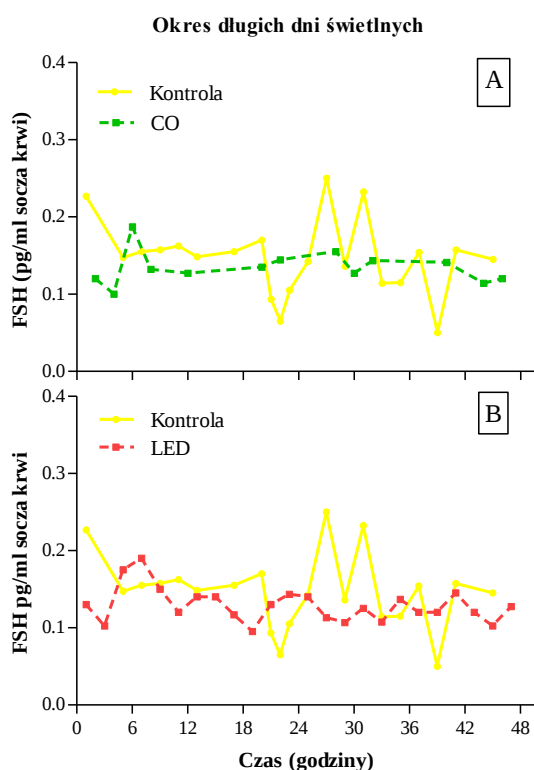
W okresie krótkiego dnia świetlnego, poziom hormonu luteotropowego u zwierząt, którym do zatoki ocznej infundowano autologiczną krew naświetlaną światłem LED [$17,56 \pm 4,87$ jednostek AUC] był istotnie niższy ($P \leq 0,001$) od poziomu LH u zwierząt grupy kontrolnej [$44,92 \pm 3,57$ jednostek AUC] (Wykres 16D; Wykres 17B). Infuzja autologicznego osocza krwi o podniesionej zawartości tlenu węgla w okresie krótkiego dnia świetlnego również spowodowała istotny spadek ($P > 0,05$) poziomu LH [$34,46 \pm 5,34$ jednostek AUC] w krwi obwodowej w stosunku do grupy kontrolnej [$44,92 \pm 3,57$ jednostek AUC] (Wykres 16B; Wykres 17B).



Wykres 17. Poziom LH (AUC) w osoczu krwi obwodowej zwierząt w trakcie 48-godzinnej infuzji do zatoki ocznej autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla (CO) lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED (LED) w okresie długich [A] oraz krótkich [B] dni świetlnych, średnia $\pm$ SEM, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

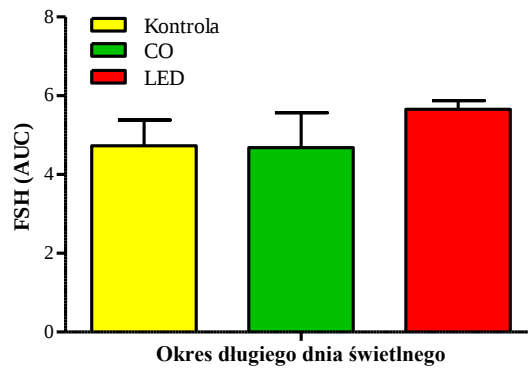
Poziom FSH w surowicy krwi obwodowej w trakcie 48-godzinnej infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED

Wyniki pomiaru stężenia hormonu folikulotropowego przedstawiono, jako przykładowe, 48-godzinne profile uwalniania FSH (pg/ml) do krążenia obwodowego w odniesieniu do grupy kontrolnej (Wykres 18) oraz w jednostkach pola powierzchni pod krzywą uwalniania FSH (Wykres 19).



Wykres 18. Przykładowe profile FSH (pg/mL) w osoczu krwi obwodowej pojedynczych osobników w trakcie 48-godzinnej infuzji do zatoki ocznej autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla (CO) [A] lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED (LED) [B] w okresie długich dni świetlnych

Poziom hormonu folikulotropowego w osoczu krwi obwodowej zwierząt doświadczalnych w trakcie 48-godzinnej infuzji do zatoki żyłnej oka osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla w okresie długiego dnia świetlnego [$4,68 \pm 0,89$ jednostek AUC] nie różnił się istotnie ($P > 0.05$) od poziomu FSH u zwierząt grupy kontrolnej [$4,73 \pm 0,65$ jednostek AUC] (Wykres 18A; Wykres 19). Nie obserwowano również istotnych zmian ($P > 0.05$) w poziomie hormonu folikulotropowego w osoczu krwi obwodowej zwierząt w trakcie infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznej krwi naświetlanej światłem LED w okresie długich dni świetlnych [$5,66 \pm 0,22$ jednostek AUC] (Wykres 18B; Wykres 19). Brak wyników pomiaru FSH w grupach (CO) i (LED) w okresie krótkich dni świetlnych, jest spowodowane tym, że poziom hormonu znajdował się poniżej najniższego punktu krzywej wzorcowej.



Wykres 19. Poziom FSH (AUC) w osoczu krwi obwodowej zwierząt w trakcie 48-godzinnej infuzji do zatoki ocznej autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenku węgla (CO) lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED (LED) w okresie długich dni świetlnych, średnia $\pm$ SEM.

V DYSKUSJA

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy są następstwem wykazania zmienności sekrecji CO w obszarze oka (Koziorowski i wsp., 2012) i mają za cel określenie drogą pośrednią czy CO drogą przeciwprądowego przenikania w obszarze zatoki jamistej (przez którą przepływa krew po opuszczeniu zatoki żyłnej oka) może bezpośrednio docierać do struktur mózgowych (transport docelowy) i wpływać na regulacje fizjologiczne u samców związane z rozrodem.

Jak wykazano wcześniej, w okołoprzysadkowym kompleksie naczyniowym (*peryhypophyseal vascular complex*) w wyniku mechanizmu przeciwprądowego przenikania, z krwi żyłnej *sinus cavernosus* przenikają do krwi tętniczej (*rete mirabile caroticum*) zaopatrującej przysadkę i mózg, neurotransmitery o wielokrotnie większych rozmiarach cząsteczek jak GnRH (Krzymowski i wsp. 1992, Grzegorzewski i wsp., 1997), beta endorfina (Krzymowski i wsp. 1992, Skipor i wsp. 1997), oksytocyna (Grzegorzewski i wsp. 1995), dopamina (Skipor i wsp. 2001) oraz feromony: androstenol i androstenon (Krzymowski i wsp. 1999, 2001, Stefańczyk- Krzymowska i wsp. 2000). Tym bardziej w tym obszarze musi występować łatwe przenikanie cząsteczek CO (wielkość 28,01 Daltona) z krwi żyłnej do krwi tętniczej zaopatrującej obszar mózgu. Obecność sieci dziwnej w obszarze zatoki ocznej *sinus cavernosus* spłotu okołoprzysadkowego zwiększa prawdopodobieństwo takiej zależności. Żyłny odpływ oczny docierając do tego obszaru niesie ze sobą cząsteczki CO. W tych obszarach wydaje się być możliwe przenikanie CO z żylnego odpływu do naczyń tętniczych i docelowy transfer do struktur mózgu z pominięciem krążenia ogólnego.

W mózgu ssaków strukturami odpowiedzialnymi za dobowe i sezonowe regulacje są w głównej mierze odpowiedzialne struktury przodomózgowia i jądro nadskrzyżowaniowe. W obu tych obszarach stwierdzono obecność genów rytmów dobowych – *per* i *cry*, aktywowanych przez melatoninę (Green i Menaker 2003, Lincoln i wsp. 2003a) w zależności od długości dnia świetlnego. Badania przeprowadzone na identycznym modelu doświadczalnym, jaki został wykorzystany w niniejszej pracy wykazały, że wzrost stężenia CO w krwi dopływającej do żyłnej zatoki ocznej prowadził do zmian w poziomie ekspresji genów zegara prowadząc do jego rozregulowania (Gilun i wsp., 2013; Gilun,

praca doktorska). Wyniki powyższego doświadczenia umacniają celowość postawionej hipotezy, że tlenek węgla może funkcjonować jako humoralny nośnik informacji z oka do struktur biorących udział w odbiorze i transmisji sygnału światła a tym samym może docierać do obszarów mózgu odpowiedzialnych za regulacje fizjologiczne związane z rozrodem i wpływać na ich aktywność.

1. Wpływ infuzji do zatoki jamistej okołoprzysadkowego kompleksu naczyniowego autologicznej krwi lub autologicznego osocza o fizjologicznym stężeniu tlenu węgla na poziom ekspresji genów *GnRH*, *GnRH-R*, *Lhβ*, *Fshβ* i α

U zwierząt rozmnażających się sezonowo fotoperiod jest głównym czynnikiem środowiskowym, który synchronizuje aktywność reprodukcyjną z określoną porą roku zapewniając przyjście na świat potomstwa w najbardziej sprzyjających warunkach środowiskowych. Melatonina jest głównym neurohormonalnym czynnikiem niosącym w organizmie informację o rytmicznych okołodobowych i sezonowych zmianach w intensywności światła środowiskowego. Zakodowany w zmiennym profilu sekrecji melatoniny sygnał o długości fotoperiodu moduluje funkcje reprodukcyjne przez regulację sekrecji gonadotropin (Karsch i wsp., 1984; Reiter, 1991).

W osoczu krwi obwodowej świniodzików grupy kontrolnej, poziom melatoniny mierzony w trakcie 48-godzinnej infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznej krwi lub osocza, charakteryzował się dobową i sezonową zmiennością. Okres podniesionego poziomu melatoniny korelował z długością fazy ciemnej w danym sezonie i był około dwukrotnie dłuższy zimą niż latem. Jednocześnie nie stwierdzono różnic w amplitudzie nocnego wzrostu wydzielania tego hormonu między sezonami (Wykres 1).

Amplituda i częstotliwość pulsów wydzielania GnRH w podwzgórzu determinują występujące w cyklu rocznym fluktuacje funkcji reprodukcyjnych u zwierząt rozmnażających się sezonowo. Zmiany pulsacyjnego wzoru uwalniania GnRH różnicowo regulują syntezę LH i FSH (Haisenleder i wsp., 1997). Wyniki badań dotyczących udziału fotoperiodu w regulacji ekspresji genu *GnRH* u sezonowo rozmnażających się zwierząt są

niespójne, nasuwają jednak przypuszczenie że wpływ długości dnia na poziom *GnRH mRNA* jest raczej niewielki (Porkka-Heiskanen i wsp., 1997; Ronchi i wsp., 1992; Kawamoto i wsp., 2000).

Ekspresja genu *GnRH* miała miejsce we wszystkich analizowanych obszarach podwzgórza a najwyższy jej stopień obserwowano w części przedwzrokowej (Wykres 2). U świń, podobnie jak u innych ssaków takich jak gryzonie czy przeżuwacze, największa populacja neuronów *GnRH* jest zlokalizowana w części przedwzrokowej podwzgórza (Merchenthaler i wsp., 1984; Lehman i wsp., 1986; Kineman i wsp., 1988; Caldani i wsp., 1995). Najwyższy poziom *GnRH mRNA* w tym obszarze podwzgórza u świniodzika może być zatem bezpośrednio związany z liczbą komórek *GnRH*.

Poziom ekspresji genu *GnRH* w analizowanych obszarach podwzgórza wykazywał istotne sezonowe różnice (Wykres 2). W części przedwzrokowej w okresie krótkich dni świetlnych poziom *GnRH mRNA* był istotnie niższy w odniesieniu do okresu długich dni świetlnych. W części brzuszno-przyśrodkowej podwzgórza obserwowano odwrotną zależność; poziom *GnRH mRNA* był istotnie wyższy zimą w porównaniu do lata. Z powodu braku danych na temat degradacji *GnRH mRNA* i translacji w komórkowym procesie biosyntezy, nie można określić jasnego połączenia między poziomem *GnRH mRNA* a aktualną aktywnością transkrypcyjną. Analiza związku między zmianami poziomu *GnRH mRNA* w części przedwzrokowej podwzgórza a uwalnianiem LH wykazała, że wzrost poziomu LH jest związany ze spadkiem ekspresji *GnRH mRNA*. Można zatem wnioskować, że u świniodzika sezonowe zmiany aktywności układu *GnRH* są regulowane na poziomie potranskrypcyjnym lub potranslacyjnym, wpływając na uwalnianie gonadoliberyny z neuronów *GnRH*-ergicznym (Brown i wsp., 2001). Możliwość istnienia oddzielnego mechanizmu regulującego poziom *GnRH mRNA* od tego który steruje uwalnianie tego hormonu może być dodatkowo potwierdzone przez wyniki badań przeprowadzonych na owcach, u których hamujące działanie progesteronu na sekrecję *GnRH* nie było związane z zawartością *GnRH mRNA* w komórkach podwzgórza (Robinson i wsp., 2000).

W części brzuszno-przyśrodkowej podwzgórza świniodzika obserwowano odwrotną w stosunku do części przedwzrokowej podwzgórza sezonową zależność w poziomie *GnRH*

mRNA (Wykres 2B). Zimą poziom ekspresji genu *GnRH* w VMH istotnie wzrósł w porównaniu do lata. Wyniki badań Łapot i współpracowników (2008) przeprowadzone na owcach, którym do trzeciej komory mózgu infundowano *GnRH* wykazały znaczny wzrost poziomu *GnRH mRNA* w części brzuszno-przyśrodkowej podwzgórza i brak istotnego wpływu na poziom ekspresji genu *GnRH* w części przedwzrostkowej i przedniej podwzgórza. Zatem istnieje możliwość, że *GnRH* w części brzuszno-przyśrodkowej podwzgórza stymuluje aktywność transkrypcyjną swojego genu. Autorzy sugerują również, że wyższy poziom *GnRH mRNA* w VM może wynikać również ze wzrostu stabilności transkryptu (Łapot i wsp., 2008).

Na podstawie dostępnej literatury nie można jednoznacznie określić związku między aktualną aktywnością transkrypcyjną genu *GnRH* a biosyntezą *GnRH*, dlatego konieczne są dalsze badania, aby wyjaśnić mechanizm w którym jest produkowany ten nadrzędny regulator osi rozrodczej.

Równoczesna analiza ekspresji genu receptora *GnRH* (*GnRH-R*) wykazała, obecność *GnRH-R mRNA* w przednim płacie przysadki mózgowej oraz we wszystkich analizowanych obszarach podwzgórza (Wykres 3). W okresie długich dni świetlnych poziom *mRNA* genu *GnRH-R* był porównywalny we wszystkich analizowanych strukturach. Podczas krótkich dni świetlnych zanotowano istotny wzrost ekspresji genu receptora *GnRH* w przednim płacie przysadki mózgowej w stosunku do okresu długich dni świetlnych. Zawartość *GnRH-R mRNA* w przednim płacie przysadki mózgowej była również istotnie wyższa od poziomu transkryptu tego genu we wszystkich analizowanych obszarach podwzgórza (Wykres 3).

Wzrost ekspresji genu *GnRH-R* w przednim płacie przysadki mózgowej w okresie zimy jest najprawdopodobniej wynikiem działania *GnRH*, który jest regulatorem ekspresji genu *GnRH-R* (Adams i wsp., 1996; Turzillo i wsp., 1998; Yasin i wsp., 1995) jak również aktywności receptora *GnRH* (Kirkpatrick i wsp., 1998; Turzillo i wsp., 1995; Vizcarra i wsp., 1997). Wyniki licznych badań wskazują, że stymulujący (Bauer i wsp., 1995, Kaiser i wsp., 1997, Lin i Conn 1999, Turzillo i wsp., 1995, Yasin i wsp., 1995) lub hamujący (Adams i wsp., 1996, Sakakibara i wsp., 1996, Turzillo i wsp., 1998, Vizcarra

i wsp., 1997) wpływ GnRH na ekspresję genu *GnRH-R* zależy w dużym stopniu od amplitudy i częstotliwości pulsów GnRH.

W licznych badaniach wykazano zarówno stymulujące jak i hamujące działanie hormonów steroidowych, progesteronu i estradiolu, na komórki przedniego płata przysadki wpływając na liczbę GnRH-R na powierzchni gonadotropów (Cheng i Leung, 2000). U świniodzików, w identycznym modelu eksperymentalnym jaki został wykorzystany w tej pracy, wykazano sezonowe różnice w poziomie tych steroidów (Gilun, praca doktorska); zimą poziom zarówno progesteronu jak i estradiolu w osoczu krwi obwodowej był istotnie wyższy w odniesieniu do lata. U szczurów estrogeny obniżają ekspresję genu *GnRH-R* w przedniej części przysadki mózgowej a progesteron przywraca indukowany estradiolem spadek stężenia *GnRH-R mRNA* (Yasin i wsp., 1995). U owiec wykazano supresyjne działanie progesteronu na ekspresję *GnRH-R mRNA* (Turzillo i wsp., 1994, 1995), a stymulujące estradiolu (Adams i wsp., 1996, Brooks i McNeilly 1994; Kirkpatrick i wsp., 1998, Turzillo i wsp., 1998). Wpływ steroidów gonadalnych na ekspresję genu receptora GnRH w przednim płacie przysadki mózgowej wydaje się więc być gatunkowo specyficzny.

Poziom zarówno lutropiny (LH) i folitropiny (FSH) w osoczu krwi obwodowej charakteryzował się sezonową zmiennością, osiągając zimą wyższy poziom w porównaniu do lata (Wykres 5; Wykres 6). Taką samą zależność obserwowano w poziomie ekspresji genów podjednostek gonadotropin ($Lh\beta$, $Fsh\beta$, α) (Wykres 4).

U świni domowej sekrecja LH z przysadki mózgowej podlega sezonowym zmianom. Pulsy LH są bardziej regularne i mają wyższą amplitudę w okresie krótkich dni świetlnych w porównaniu do okresu długich dni świetlnych (Peacock, 1991; Peterson, 1992; Peltoniemi, 1997b). Kontrola syntezy LH i FSH jest ściśle połączona z transkrypcją odrębnych podjednostek β , odpowiednio $Lh\beta$ i $Fsh\beta$. Podobnie jak sekrecja folitropiny i lutropiny, transkrypcja podjednostek tych gonadotropin jest również zależna od amplitudy i frekwencji pulsów GnRH (Dalkin i wsp 1989; Heisenleder i wsp., 1991; Jakubowiak i wsp., 1989; Kaiser i wsp., 1997; Burger i wsp., 2004; Ferris i Shupnik, 2006).

U owiec istnieje bezpośredni związek między okresem podniesionej nocnej sekrecji melatoniny a regulacją sekrecji GnRH (Lincoln i wsp., 2003). Występowanie sezonowych różnic w profilu melatoniny oraz poziomie LH w krążeniu obwodowym świniodzików, może oznaczać, że w aspekcie neuroendokrynologicznych mechanizmów regulujących sezonowość rozrodu nie odbiegają one od innych sezonowo rozmnażających się zwierząt.

2. Wpływ infuzji do zatoki ocznej autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED na poziom melatoniny w krążeniu ogólnym

Światło jest głównym czynnikiem zmieniającym odpowiedź melatoniny. Ogrom prac badawczych również na świnich dowodzi, że zmienne warunki oświetlenia mogą zmieniać profil sekrecji melatoniny. Zgodnie z hipotezą przyjętą w tej pracy, sezonowo zmienna zawartość CO w krwi odpływającej z oka (Koziorowski i wsp., 2012) pełni funkcje humoralnego nośnika informacji o warunkach oświetlenia środowiska. Imitacja fizjologicznego wzrostu poziomu CO w okresie krótkich dni świetlnych w krwi dopływającej do zatoki jamistej okołoprzysadkowego kompleksu naczyniowego powinna spowodować zmiany w odpowiedzi melatoniny.

U zwierząt eksperymentalnych zarówno podczas lata i zimy w trakcie infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznego osocza o podniesionej zawartości CO jak i infuzji autologicznej krwi naświetlanej światłem LED poziom melatoniny w krążeniu ogólnym charakteryzował się okołodobowym rytmem, z cyklicznym wzrostem stężenia melatoniny podczas fazy ciemnej (Wykres 7AB; Wykres 8). W trakcie 48-godzinnej infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznego osocza o podniesionej zawartości CO obserwowano różnice w amplitudzie nocnego wzrostu melatoniny w zależności od długości dnia świetlnego. Zimą nastąpił spadek nocnego poziomu melatoniny, natomiast latem obserwowano niespodziewany wzrost amplitudy melatoniny podczas fazy ciemnej w stosunku do grupy kontrolnej.

Spadek poziomu melatoniny w osoczu krwi obwodowej podczas zimowej nocy w wyniku wzrostu stężenia CO w krwi dopływającej do zatoki żyłnej oka mógł być spowodowany obniżeniem syntezy serotoniny (5-TH) w warunkach hipoksji. Muraoka i współpracownicy

(1998) wykazali spadek syntezy serotoniny w korze czołowej mózgu szczurów po ciągłej siedmiodniowej ekspozycji na tlenek węgla. Autorzy zaproponowali, że spadek poziomu 5-HT wynikał z zaburzeń na etapie hydroksylacji tryptofanu, kluczowego, wymagającego tlenu etapu syntezy 5-HT. Obniżenie syntezy 5-HT w warunkach hipoksji nie tłumaczy jednak wzrostu amplitudy melatoniny w osoczu krwi obwodowej podczas letniej nocy w trakcie infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznego osocza o podniesionej zawartości CO. Wzrost nocnej amplitudy melatoniny został wykazany przez Takasu i współpracowników (Takasu i wsp., 2006) u mężczyzn (20-29 letnich), którzy przez siedem dni byli poddawani cyklicznej ekspozycji na dzienne jasne światło (5000 lux). Autorzy tego doświadczenia wnioskują, że jasne światło, poprzez szlak siatkówkowo-podwzgórzowy i jądro nadskrzyżowaniowe powoduje przedłużoną stymulację nerwów sympatycznych i aktywację receptorów β -adrenergicznych komórek szyszynki zwiększając poziom nocnej sekrecji melatoniny.

W grupie eksperymentalnej zwierząt, którym w okresie długich dni świetlnych do zatoki żyłnej oka infundowano autologiczną krew o zwiększonej w wyniku naświetlania światłem LED zawartości CO, nie obserwowano zmian w profilu sekrecji melatoniny w odniesieniu do grupy kontrolnej (Wykres 7C). Osiągnięty w wyniku naświetlania światłem LED poziom CO w infundowanej krwi był jednak znacznie niższy niż w przypadku osocza suplementowanego gazowym CO infundowanego w tym samym okresie analogicznej grupie zwierząt (Wykres 7AC; Tabela 3). Zimą infuzja do zatoki żyłnej oka naświetlanej krwi spowodowała skrócenie o około dwie godziny okresu podniesionej nocnej amplitudy wydzielania melatoniny (Wykres 7D). Naświetlanie krwi *ex vivo* mogło również spowodować inne zmiany w krwi poza zwiększeniem produkcji tlenu węgla.

Regulacja syntezy melatoniny przez CO może odbywać się za pośrednictwem wewnątrzkomórkowego cGMP. Podobnie jak tlenek azotu, CO może aktywować cyklazę guanylową (Cao i wsp., 2000; Furchgott i Jothianandan, 1991; Brune i Ullrich, 1987; Kharitonov i wsp., 1995). U wszystkich gatunków ssaków, produkcja melatoniny jest regulowana przez norepinefrynę uwalnianą z nerwów sympatycznych podczas nocy (Drijfhout i wsp., 1996). Norepinefryna łącząc się z receptorami β -adrenergicznymi na pinealocytach, indukuje wzrost generacji cAMP w szyszynce i późniejszą aktywację

zależnej od cAMP kinazy białkowej A (Klein, 1985; Chik i Ho, 1989). Stymulacja kinazy białkowej A jest kluczowa dla transkrypcji i aktywacji AANAT, kluczowego enzymu katalizującego istotny etap syntezy melatoniny (Klein i Moore, 1979; Coon i wsp., 1995). Fosforylacja AANAT przez kinazę białkową A chroni ten enzym przed degradacją przez interakcję ufosforylowanego AANAT z białkiem regulacyjnym 14-3-3. Interakcja szlaków sygnalizacyjnych cAMP oraz aGMP może zatem modulować aktywność AANAT (Iuvone i wsp., 2005). W niniejszym doświadczeniu nie mierzono aktywności syntazy tlenu azotu (ang. *nitric oxide synthase*; NOS) ani produkcji NO, jednak można przypuszczać, że tlenek azotu poprzez regulację syntezy cGMP mógł mieć istotny udział w regulacji sekrecji melatoniny; w badaniach *in vitro* wykazano, że NO jest głównym regulatorem syntezy cGMP, natomiast CO wydaje się modulować system sygnalizacyjny NO-cGMP (Ingi i wsp., 1996; Ingi i Ronnett, 1995; Verma i wsp., 1993). Systemy sygnalizacyjne związane z HO i NOS intensywnie oddziałują między sobą. Jony żelaza powstające w reakcji katalizowanej przez HO regulują syntezę NO (Weiss i wsp., 1994); CO może hamować (Turcanu i wsp., 1998; White i Marletta, 1992) lub podnosić (Utz i Ullrich, 1991) poziom NO w sposób bezpośredni lub przy udziale cGMP.

3. Wpływy infuzji do zatoki ocznej autologicznego osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla lub autologicznej krwi naświetlanej światłem LED na poziom ekspresji genów *GnRH*, *GnRH-R*, *Lhb*, *Fshb* i α

Zarówno w okresie krótkich jak i długich dni świetlnych wzrost zawartości tlenu węgla w krwi dopływającej do zatoki żyłnej oka wpłynął na zmiany w poziomie ekspresji genu *GnRH* w analizowanych obszarach podwzgórza (Wykres 9; Wykres 10). W każdej grupie eksperymentalnej w części brzuszno-przyśrodkowej podwzgórza nastąpił wzrost poziomu *GnRH mRNA* w odniesieniu do kontroli. W części przedwzrostkowej podwzgórza w zależności od długości dnia świetlnego obserwowano przeciwny wpływ zwiększonego stężenia CO w zatoce żyłnej oka na ekspresję genu gonadoliberyny. Zimą w obu grupach eksperymentalnych (CO, LED) nastąpił wzrost zawartości *GnRH mRNA* w porównaniu do kontroli. Latem infuzji do żyły kątowej oka autologicznej krwi naświetlanej światłem LED towarzyszył spadek ekspresji genu *GnRH* w POA.

W przedniej części podwzgórza ekspresja genu gonadoliberyny uległa zmianie tylko w okresie krótkich dni świetlnych; w wyniku infuzji do żyły kątowej oka autologicznej krwi naświetlanej światłem LED nastąpił wzrost poziomu *GnRH mRNA*.

Równocześnie obserwowano zmiany w poziomie ekspresji genu receptora *GnRH*. W okresie krótkich dni świetlnych w przedniej części przysadki mózgowej nastąpił istotny spadek w odniesieniu do kontroli ekspresji genu *GnRH-R* towarzyszący infuzji do zatoki żylnej oka zarówno autologicznego osocza o podniesionej zawartości CO jak również autologicznej krwi naświetlanej światłem LED (Wykres 12). Latem w przedniej części przysadki mózgowej po doświadczalnym zwiększeniu stężenia CO w krwi dopływającej do zatoki żylnej oka (CO, LED) nastąpił wzrost poziomu *GnRH-R mRNA* (Wykres 11). W analizowanych obszarach podwzgórza istotne zmiany w poziomie ekspresji genu receptora *GnRH* miały miejsce jedynie w części przedwzrokowej i były związane z infuzją do zatoki żylnej oka autologicznego osocza o podniesionej zawartości CO podczas zimy (Wykres 12).

W dostępnej literaturze można znaleźć prace, w których wykazano stymulujący wpływ tlenu węgla na regulację neurosekrecyjnej aktywności neuronów *GnRH* (Errico i wsp., 2010; Lamar i wsp., 1996). Lamar i współpracownicy (1996) wykazali, że hem powoduje wzrost uwalniania *GnRH* ze skrawków MBH szczura w mechanizmie zależnym od oksygenazy hemowej; stymulujące działanie hemu na sekrecję *GnRH* zostało zniesione przez hemoglobinę, która wychwytuje i wiąże CO (Lamar i wsp., 1996). Na możliwą rolę tlenu węgla w regulacji sekrecji gonadotropin wskazują również badania Errico i współpracowników (2010). Wyniki ich pracy podkreślają przeciwstawne działanie CO w regulacji osi reprodukcyjnej (HPG) i osi stresu (ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*; HPA). W badaniach *in vitro* z wykorzystaniem immortalizowanych neuronów *GnRH* (GT1-7) tlenek węgla był pozytywnym regulatorem sekrecji *GnRH* wpływając jednocześnie na spadek wydzielania kortykoliberyny (ang. *corticotrophin-releasing hormone*; CRH) (Errico i wsp., 2010). Rola tlenu węgla w regulacji tych dwóch neuroendokrynnych systemów wydaje się być spójna: zapobiega nadmiernej aktywacji osi HPG stymulując jednocześnie procesy reprodukcyjne (Mancuso i wsp., 2010). Mechanizm działania tlenu węgla w modulacji sekrecji *GnRH* nie jest wyjaśniony. Przypuszcza się,

że udział CO w tej regulacji jest związany z powinowactwem do cykazy guanylowej prowadzącym do zwiększenia produkcji cGMP (Dawson i Snyder, 1994; Maines, 1988).

W dostępnej literaturze brak jest danych dotyczących wpływu CO na ekspresję genu *GnRH*. Belsham i współpracownicy w badaniach na komórkach GT1-7 wykazali, że NO jest odpowiedzialny za obniżenie ekspresji *GnRH* w mechanizmie zależnym od cGMP (Belsham i wsp., 1996). Zasugerowali oni, że cGMP aktywuje cGMP-zależną kinazę białkową która powoduje wzrost fosforylacji czynnika transkrypcyjnego Oct-1 (ang. *octamer-binding transcription factor-1*) pełniącego kluczową rolę w regulacji ekspresji genu *GnRH* (Clark i Mellon, 1995). Fosforylacja Oct-1 hamuje wiązanie czynnika Oct-1 w obszarze promotora bliższego (Segil i wsp., 1991) powodując obniżenie ekspresji genu *GnRH* (Belsham i Mellon, 2000). Tlenek węgla posiada podobne właściwości chemiczne i biologiczne jak tlenek azotu i podobnie jak on jest aktywatorem cykazy guanylowej. W odróżnieniu jednak od NO, tlenek węgla jest bardziej stabilny chemicznie i indukowany nim wzrost poziomu cGMP trwa dłużej (Zhuo i wsp., 1993). Można zatem przypuszczać, że udział CO w regulacji ekspresji genu gonadoliberyny może odbywać się w podobny sposób. Fosforylacja czynnika transkrypcyjnego Oct-1 w wyniku wzrostu indukowanego przez CO stężenia cGMP może tłumaczyć spadek poziomu *GnRH mRNA* w części przedwzrokowej podwzgórza latem, u zwierząt którym do zatoki żyłnej oka infundowano autologiczną krew o podniesionej w wyniku naświetlania światłem LED zawartości tlenu węgla. Nie wyjaśnia jednak wzrostu ekspresji genu *GnRH* w części brzuszno-przyśrodkowej podwzgórza latem oraz wzrostu ekspresji *GnRH* we wszystkich analizowanych obszarach podwzgórza zimą.

U zwierząt rozmnażających się sezonowo roczny cykl reprodukcyjny jest regulowany przez modulowane fotoperiodem zmiany w aktywności kilku systemów neuroendokrynnych kontrolujących sekrecję GnRH z podwzgórza (Jansen i wsp., 2003; Lincoln, 2002). Zakodowany w zmiennym profilu uwalniania melatoniny sygnał o długości dnia reguluje amplitudę i częstotliwość pulsów GnRH (Malpaux i wsp., 1995) na drodze dopaminergicznej (Adams i wsp., 2006; Goodman i Inskeep, 2006; Tortonese, 1999; Tortonese i Lincoln, 1994), noradrenergicznej (Goodman, 1996; Goodman i wsp., 1995; Tomaszewska-Zaremba i Przekop, 2005), serotoninericznej (Le Corre i Chemineau,

1993), opioidergicznej (Curlevis i wsp., 1991; Tortonese, 1999) i GABA-ergicznej (Scott i Clarke, 1993; Tomaszewska-Zaremba i Przekop, 2005). System dopaminergiczny pełni dominującą rolę w supresji uwalniania GnRH w okresie ciszy rozrodczej (okres długiego dnia świetlnego) ale nie w sezonie rozrodczym (okres krótkiego dnia świetlnego) (Adams i wsp., 2006; Bertrand i wsp., 1999; Goodman i Inskeep, 2006; Tortonese, 1999). Farmakologiczna blokada systemu dopaminergicznego (Curlevis i wsp., 1991; Havern i wsp., 1991; Tortonese i Lincoln, 1994) jak również chirurgiczne (Pau i wsp., 1982; Przekop, 1978) lub chemiczne (Thiery i wsp., 1989) uszkodzenie połączeń między ME a POA podwzgórza skutkowało znacznym wzrostem sekrecji GnRH/gonadotropin u zwierząt w okresie sezonowego anestrus (w okresie długich dni świetlnych). Jednocześnie podanie w okresie rozrodczym dopaminergicznego agonisty hamowało uwalnianie gonadotropin (Tortonese, 1999; Tortonese i Lincoln, 1994). Inhibicja uwalniania dopaminy przez melatoninę została wykazana w podwzgórzu ssaków (Zisapel i wsp., 1982). W badaniach na owcach wykazano, że szlaki dopaminergiczne uczestniczą w mechanizmie w którym melatonina pośredniczy w wpływie fotoperiodu na funkcje reprodukcyjne (Tortonese i Lincoln, 1995). Spadek ekspresji genów receptora GnRH i podjednostek gonadotropin w wyniku infuzji autologicznego osocza lub krwi o podniesionej zawartości tlenu węgla w okresie zimy, oraz wzrost ekspresji tych genów w wyniku takiej samej procedury eksperymentalnej latem nasuwa przypuszczenie, że w mechanizmie działania CO może uczestniczyć układ dopaminergiczny. Jednocześnie Taskiran i współpracownicy (2003), wykazali, że tlenek węgla może hamować wychwyt zwrotny dopaminy w mózgu szczura w sposób zależny od czasu, dawki i temperatury a niezależny od aktywności NOS, co sugeruje, że CO może działać jako modulator transmisji synaptycznej (Taskiran i wsp., 2003).

Synteza białka receptorowego GnRH (GnRH-R) jest kluczowym aspektem regulacji funkcji reprodukcyjnych. Mechanizmem regulującym ekspresję receptora są zmiany w poziomie *GnRH-R mRNA*. Jednym z czynników regulujących ekspresję receptora GnRH a jest sam GnRH (Cheng i Leung, 2000; White i wsp., 1999;). Krótkotrwała stymulacja prowadzi do wzrostu ekspresji receptora, podczas gdy ciągła ekspozycja na hormon powoduje spadek ekspresji receptora GnRH w przednim płacie przysadki mózgowej (Norwitz i wsp., 1999). Na podstawie otrzymanych wyników w niniejszej pracy można

wnioskować, że spadek ekspresji genu *GnRH-R* w przednim płacie przysadki mózgowej zimą w wyniku infuzji autologicznej krwi lub osocza o podniesionej zawartości CO oraz wzrost ekspresji genu *GnRH-R* latem w wyniku tych samych procedur doświadczalnych był przypuszczalnie związany ze zmianą w amplitudzie i częstotliwości pulsów GnRH.

Przeciwnie działanie tlenu węgla w regulacji osi HPG i HPA (Errico i wsp., 2010) oraz wykazany w tej pracy modulujący wpływ zwiększonego stężenia CO w krwi lub osoczu infundowanym do żyły kątowej oka na poziom *GnRH* i *GnRH-R mRNA* może wskazywać na udział systemów noradrenergicznych, dopaminergicznych, GABA-ergicznych czy kortykoliberynergicznych w transkrypcyjnej aktywności tych genów (Kim i wsp., 1993, 1994; Kang i wsp., 1995; Seong i wsp., 1995). Do całkowitego wyjaśnienia mechanizmu działania tlenu węgla w regulacji ekspresji genów *GnRH* i *GnRH-R* potrzebne są dalsze badania, aby precyzyjnie ocenić funkcjonalne połączenie między *GnRH-R mRNA* i *GnRH mRNA* a biosyntezą GnRH i jego białkiem receptorowym.

W wyniku infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznej krwi lub osocza o podniesionej zawartości tlenu węgla zmiana uległ poziom ekspresji genów podjednostek gonadotropin LH i FSH w przednim płacie przysadki mózgowej. W okresie długich dni świetlnych poziom ekspresji genu *Lhβ* istotnie wzrósł w odniesieniu do kontroli (zarówno w grupie CO jak i LED) (Wykres 13A). Jednocześnie obserwowano wzrost poziomu LH w krążeniu ogólnym (Wykres 17A). Zimą zwiększenie stężenia CO w zatoce żyłnej oka nie wpłynęło na zawartość *Lhβ mRNA* w przednim płacie przysadki mózgowej (Wykres 13B), zmianie uległ natomiast poziom lutropiny w osoczu krwi krążenia obwodowego który istotnie się obniżył (zarówno w grupie CO jak i LED) (Wykres 17B).

W okresie długich dni świetlnych nie wykazano wpływu infuzji autologicznego osocza lub krwi o podniesionej zawartości CO na poziom ekspresji genu *Fshβ* (Wykres 14A). Brak było również istotnych zmian w poziomie FSH w krążeniu ogólnym (Wykres 19).

Zimą w wyniku infuzji do zatoki żyłnej oka autologicznego osocza o podniesionej zawartości CO poziom *Fshβ mRNA* obniżył się (Wykres 14B). Niewykrywalny zastosowaną tutaj metodą (RIA) FSH w osoczu krwi obwodowej może wskazywać na znaczny spadek poziomu tego hormonu.

Poziom ekspresji wspólnej podjednostki α istotnie wzrósł latem w wyniku infuzji zarówno autologicznego osocza jak i krwi o podniesionym stężeniu CO, oraz obniżył się zimą wskutek analogicznych procedur doświadczalnych (Wykres 15).

Synteza i uwalnianie gonadotropin LH i FSH, jest kontrolowane przez złożone oddziaływania wielu czynników, z których najbardziej istotnym jest GnRH. Frekwencja i amplituda pulsów GnRH jest głównym determinantem różnicowej regulacji poziomu α , *Lh β* i *Fsh β mRNA* oraz sekrecji gonadotropin z przysadki mózgowej (Belchetz i wsp., 1978; Hamernik i Nett 1988; Weiss i wsp., 1990; Wierman i wsp., 1989; Papavasiliou i wsp., 1986; Leung i wsp., 1987; Haisenleder i wsp., 1990; Dalkin i wsp., 1989; Shupnik, 1990; Haisenleder i wsp., 1991). Zmienność odpowiedzi na GnRH wydaje się korelować ze stężeniem receptora GnRH (GnRH-R) na powierzchni komórek gonadotropowych (Loumaye i Catt, 1982). Ekspresja genu receptora GnRH oraz podjednostki *Lh β* jest stymulowana w tej samej częstotliwości pulsów GnRH, co oznacza że ekspresja *Lh β* jest stymulowana kiedy stężenie GnRH-R na powierzchni gonadotropów jest relatywnie wysokie (Kaiser i wsp., 1997).

Można przypuszczać że wpływ zwiększonego stężenia CO w zatoce żyłnej oka na poziom ekspresji genów podjednostek gonadotropin oraz na poziom tych hormonów w krążeniu ogólnym jest bezpośrednio związany ze zmianami we wzorze uwalniania GnRH z zakończeń nerwowych jak również aktywnością receptora GnRH w części gruczołowej przysadki mózgowej. Zatem tlenek węgla, którego synteza zwiększa się w obszarze oka czasie długich dni świetlnych, drogą przeciwpłądowego przenikania w obszarze zatoki jamistej z pominięciem krążenia ogólnego może bezpośrednio docierać do struktur mózgowych i wpływać na regulacje fizjologiczne u samców związane z rozrodem.

VI PODSUMOWANIE

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy można podsumować następująco:

- U mieszańców świni domowej i dzika funkcjonuje w obszarze splotu okołoprzysadkowego mechanizm przeciwprądowego przenikania i docelowego transportu tlenu węgla bezpośrednio do struktur mózgowych z pominięciem krążenia ogólnego. Efektem sezonowej zmienności poziomu tlenu węgla w obszarze mózgu jest zmienność ekspresji genów włączonych w regulację rozrodu w warunkach zmieniającej się długości dnia świetlnego (zima, lato);
- Doświadczalne zwiększenie stężenia CO we krwi żyłnej odpływającej z oka do żyłnej zatoki jamistej okołoprzysadkowego kompleksu naczyniowego, zwiększyło stężenie CO w obszarze mózgu, spowodowało w okresie krótkich i długich dni świetlnych zmiany w poziomie ekspresji genów osi podwzgórzowo-przysadkowej (*GnRH*, *GnRH-R*, α , *Lh β* , *Fsh β*) samców krzyżówek świni domowej i dzika oraz zmieniło poziom LH w krążeniu ogólnym oraz profil sekrecji melatoniny;

VII WNIOSEK

Tlenek węgla wytwarzany pod wpływem światła w oku dociera drogą przeciwpłądowego przenikania w obszarze splotu okołoprzysadkowego z naczyń żylnych do tętniczych zaopatrujących bezpośrednio mózg. CO zmienia profil sekrecji melatoniny oraz wpływa na ekspresję genów osi podwzgórzowo-przysadkowej (*GnRH* *GnRH-R* oraz genów podjednostek gonadotropin *LH* i *FSH*) a w konsekwencji na sekrecję hormonów regulujących procesy rozrodcze u samców krzyżówki świni domowej i dzika.

VIII PIŚMIENNICTWO

1. Adams BM, Sakurai H, Adams TE. Concentrations of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor messenger ribonucleic acid in pituitary tissue of orchidectomized sheep: effect of estradiol and GnRH. *Biol Reprod* 1996 Feb; 54(2):407-12.
2. Adams VL, Goodman RL, Salm AK, Coolen LM, Karsch FJ, Lehman MN. Morphological plasticity in the neural circuitry responsible for seasonal breeding in the ewe. *Endocrinology* 2006; 147: 4843-4851.
3. Airola M, Du J, Dawson JH, Crane BR. Heme binding to the mammalian circadian clock protein Period 2 is non-specific. *Biochemistry* 2010; 49:4327-4338
4. Alexandrescu IC, Lawson DM. Heme oxygenase in the rat anterior pituitary: immunohistochemical localization and possible role in gonadotropin and prolactin secretion. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003 Jan;228(1):64-9.
5. Apter D. Development of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 816: 9-21
6. Arendt, J. (Ed.), 1995. *Melatonin and the Mammalian Pineal Gland*. Chapman and Hall, London.
7. Baba Y, Matsuo H and Schally A. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 44:459-463.
8. Barassin S, Saboureaux M, Kalsbeek A, Bothorel B, Vivien-Roels B, Malan A, et al.: Interindividual differences in the pattern of melatonin secretion of the Wistar rat. *J Pineal Res* 1999; 27:193-201.
9. Bauer AC, Weiss J, Jameson JL. Role of estrogen, progesterone and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the control of pituitary receptor gene expression at the time of the preovulatory gonadotropin surges. *Endocrinology* 1995; 136: 1014-1019.
10. Becker-Weimann S, Wolf J, Hanspeter H, Kramer A. Modeling feedback loops of the mammalian circadian oscillator. *Biophysical Journal* 2004; 87:3023-3034

11. Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 1978; 202, 631–633.
12. Belsham DD, Mellon PL. Transcription factors Oct-1 and C/EBPbeta (CCAAT/enhancer-binding protein-beta) are involved in the glutamate/nitric oxide/cyclic-guanosine 5'-monophosphate-mediated repression of mediated repression of gonadotropin-releasing hormone gene expression. *Mol Endocrinol* 2000 Feb;14(2):212-28
13. Belsham DD, Wetsel WC, Mellon PL. NMDA and nitric oxide act through the cGMP signal transduction pathway to repress hypothalamic gonadotropin-releasing hormone gene expression. *EMBO J* 1996 Feb 1;15(3):538-47
14. Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 2002; 295: 1070.1073.
15. Berson DM. Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci* 2003 Jun;26(6):314-20. Review
16. Bertrand F, Viguié C, Picard S, Malpoux B. Median eminence dopaminergic activation is critical for the early long-day inhibition of luteinizing hormone secretion in the ewe. *Endocrinology* 1998 Dec;139(12):5094-102.
17. Bertrand F, Thiery JC, Picard S, Malpoux B. Implication of DA2-like dopaminergic receptors in the median eminence during the establishment of long-day of LH secretion in the ewe. *Journal of Endocrinology* 1999; 163 243-254.
18. Bhat GK, Mahesh VB, Lamar CA, Ping L, Aguan K, Brann DW. Histochemical localization of nitric oxide neurons in the hypothalamus: association with gonadotropin-releasing hormone neurons and co-localization with N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroendocrinology* 1995 Aug;62(2):187-97
19. Brainard GC, Hanifin JP. Photons, clocks, and consciousness. *J Biol Rhythms* 2005; 20: 314.325.
20. Brann DW, Bhat GK, Lamar CA, Mahesh VB. Gaseous transmitters and neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 1997 Jun;65(6):385-95. Review.
21. Bronson FH 1990 Mammalian reproductive biology. Chicago: University of Chicago Press

22. Brooks J, McNeilly AS. Regulation of gonadotrophin-releasing hormone receptor mRNA expression in the sheep. *J Endocrinol* 1994 Oct;143(1):175-82.
23. Brown DI, Garyfallou VT, Urbanski HF. Photoperiodic modulation of GnRH mRNA in the male Syrian hamster. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001 Apr 18;89(1-2):119-25.
24. Bruce HM and Hindle E. The golden hamster, *Cricetus (mesocricetus) auratus* Waterhouse. Notes on its breeding and growth. *Proc Zool Soc Lond* 1934; vol. 104, pp. 361-366
25. Brüne B, Ullrich V. Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharmacol* 1987; 32(4):497-504.
26. Burger LL, Haisenleder DJ, Dalkin AC, Marshall JC. Regulation of gonadotropin subunit gene transcription. *J Mol Endocrinol* 2004; 33, 559–584.
27. Caldani M, Antoine M, Batailler M, Duittoz A. Ontogeny of GnRH systems. *J Reprod Fertil Suppl* 1995;49:147-62
28. Cao L, Blute TA, Eldred WD. Localization of heme oxygenase-2 and modulation of cGMP levels by carbon monoxide and/or nitric oxide in the retina. *Vis Neurosci* 2000; 17:319–329.
29. Chegini N, Ma C, Tang XM, Williams RS. Effects of GnRH analogues, 'add-back' steroid therapy, antiestrogen and antiprogesterons on leiomyoma and myometrial smooth muscle cell growth and transforming growth factor- β expression. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:1071-1078
30. Chen A, Ganor Y, Rahimpour S, Ben-Aroya N, Koch Y, Levite M. The neuropeptides GnRH-II and GnRH-I are produced by human T cells and trigger laminin receptor gene expression, adhesion, chemotaxis and homing to specific organs. *Nat Med* 2002; 8:1421-1426.
31. Cheng KW, Ngan ESW, Kang SK, Chow BKC, Leung PCK. Transcriptional downregulation of human gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene by GnRH; role of protein kinase C and activating protein 1. *Endocrinology* 2000; 141 3611-3622
32. Cheng CK, Leung PCK. Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-1, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocrine Reviews* 2005; 26 283-306.

33. Chik CL and Ho AK. Multiple receptor regulation of cyclic nucleotides in rat pinealocytes. *Prog Biophys Mol Biol* 1989; 53: 197-203.
34. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1):156-9.
35. Chou CS, MacCalman CD, Leung PC. Differential effects of gonadotropin-releasing hormone I and II on the urokinase-type plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor system in human decidual stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:3806-3815.
36. Chou CS, Tai CJ, MacCalman CD, Leung PC. Dose-dependent effects of gonadotropin-releasing hormone on matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 and tissue specific inhibitor of metalloproteinases-1 messenger ribonucleic acid levels in human decidual stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:680-688.
37. Ciechanowska M, Lapot M, Mateusiak K, Przekop F. Neuroendocrine regulation of GnRH release and expression of GnRH and GnRH receptor genes in the hypothalamus-pituitary unit in different physiological states. *Reprod Biol* 2010 Jul; 10(2):85-124. Review.
38. Clark ME, Mellon PL. The POU homeodomain transcription factor Oct-1 is essential for activity of the gonadotropin-releasing hormone neuron-specific enhancer. *Mol Cell Biol* 1995 Nov; 15(11):6169-77.
39. Clarke I, Cummins J and de Kretser D. Pituitary gland functions after disconnection from direct hypothalamic influences in the sheep. *Neuroendocrinol* 1983; 36:376-384.
40. Clayton R and Catt K. Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. *Endo Rev* 1981; 2:186-209.
41. Cone RP, Low MJ, Elmquist JK, Cameron JL. Neuroendocrinology. In: PR Larsen, HM Kronenberg, S Melmed, KS Polonsky, (eds.) *Williams Textbook of Endocrinology*, 10th ed Philadelphia: Saunders 2003; 81-176

42. Conn P and Crowley W. Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annu Rev Med* 1994; 45:391-405.
43. Coon SL, Roseboom PH, Baler R, Weller JL, Namboodiri MA, Koonin EV and Kelen DC. Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science* 1995; 270:1681-1683.
44. Curlevis JD, Naylor AM, Mac Neilly AS. Evaluation of a possible role for dopamine D1 and D2 receptors in the steroid-dependent suppression of luteinizing hormone secretion in the seasonally anestrus ewes. *Neuroendocrinology* 1991; 3 387-391.
45. Curlevis JD, Naylor AM, Rhind SM, McNeilly AS. Effect of beta-endorphin on pulsatile luteinizing hormone and prolactin secretion during follicular phase in the ewe. *Journal of Neuroendocrinology* 1991; 3 123-126.
46. Dacey DM, Liao H-S, Peterson B, Robinson FR, Smith VC, Pokorny J, Yau K-W, Gamlin PD. Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature* 2005; 433: 749-754.
47. Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Ellis TR, Marshall JC. The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 1989; 125, 917-924
48. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Sep 16;100(19):10972-6.
49. Dioum ER, Rutter J, Tuckerman JR, Gonzales G, Gilles-Gonzales MA, Knight SL. NPAS2: a gas-responsive transcription factor. *Science* 2002; 298:2385-2387.
50. Drijfhout WJ, Grol CJ, Westerink BH. Parasympathetic inhibition of pineal indole metabolism by prejunctional modulation of noradrenaline release. *Eur J Pharmacol* 1996; 18;308(2):117-24.
51. Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 1999 Jan 22;96(2):271-90. Review.
52. Emons G, Muller V, Ortmann O, Schulz KD. Effects of LHRH-analogues on mitogenic signal transduction in cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; 65:199 –206

53. Errico S, Shohreh R, Barone E, Pusateri A, Mores N, Mancuso C. Heme oxygenase-derived carbon monoxide modulates gonadotropin-releasing hormone release in immortalized hypothalamic neurons. *Neurosci Lett* 2010 Mar 8;471(3):175-8.
54. Fain GL, Matthews HR, Cornwall MC, Koutalos Y. Adaptation in vertebrate photoreceptors. *Physiol Rev* 2001; 81: 117.151.
55. Ferris HA, Shupnik MA. Mechanisms for pulsatile regulation of the gonadotropin subunit genes by GNRH1. *Biol Reprod* 2006; 74, 993–998.
56. Fink G. (1988) Gonadotropin secretion and its control. In: Knobil E, Neill J, eds. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press; 1349–1377
57. Foster RG. Keeping an eye on the time. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 1286.1298.
58. Foster RG. Bright blue times. *Nature* 2005; 433: 698.699.
59. Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, Von Schantz M, Muñoz M, David-Gray Z, Foster RG. Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 1999; 284: 502.504.
60. Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, Yang S, Monsma FJ, Gustafson EL. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 Dec 26; 312(4):1357-63.
61. Furchgott RF and Jothianandan D. Endothelium-dependent and independent vasodilation involving cyclic GMP: Relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels* 1991; 28:52–61.
62. Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS and Weitz CJ. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 1998; 280:1564-1569.
63. Gerlach T, Aurich JE. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Anim Reprod Sci* 2000 Mar 15;58(3-4):197-213. Review.
64. Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev* 1990 Feb;11(1):177-99. Review.
65. Gibbons SJ, Farrugia G. The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. *J Physiol* 2004 Apr 15;556(Pt 2):325-36.

66. Gilles-Gonzalez MA and Gonzalez G. Signal transduction by heme-containing PAS-domain proteins. *Journal of Applied Physiology* 2004; 96:774-783
67. Gilun P, Stefanczyk-Krzymowska S, Romerowicz-Misielak M, Tabecka-Lonczynska A, Przekop F, Koziorowski M. Carbon monoxide-mediated humoral pathway for the transmission of light signal to the hypothalamus. *Physiol Pharmacol* 2013 Dec;64(6):761-72.
68. Goodman RL, Inskeep EK. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of sheep. In: Neill JD ed. *Knobil and Neill's Physiology and Reproduction* 3rd ed Amsterdam: Elsevier 2006; vol 2 2389-2447.
69. Goodman RL, Robinson JE, Kendrick KM, Dyer RG. Is the inhibitory action of estradiol on luteinizing hormone pulse frequency in anestrus ewes mediated by noradrenergic neurons in the preoptic area? *Neuroendocrinology* 1995; 61 284-292.
70. Goodman RL, Jansen HT, Billings HJ, Coolen LM, Lehman MN. Neural systems mediating seasonal breeding in the ewe. *J Neuroendocrinol.* 2010 Jul;22(7):674-81.
71. Goodman RL. Neural systems mediating the negative feedback actions of estradiol and progesterone in the ewe. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 1996; 56 727-741.
72. Gooley JJ, Lu J, Fischer D, Saper CB. A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception. *J Neurosci* 2003; 23: 7093-7106.
73. Green CB and Menaker M. 2003. Clocks on the brain. *Science.* 301:319-320.
74. Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. The preparation of ¹³¹I-labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *The Biochemical Journal* 1963; 89:114-123
75. Griffin EA, Staknis D Jr and Weitz CJ. Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science* 1999; 286:768–771.
76. Grosse J, Maywood ES, Ebling FJ, Hastings MH. Testicular regression in pinealectomized Syrian hamsters following infusions of melatonin delivered on non-circadian schedules. *Biol Reprod* 1993 Oct;49(4):666-74.
77. Grzegorzewski W, Skipor J, Wąsowska B, Krzymowski T. Counter current transfer of oxytocin from the venous blood of the perihypophyseal cavernous sinus to the arterial blood of carotid rete supplying the hypophysis and brain depends on the phase of the estrous cycle in pig. *Biol Reprod* 1995; 52,139-144

78. Grzegorzewski WJ, Skipor J, Wąsowska B, Krzymowski T. Countercurrent transfer of 125I-LHRH in the perihypophyseal cavernous sinus-carotid rete vascular complex, demonstrated on isolated pig heads perfused with autologous blood. *Domestic Animal Endocrinology* 1997; 14 :149-160
79. Hafez ES. Sexual season of the ewe and daylight environment. *Nature* 1950 Nov 11;166(4228):822-3.
80. Haisenleder DJ, Ortolano GA, Dalkin AC, Ellis TR, Paul SJ, Marshall JC. Differential regulation of gonadotropin subunit gene expression by gonadotropin-releasing hormone pulse amplitude in female rats. *Endocrinology* 1990 Dec;127(6):2869-75.
81. Haisenleder DJ, Dalkin AC, Ortolano GA, Marshall JC, Shupnik MA. A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. *Endocrinology* 1991; 128, 509–517.
82. Haisenleder DJ, Yasin M, Marshall JC. Gonadotropin subunit and gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression are regulated by alterations in the frequency of calcium pulsatile signals. *Endocrinology* 1997 Dec;138(12):5227-30.
83. Hall JC. Cryptochromes: sensory reception, transduction, and clock functions subserving circadian systems. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10: 456-466.
84. Hamernik D, and Nett T. Gonadotropin-releasing hormone increases the amount of messenger ribonucleic acid for gonadotropins in ovariectomized ewes after hypothalamic-pituitary disconnection. *Endocrinology* 1988; 122:959-966
85. Hannibal J, Hindersson P, Knudsen SM, Georg B, and Fahrenkrug J. The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *The Journal of Neuroscience* 2002; 22:RC191(1–7).
86. Hannibal J, Hindersson P, Knudsen SM, Georg B, Fahrenkrug J. The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Neurosci* 2002; 22: RC191 (1.7).

87. Hannibal J, Hindersson P, Østergaard JM, Georg B, Heegaard S, Larsen PJ, Fahrenkrug J. Melanopsin is expressed in PACAP-containing retinal ganglion cells of the human retinohypothalamic tract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 4202-4209.
88. Hattar S, Liao H-W, Takao M, Berson DM, Yau K-W. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 2002; 295: 1065-1070.
89. Havern RL, Whisnant CS and Goodman RL. Dopaminergic structures in the ovine hypothalamus mediating estradiol negative feed-back in anestrus ewes. *Endocrinology* 1994; 134 1905–1914.
90. Havern RL, Whisnant CS, Goodman RL. Hypothalamic sites of catecholamine inhibition of luteinizing hormone in the anestrus ewe. *Biol Reprod* 1991 Mar;44(3):476-82.
91. Herbison AE, Simonian SX, Norris PJ, Emson PC. Relationship of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity to GnRH neurons in the ovariectomized and intact female rat. *J Neuroendocrinol* 1996 Jan;8(1):73-82
92. Herbison AE. 2005 Physiology of the GnRH neuronal networks. In: Knobil E, Neill JD, eds. *Physiology of reproduction*. 3rd ed. San Diego: Elsevier; 1415–1482
93. Hermann R, Poppe L, Pilbak S, Boden S, Maurer J, Weber S, Lerchl A. Predicted 3D structure of melanopsin, the non-rod, non-cone photopigment of the mammalian circadian clock, from Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Neurosci Lett* 2005; 376: 76-80.
94. Hogenesch JB, GuYZ, Jain S, Bradfield CA. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 May 12; 95(10):5474-9.
95. Ingi T, Ronnett GV. Direct demonstration of a physiological role for carbon monoxide in olfactory receptor neurons. *J Neurosci* 1995; 15(12):8214-22.
96. Ingi T, Cheng J, Ronnett GV. Carbon monoxide: an endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system. *Neuron* 1996; 16(4):835-42.

97. Islami D, Chardonnens D, Campana A, Bischof P. Comparison of the effects of GnRH-I and GnRH-II on HCG synthesis and secretion by first trimester trophoblast. *Mol Hum Reprod* 2001; 7:3-9.
98. Iuvone PM, Tosini G, Pozdeyev N, Haque R, Klein DC, Chaurasia SS. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog Retin Eye Res* 2005; 24:433-456.
99. Jakubowiak A, Janecki A, Steinberger A. Similar effects of inhibin and cycloheximide on gonadotropin release in superfused pituitary cell cultures. *Biol Reprod* 1989; 41, 454–463.
100. Jansen HT, Cutter C, Hardy S, Lehman MN, Goodman RL. Seasonal plasticity within the gonadotropin-releasing hormone system of the ewe: changes in identified GnRH inputs and glial association. *Endocrinology* 2003; 144 3663-3676.
101. Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS. S-nitrosohemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 1996; 380: 221-226.
102. Kaiser UB, Conn PM, Chin UW. Studies of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action using GnRH receptor expressing pituitary cell lines. *Endocrine Reviews* 1997. 18 46-70.
103. Kalsbeek A, Garidou ML, Palm IF, van der Vliet, Simonneaux V, Pevet P, and Buijs RM. Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *The European Journal of Neuroscience* 2000; 12:3146–3154.
104. Kang SK, Tai CJ, Nathwani PS, Choi KC, Leung PC. Stimulation of mitogen-activated protein kinase by gonadotropin-releasing hormone in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 2001; 142:671-679.
105. Kang SH, Seong JY, Cho S, Cho H, Kim K. Acute increase of GABAergic neurotransmission exerts a stimulatory effect on GnRH gene expression in the preoptic/anterior hypothalamic area of ovariectomized, estrogen- and progesterone-treated adult female rats. *Neuroendocrinology* 1995 May;61(5):486-92
106. Karsch FJ, Bittman EL, Foster DL, Goodman RL, Legan SJ, Robinson JE. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Prog Horm Res* 1984; 40, 185–232.

107. Kawamoto K, Tanaka S, Kawano M, Hayashi T, Tsuchiya K. Effects of photoperiod and ambient temperature on the gonadotropin-releasing hormone neuronal system in the gray hamster, *Tscherskia triton*. *Neuroendocrinology* 2000 Nov;72(5):284-92.
108. Kharitonov VG, Sharma VS, Pilz RB, Magde D, Koesling D. Basis of guanylate cyclase activation by carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Mar 28;92(7):2568-71.
109. Kim K, Lim IS, Cho BN, Kang SS, Lee BJ, Choi KH, Chung CH, Lee CC, Cho WK, Wuttke W. A partial blockade of catecholaminergic neurotransmission with 6-hydroxydopamine decreases mRNA level of gonadotropin releasing hormone in the male rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1993 Jul;58(1):146-52.
110. Kim K, Lee BJ, Cho BN, Kang SS, Choi WS, Park SD, Lee CC, Cho WK, Wuttke W. Blockade of noradrenergic neurotransmission with diethyldithiocarbamic acid decreases the mRNA level of gonadotropin-releasing hormone in the hypothalamus of ovariectomized, steroid-treated prepubertal rats. *Neuroendocrinology* 1994 Jun;59(6):539-44.
111. Kineman RD, Leshin LS, Crim JW, Rampacek GB, Kraeling RR. Localization of luteinizing hormone-releasing hormone in the forebrain of the pig. *Biol Reprod* 1988 Oct;39(3):665-72
112. Kirkpatrick BL, Esquivel E, Moss GE, Hamernik DL, Wise ME. Estradiol and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) interact to increase GnRH receptor expression in ovariectomized ewes after hypothalamic-pituitary disconnection. *Endocrine* 1998 Jun;8(3):225-9
113. Klein DC and Moore RY. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-Omethyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 1979; 174:245-262.
114. Klein DC. Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. *Ciba Found Symp* 1985; 117:38-56.
115. Knobil E. The GnRH pulse generator. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163:1721–1727.
116. Kotwica J, Krzymowski T, Dębek J. Kaniulowanie naczyń żylnych u świń do badań endokrynologicznych. *Medycyna Weterynaryjna* 1978; 34,181-120.

117. Koziorowski M, Stefanczyk-Krzymowska S, Tabecka-Lonczynska A, Gilun P, Kaminski M. Gaseous messenger carbon monoxide is released from the eye into the ophthalmic venous blood depending on the intensity of sunlight. *J Biol Reg Homeostat Agents* 2012; 26:111-118;
118. Kozma F, Johnson RA, Zhang F, Yu C, Tong X, Nasjletti A. Contribution of endogenous carbon monoxide to regulation of diameter in resistance vessels. *The American Journal of Physiology* 1999; 276:R1087-R94.
119. Krzymowski T, Grzegorzewski W, Stefańczyk-Krzymowska S, Skipor J, Wąsowska B. Humoral pathway for transfer of the boar pheromone, androstenol, from the nasal mucosa to the brain and hypophysis of gilts. *Theriogenology* 1999; 52:1225-1240.
120. Krzymowski T, Skipor J, Grzegorzewski W. Cavernosus sinus and carotid rete of sheep and sows as a possible place for countercurrent exchange of some neuropeptides and steroid hormones. *Animal Reproduction Sciences* 1992; 29:225-240.
121. Krzymowski T, Stefańczyk-Krzymowska S, Grzegorzewski W, Skipor J, Wąsowska B. 2001. A possible humoral pathway for the priming action of the male pheromone androstenol on female pigs. In: *Chemical Signals in Vertebrates*, Marchlewska-Koj, Lepri, Muller-Schwarze (eds), Kluwer Academic/Plenum Publisher Corporation, New York, pp. 117-124.
122. Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, and Reppert SM. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 1999; 98:193–205.
123. Kutty RK, Kutty G, Wiggert B, Chader GJ, Darrow RM and Organisciak DT. Induction of heme oxygenase 1 in the retina by intense visible light: Suppression by the antioxidant dimethylthiourea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:1177-1181.
124. Lamar CA, Mahesh VB, Brann DW. Regulation of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) secretion by heme molecules: a regulatory role for carbon monoxide? *Endocrinology* 1996 Feb;137(2):790-3.
125. Łapot M, Ciechanowska M, Malewski T, Mateusiak K, Misztal T, Przekop F. Changes in the GnRH mRNA and GnRH receptor (GnRH-R) mRNA levels in the

- hypothalamic-anterior pituitary unit of anestrus ewes after infusion of GnRH into the third cerebral ventricle. *Reproductive Biology* 2008; 8 149-161.
126. Le Corre S, Chemineau P. Control of photoperiodic inhibition of luteinizing hormone secretion by dopaminergic and serotonergic systems in ovariectomized Ile-de-France ewes supplemented with estradiol. *Journal of Reproduction and Fertility* 1993; 97 367-373.
 127. Lehman MN, Robinson JE, Karsch FJ, Silverman AJ. Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) pathways in the sheep brain during anestrus and the mid-luteal phase of the estrous cycle. *J Comp Neurol* 1986 Feb 1; 244(1):19-35.
 128. Leung K, Kaynard AH, Negrini BP, Kim KE, Maurer RA, Landefeld TD. Differential regulation of gonadotropin subunit messenger ribonucleic acids by gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in ewes. *Mol Endocrinol* 1987 Oct; 1(10):724-8.
 129. Levine JE. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH). In: Hery H, Normona A, eds. *Encyclopedia of hormones*. San Diego: Academic Press 2003; 157–165
 130. Lin X, Conn PM. Transcriptional activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene by GnRH: involvement of multiple signal transduction pathways. *Endocrinology* 1999 Jan;140(1):358-64.
 131. Lincoln GA, Andersson H and Loudon A. Clock genes in calendar cells as the basis of annual timekeeping in mammals – a unifying hypothesis. *Journal of Endocrinology* 2003; 179:1-13.
 132. Lincoln GA. Neuroendocrine regulation of seasonal gonadotrophin and prolactin rhythms: lessons from the Soay ram model. *Reprod Suppl* 2002;59:131-47. Review.
 133. Liu F, Usui I, Evans LG, Austin DA, Mellon PL, Olefsky JM, Webster NJ. Involvement of both $G_{(q/11)}$ and $G_{(s)}$ proteins in gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated signaling in L beta T2 cells. *J Biol Chem* 2002 Aug 30;277(35):32099-108.
 134. Loumaye E, Catt KJ. Homologous regulation of gonadotropin-releasing hormone receptors in cultured pituitary cells. *Science* 1982 Feb 19;215(4535):983-5.

135. Love RJ. Definition of a seasonal infertility problem in pigs. *Vet Rec* 1978 Nov 11;103(20):443-6.
136. Lucas RJ, Foster RG. Neither functional rod photoreceptors nor rod or cone outer segments are required for the photic inhibition of pineal melatonin. *Endocrinol* 1999; 140: 1520.1524.
137. Lucas RJ, Freedman MS, Muñoz M, Garcia-Fernandez J-M, Foster RG. Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 1999; 284: 505.507.
138. Lucas RJ, Hattar S, Takao M, Berson DM, Foster RG, YAU K-W. Diminished papillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science* 2003; 299: 245.247.
139. Lukat-Rodgers GS, Correia C, Botuyan MV, Mer G, Rodgers KR. Heme-based sensing by the mammalian circadian protein CLOCK. *Inorg Chem* 2010 Jul 19;49(14):6349-65.
140. Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 1988 Jul;2(10):2557-68. Review
141. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517-54. Review.
142. Malpaux B, Robinson JE, Wayne NL, Karsch FJ. Regulation of the onset of the breeding season of the ewe importance of long days and of an endogenous reproductive rhythm. *The Journal of Endocrinology* 1989; 122:269-278.
143. Malpaux B, Tricoire H, Mailliet F, Daveau A, Migaud M, Skinner DC, Pelletier J, Chemineau P. Melatonin and seasonal reproduction: understanding the neuroendocrine mechanisms using the sheep as a model. *Reprod Suppl* 2002;59:167-79. Review.
144. Malpaux B, Daveau A, Maurice-Mandon F, Duarte G, Chemineau P. Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* 1995; 139 1508-1516.

145. Mancuso C, Preziosi P, Grossman AB, Navarra P. The role of carbon monoxide in the regulation of neuroendocrine function. *Neuroimmunomodulation* 1997 Sep-Dec;4(5-6):225-9. Review.
146. Mancuso C, Navarra P, Preziosi P. Roles of nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neurochem* 2010 May;113(3):563-75.
147. Mancuso C. Heme oxygenase and its products in the nervous system. *Antioxid Redox Signal* 2004 Oct;6(5):878-87. Review.
148. Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 43:1334–1339
149. McNeilly A, Crawford J, Taragnat C, Nicol L, and McNeilly J. The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback and packaging. *Reprod Suppl* 2003; 61:463-476.
150. Melyan Z, Tattelin EE, Lucas RJ, Hankins MW. Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive. *Nature* 2005; 433: 741.745.
151. Melyan Z, TatteliN EE, Lucas RJ, Hankins MW. Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive. *Nature* 2005; 433: 741.745.
152. Merchenthaler I, Görcs T, Sétáló G, Petrusz P, Flerkó B. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain. *Cell Tissue Res* 1984;237(1):15-29.
153. Millar RP, Lu Z-L, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K, Maudsley SR. Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrine* 2004; 25 235-275 Reviews.
154. Millar RP. GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14:35-43.
155. Miyamoto K, Hasegawa Y, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H. Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormone in avian species. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:3874-3878.

156. Montell C. TRP channels in *Drosophila* photoreceptor cells. *J Physiol* 2005; 567: 45.51.
157. Morin LP, Blanchard JH, Provencio I. Retinal ganglion cell projections to the hamster suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet, and visual midbrain: bifurcation and melanopsin immunoreactivity. *J Comp Neurol* 2003; 465: 401.416.
158. Morita T, Mitsialis SA, Koike H, Liu Y, Kourembanas S. Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1997 Dec 26;272(52):32804-9
159. Mrosovsky N, Hattar S. Impaired masking responses to light in melanopsin-knockout mice. *Chronobiol Int* 2003; 20: 989.999.
160. Mrosovsky N, Lucas RJ, Foster RG. Persistence of masking responses to light in mice lacking rods and cones. *J Biol Rhythms* 2001; 16: 585.588.
161. Muraoka M, Hayakawa H, Kagaya A, Kojima T, and Yamawaki S. Effects of carbon monoxide exposure on serotonergic neuronal systems in rat brain. *Life Sciences* 1998; 62:2101-2108.
162. Nakai Y, Plant T, Hess D, Keogh E and Knobil E. On the sites of the negative and positive feedback actions of estradiol in the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 1978; 102:1008-1014.
163. Naor Z, Benard O, Seger R. Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab* 2000 Apr; 11(3):91-9. Review
164. Norwitz ER, Jeong KH, Chin WW. Molecular mechanisms of gonadotropin-releasing hormone receptor gene regulation. *J Soc Gynecol Investig* 1999 Jul-Aug; 6(4):169-78. Review.
165. Oren DA, Koziorowski M, Desan PH. SAD and the not-so-single photoreceptors. *Am J Psychiatry*. 2013 Dec 1;170(12):1403-12
166. Oren DA. Humoral phototransduction: blood is a messenger. *Neuroscientist* 1996; 2:207–210.
167. Ortavant R, Mauleon P, Thibault C. Photoperiodic control of gonadal and hypophyseal activity in domestic mammals. *Ann N Y Acad Sci* 1964 Sep 10;117:157-93.

168. Panda S, Nayak SK, Campo B, Walker JR, Hogenesch JB, Jegla T. Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science* 2005; 307: 600.604.
169. Papavasiliou SS, Zmeili S, Khoury S, Landefeld TD, Chin WW, Marshall JC. Gonadotropin-releasing hormone differentially regulates expression of the genes for luteinizing hormone alpha and beta subunits in male rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986 Jun;83(11):4026-9.
170. Pau K, Kuehl DE, Jackson GL. Effect of frontal hypothalamic deafferentation on luteinizing hormone secretion and seasonal breeding in the ewe. *Biology of Reproduction* 1982; 27 999-1009.
171. Paul MJ, Galang J, Schwartz WJ, Prendergast BJ. Intermediate-duration day lengths unmask reproductive responses to nonphotic environmental cues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009 May; 296(5):R1613-9.
172. Peacock, A.J. Environmental and social factors affecting seasonal infertility of pigs. PhD-thesis. University of Sydney, 1991.
173. Peirson SN, Bovee-Geurts PH, Lupi D, Jeffery G, De Grip WJ, Foster RG. Expression of the candidate circadian photopigment melanopsin (Opn4) in the mouse retinal pigment epithelium. *Mol Brain Res* 2004; 123: 132.135.
174. Peltoniemi OA, Love RJ, Heinonen M, Tuovinen V, Saloniemi H. Seasonal and management effects on fertility of the sow: a descriptive study. *Anim Reprod Sci* 1999 Feb 12;55(1):47-61.(a)
175. Peltoniemi OAT, Love RJ, Klupiec C and Evans G. Effect of feed restriction and season on LH and prolactin secretion, adrenal response, insulin and FFA in group housed pregnant gilts. *Anim Reprod Sci* 1997; 49: 179-190.(b)
176. Pepe IM. Recent advances in our understanding of rhodopsin and phototransduction. *Prog Retin Eye Res* 001; 20: 733.759.
177. Paterson AM, Martin GB, Foldes A, Maxwell CA and Pearce GP. Concentrations of plasma melatonin and luteinizing hormone in domestic gilts reared under artificial long or short days. *J Reprod Fertil* 1992; 94: 85-95.
178. Petterborg LJ, Reiter RJ. Effect of photoperiod and melatonin on testicular development in the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*. *J Reprod Fertil* 1980 Sep;60(1):209-12

179. Pittendrigh CS. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol* 1993;55:16-54. Review.
180. Porkka-Heiskanen T, Khoshaba N, Scarbrough K, Urban JH, Vitaterna MH, Levine JE, Turek FW, Horton TH. Rapid photoperiod-induced increase in detectable GnRH mRNA-containing cells in Siberian hamster. *Am J Physiol* 1997 Dec; 273(6 Pt 2):R2032-9.
181. Pouokam E, Steidle J, Diener M. Regulation of colonic ion transport by gasotransmitters. *Biol Pharm Bull* 2011; 34(6):789-93.
182. Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 2002 Jul 26;110(2):251-60.
183. Prendergast BJ. MT1 melatonin receptors mediate somatic, behavioral, and reproductive neuroendocrine responses to photoperiod and melatonin in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* 2010 Feb;151(2):714-21.
184. Provencio I, Jiang G, De Grip WJ, Hayes WP, Rollag MD. Melanopsin: an opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 340.345.
185. Provencio I, RodrigueZ IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD. A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci* 2000; 20: 600.605
186. Przekop F. Effect of anterior deafferentation of the hypothalamus on the release of luteinizing hormone (LH) and reproductive function in sheep. *Acta Physiologica Polonica* 1978; 29 393-407.
187. Qiu X, Kumbalasiri T, Carlson SM, Wong KY, Krisha V, Provencio I, Berson DM. Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature* 2005; 433: 745.749.
188. Reick M, Garcia JA, Dudley C, McKnight SL. NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science* 2001 Jul 20; 293(5529):506-9.
189. Reiter RJ. Pineal control of a seasonal reproductive rhythm in male golden hamsters exposed to natural daylight and temperature. *Endocrinology* 1973 Feb; 92(2):423-30.
190. Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; 12, 151–180

191. Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 1993 Aug 15;49(8):654-64. Review.
192. Reppert SM and Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002; 418:935-941.
193. Robinson JE, Healey AE, Harris TG, Messent EA, Skinner DC, Taylor JA, Evans NP. The negative feedback action of progesterone on luteinizing hormone release is not associated with changes in GnRH mRNA expression in the Ewe. *J Neuroendocrinol* 2000 Feb; 12(2):121-9.
194. Roecklein KA, Rohan KJ, Duncan WC, Rollag MD, Rosenthal NE, Lipsky RH, Provencio I. A missense variant (P10L) of the melanopsin (OPN4) gene in seasonal affective disorder. *J Affect Disord* 2009; 114:279–285
195. Ronchi E, Krey LC, Pfaff DW. Steady state analysis of hypothalamic GnRH mRNA levels in male Syrian hamsters: influences of photoperiod and androgen. *Neuroendocrinology* 1992 Feb;55(2):146-55.
196. Ruf F, Fink MY, Sealfon SC. Structure of the GnRH receptor-stimulated signaling network: insights from genomics. *Front Neuroendocrinol* 2003 Jul;24(3):181-99. Review
197. Ryter SW, Morse D, Choi AM. Carbon monoxide and bilirubin: potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007 Feb;36(2):175-82.
198. Sakakibara H, Taga M, Ikeda M, Kurogi K, Minaguchi H. Continuous stimulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors by GnRH agonist decreases pituitary GnRH receptor messenger ribonucleic acid concentration in immature female rats. *Endocr J* 1996 Feb;43(1):115-8.
199. Sakamoto Y, Harada T, Horie S, Iba Y, Taniguchi F, Yoshida S, Iwabe T, Terakawa N. Tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 (IL-8) expression in endometriotic stromal cells, probably through nuclear factor- κ B activation: gonadotropin-releasing hormone agonist treatment reduced IL-8 expression. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:730-735.

200. Schally A, Arimura A, Baba Y, Nair R, Matsuo H, Redding T, Debeljuk L and White W. Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 43:393-399.
201. Scott CJ, Clarke IJ. Inhibition of luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes during the breeding season by γ -aminobutyric acid (GABA) is mediated by GABA-A receptors, but not GABA- receptors. *Endocrinology* 1993; 132 1789-1796.
202. Sealfon S and R Millar. The gonadotropin-releasing hormone receptor: structural determinants and regulatory control. *Human Reprod Update* 1995; 1:216-230.
203. Seeburg PH, Mason AJ, Stewart TA, Nikolics K. The mammalian GnRH gene and its pivotal role in reproduction. *Recent Prog Horm Res* 1987; 43:69-98
204. Segil N, Roberts SB, Heintz N. Mitotic phosphorylation of the Oct-1 homeodomain and regulation of Oct-1 DNA binding activity. *Science* 1991 Dec 20; 254(5039):1814-6.
205. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwino KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003 Oct 23; 349(17):1614-27.
206. Seong JY, Jarry H, Kühnemuth S, Leonhardt S, Wuttke W, Kim K. Effect of GABAergic compounds on gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in the rat. *Endocrinology* 1995 Jun; 136(6):2587-93.
207. Shupnik MA. Effects of gonadotropin-releasing hormone on rat gonadotropin gene transcription in vitro: requirement for pulsatile administration for luteinizing hormone-beta gene stimulation. *Mol Endocrinol* 1990 Oct; 4(10):1444-50.
208. Singel DJ, Stamler JS. Chemical physiology of blood flow regulation by red blood cells: the role of nitric oxide and S-nitrosohemoglobin. *Annu Rev Physiol* 2005;67:99-145.
209. Skinner DC, Herbison AE. Effects of photoperiod on estrogen receptor, tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, and beta-endorphin immunoreactivity in the ewe hypothalamus. *Endocrinology* 1997 Jun;138(6):2585-95.

210. Skipor J, Grzegorzewski W, Krzymowski T, Einer-Jensen N. Local transport of testosterone from the nasal mucosa to the carotid blood and brain in the pig. *Polish Journal of Veterinary Science* 2000; 3:19-22.
211. Skipor J, Grzegorzewski W, Einer-Jensen N, Wąsowska B. Local vascular pathway for progesterone transfer to the brain after nasal administration in gilts. *Reproductive Biology* 2003; 3:143-159.
212. Skipor J, Grzegorzewski W, Wąsowska B and Krzymowski T. Counter current of beta-endorphin in the perihypophyseal cavernous sinus-carotid rete vascular complex of sheep. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997; 105:308-313.
213. Skipor J, Wąsowska B, Grzegorzewski W, Zezula-Szpyra A, Stefańczyk-Krzymowska S, Thiery J-C. Transver of dopamine by counter current mechanism in ewe changes with endocrine stage. *Biogenic Amines* 2001; 16, 431-445.
214. Smith JT, Clay CM, Caraty A, Clarke IJ. KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology* 2007 Mar; 148(3):1150-7.
215. Stefańczyk-Krzymowska S, Krzymowski T, Grzegorzewski W, Wąsowska B, Skipor J. Humoral pathway for local transfer of the priming pheromone androstenol from the nasal cavity to the brain and hypophysis in anaesthetized gilts. *Experimental Physiology* 2000; 85:801-809.
216. Stojkovic SS, Reinhart J, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocrine Reviews* 1994; 15 462-499.
217. Strzezek J, Fraser L, Hołody D, Wysocki P. Biochemical properties and usefulness of boar semen for liquid preservation following atropine administration. *Zentralbl Veterinarmed A* 1998 Oct; 45(8):459-70.
218. Takahashi JS. Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci* 1995; 18:531–553.
219. Takasu NN, Hashimoto S, Yamanaka Y, Tanahashi Y, Yamazaki A, Honma S, Honma K. Repeated exposures to daytime bright light increase nocturnal melatonin rise and maintain circadian phase in young subjects under fixed sleep schedule. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 291(6):R1799-807.

220. Takasuka H, Hayashi S, Koyama M, Yasuda M, Aihara E, Amagase K, Takeuchi K. Carbon monoxide involved in modulating HCO₃⁻ secretion in rat duodenum. *J Pharmacol Exp* 2011 Apr;337(1):293-300.
221. Taskiran D, Kutay FZ, Pogun S. Effect of carbon monoxide on dopamine and glutamate uptake and cGMP levels in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 2003 Jun;28(6):1176-81.
222. Teclemariam-Mesbah R, Ter Horst GJ, Postema F, Wortel J, Buijs RM. Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol* 1999 Apr 5; 406(2):171-82.
223. Thiery JC, Lomet D, Schumacher M, Liere P, Tricoire H, Locatelli A, Delagrangé P, Malpoux B. Concentrations of estradiol in ewe cerebrospinal fluid are modulated by photoperiod through pineal-dependent mechanisms. *Journal of Pineal Research* 2006; 41:306-312.
224. Thiery JC, Malpoux B. Seasonal regulation of reproductive activity in sheep: modulation of access of sex steroid to the brain. *Annales of The New York Academy of Sciences* 2003; 1007:169-175.
225. Thiery J-C, Martin GB, Tillet Y, Caldani M, Quentin M, Jamain C, Revault JP. Role of hypothalamic catecholamines in the regulation of luteinizing hormone and prolactin secretion in the ewe during seasonal anestrus. *Neuroendocrinology* 1989; 49 80-87.
226. Tomaszewska-Zaremba D, Przekop F. Effects of GABAB receptor modulation on gonadotropin-releasing hormone and endorphin release, and on catecholaminergic activity in the ventromedial hypothalamus-infundibular nucleus region of anestrus ewes. *Journal of Neuroendocrinology* 2005; 17 44-56.
227. Tortonesi DJ, Lincoln GA. Photoperiodic modulation of the dopaminergic control of pulsatile LH secretion in sheep. *J Endocrinol* 1994 Oct;143(1):25-32
228. Tortonesi DJ, Lincoln GA. Effects of melatonin in the mediobasal hypothalamus on the secretion of gonadotrophins in sheep: role of dopaminergic pathways. *J Endocrinol* 1995 Sep;146(3):543-52.

229. Tortonese DJ. Interaction between hypothalamic dopaminergic and opioidergic systems in the photoperiodic regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* 1999; 140 750-757.
230. Turcanu V, Dhouib M, Poindron P. Heme oxygenase inhibits nitric oxide synthase by degrading heme: a negative feedback regulation mechanism for nitric oxide production. *Transplant Proc* 1998 Dec; 30(8):4184-5.
231. Turzillo AM, Juengel JL, Nett TM. Pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) increases concentrations of GnRH receptor messenger ribonucleic acid and numbers of GnRH receptors during luteolysis in the ewe. *Biol Reprod* 1995 Aug; 53(2):418-23.
232. Turzillo AM, Nolan TE, Nett TM. Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene expression in sheep: interaction of GnRH and estradiol. *Endocrinology* 1998 Dec;139(12):4890-4
233. Turzillo AM, Campion CE, Clay CM, Nett TM. Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor messenger ribonucleic acid and GnRH receptors during the early preovulatory period in the ewe. *Endocrinology* 1994 Oct; 135(4):1353-8.
234. Utz J, Ullrich V. Carbon monoxide relaxes ileal smooth muscle through activation of guanylate cyclase. *Biochem Pharmacol* 1991; 41:1195–1201.
235. Van Gelder RN. Non-visual ocular photoreception. *Ophthalmic Genet* 2001 Dec; 22(4):195-205. Review.
236. Velardo J. Induction of ovulation in immature hypophysectomized rats. *Science* 1960; 131: 357-359.
237. Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* 1993; 259:381–384.
238. Virshup DM, Eide EJ, Forger DB, Gallego M, Harnish EV. Reversible protein phosphorylation regulates circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2007; 72:413-20. Review
239. Vizcarra JA, Wettemann RP, Braden TD, Turzillo AM, Nett TM. Effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on serum and pituitary concentrations of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone, GnRH

- receptors, and messenger ribonucleic acid for gonadotropin subunits in cows. *Endocrinology* 1997 Feb; 138(2):594-601.
240. Von Schantz M, Provencio I, Foster RG. Recent developments in circadian photoreception: more than meets the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 1605-1607.
 241. Wang R, Wu L, Wang Z. The direct effect of carbon monoxide on K, Ca channels in vascular smooth muscle cells. *Pflügers Archive* 1997; 434:285-291
 242. Wayne NL, Malpaux B, Karsch FJ. Social cues can play a role in timing onset of the breeding season of the ewe. *J Reprod Fertil* 1989; 87, 707–713.
 243. Wehr TA, Duncan WC Jr, Sher L, Aeschbach D, Schwartz PJ, Turner EH, Postolache TT, Rosenthal NE. A circadian signal of change of season in patients with seasonal affective disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2001 Dec; 58(12):1108-14.
 244. Weiss J, Duca KA, Crowley Jr WF. Gonadotropin-releasing hormone-induced stimulation and desensitization of free alpha-subunit secretion mirrors luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in perfused rat pituitary cells. *Endocrinology* 1990; 127, 2364–2371.
 245. Weiss G, Werner-Felmayer G, Werner ER, Grunewald K, Wachter H, Hentze MW. Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription. *J Exp Med* 1994; 180:969–976.
 246. Weissenberg R, Eshkol A and Lunenfeld B. Hormonal dependence of the first spermatogenic wave in the mouse. *Arch Androl* 1982; 9:135-140.
 247. White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD. Second form of gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:305-309.
 248. White KA, Marletta MA. Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* 1992; 31:6627–6631.
 249. White B, Duval D, Mulvaney J, Roberson M and Clay. Homologous regulation of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene is partially mediated by protein kinase C activation of an activator protein-1 element. *Mol Endocrinol* 1999; 13:566-577.

250. Wierman ME, Rivier JE, Wang C. Gonadotropin-releasing hormone-dependent regulation of gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid levels in the rat. *Endocrinology* 1989 Jan; 124(1):272-8.
251. Wizcarra JA, Wattermann RP, Bruden VD, Turzillo AM, Nett TM. Effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on serum and pituitary concentrations of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone, GnRH receptor and messenger ribonucleic acid for gonadotropin subunits in cows. *Endocrinology* 1997; 138 594-601.
252. Wray S. Development of Luteinizing Hormone Releasing Hormone Neurones. *J Neuroendocrinol* 2001; 13:3–11. Review.
253. Wu L, Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev* 2005 Dec;57(4):585-630. Review.
254. Yamada Y, Forger D. Multiscale complexity in the mammalian circadian clock. *Curr Opin Genet Dev* 2010 Dec;20(6):626-33. Review.
255. Yasin M, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Kerrigan JR, Marshall JC. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse pattern regulates GnRH receptor gene expression: augmentation by estradiol. *Endocrinology* 1995 Apr;136(4):1559-64
256. Young MW, Kay SA. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat Rev Genet* 2001 Sep; 2(9):702-15. Review.
257. Zawilska JB and Nowak JZ. Regulatory mechanisms in melatonin biosynthesis in retina. *Neurochem* 1992; Int. 20, 23–36.
258. Zhao S, Saito H, Wang X, Saito T, Kaneko T, Hirori M. Effects of gonadotropin-releasing-hormone agonist on the incidence of apoptosis in porcine and human granulosa cells. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 49:52-56.
259. Zhuo M, Small SA, Kandel ER, Hawkins RD. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. *Science* 1993 Jun 25; 260(5116):1946-50.
260. Ziecik A, Goralska M, Krzymowski T, Pogorzelski K. Isolation and purification of porcine LH for radioimmunoassay and radioreceptor assay. *Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences* 1979; 26:739-744.

261. Zisapel N, Egozi Y, Laudon M. Inhibition of dopamine release by melatonin: regional distribution in the rat brain. *Brain Res* 1982 Aug 19;246(1):161-3.