

PIOTR BENTKOWSKI<sup>1</sup>, MAGDALENA MARKOWSKA<sup>2</sup>

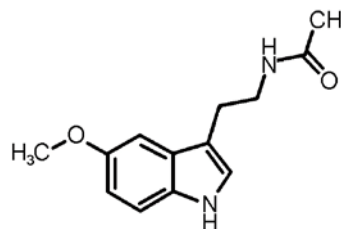
<sup>1</sup>Zakład Hydrobiologii  
Wydział Biologii  
Uniwersytet Warszawski  
Banacha 2, 02-097 Warszawa

<sup>2</sup>Zakład Fizjologii Zwierząt  
Wydział Biologii  
Uniwersytet Warszawski  
Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa  
E-mail: [pbent@okw.fuw.edu.pl](mailto:pbent@okw.fuw.edu.pl)  
[markosia@biol.uw.edu.pl](mailto:markosia@biol.uw.edu.pl)

## EWOLUCJA FIZJOLOGICZNYCH FUNKCJI MELATONINY U BEZKRĘGOWCÓW

Odkrycie melatoniny sięga początku XX w., kiedy to w 1917 r. MCCORD i ALLEN wykazali, że homogenat szyszynki zawiera substancję rozjaśniającą skórę kijanek. Ponad 40 lat później, w 1958 r., LERNER i jego współpracownicy wyizolowali z szyszynki (a ściślej z 200 tysięcy szyszynki bydłeczych, które razem ważyły około 100 kg!) i zidentyfikowali główny czynnik wywołujący wspomniany efekt, i nazwali go melatoniną, ze względu na oddziaływanie z melanocytami skóry żaby. W kolejnych dekadach wykazano powszechność występowania tej substancji w świecie organizmów żywych. Stwierdzono ją u wielu kręgowców, bezkręgowców, a także u roślin wyższych, pierwotniaków, grzybów i bakterii. Tak szerokie rozpowszechnienie melatoniny sugeruje jej wczesne pojawienie się w historii życia na Ziemi. Na uwagę zasługuje fakt, że cząsteczka ta, która w świecie ożywionym pojawiła się wiele set milionów lat temu, ma identyczną budowę u wszystkich organizmów, u których stwierdzono jej wy-

stępowanie (Ryc. 1). Natomiast zróżnicowaniu uległy funkcje, jakie melatonina pełni u



Ryc. 1. Wzór strukturalny melatoniny.

różnych gatunków. Jak dotąd, rozpoznano zaangażowanie tej indoloaminy między innymi w: ochronę przed wolnymi rodnikami, regulację zegara biologicznego, regulację rozmnażania się i dojrzewania płciowego u ssaków, regulację snu, immunomodulację oraz regulację masy ciała i metabolizmu energetycznego (PANDI-PERUMAL i współaut. 2006).

## MODEL EWOLUCJI FUNKCJI MELATONINY

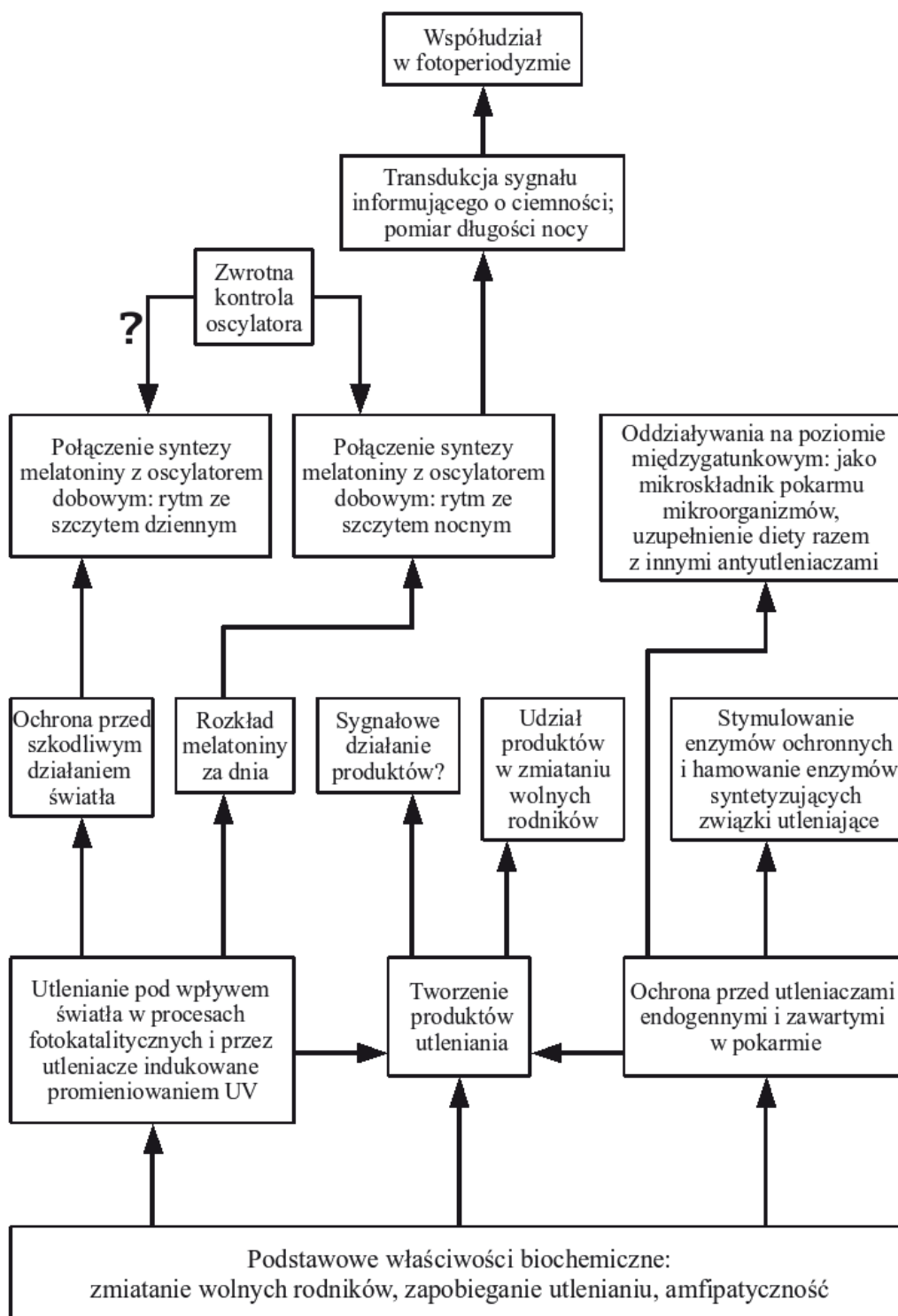
Wszechstronność funkcji melatoniny i jej wszechobecność u organizmów żywych nieodzownie rodzi pytanie o ewolucję funkcji jaką ta cząsteczka przeszła od biochemicznej

roli w metabolizmie archaicznych bakterii, do funkcji hormonalnej, między innymi w regulacji behawioru dobowego. Kompleksowy schemat ewolucji funkcji melatoniny, ba-

zujący na jej podstawowych właściwościach biochemicznych, zaproponowali HARDELAND i POEGGELER (2003) (Ryc. 2).

Jedną z intensywnie badanych właściwości melatoniny jest jej działanie jako zmia-

tacza wolnych rodników i tę właśnie funkcję obecnie uznaje się, obok zdolności do unieszkodliwiania związków utleniających, za pierwotną ewolucyjnie (HARDELAND i POEGGELER 2003). Zmiany struktury cząsteczki



Ryc. 2. Schemat ewolucji funkcji melatoniny, począwszy od jej fundamentalnych właściwości biochemicznych (wg HARDELANDA i POEGGELERA 2003, zmodyfikowana).

melatoniny, przy jej dość małych rozmiarach, zapewne istotnie wpłynęłyby na jej właściwości jako zmiatacza wolnych rodników, co zmniejszyłoby zdolność komórki do radzenia sobie ze stresem wywołanym gromadzeniem się związków silnie utleniających.

Wspomniani HARDELAND i POEGGELER dopatrują się powstania tych wczesnych ewolucyjnie funkcji melatoniny w okresie ekspansji organizmów fotosyntetyzujących, która zaowocowała znacznym wzrostem stężenia tlenu w środowisku, i z którą ściśle spleta się intensywny rozwój organizmów oddychających tlenowo. Melatonina i pokrewne jej związki, 5-metylotryptoamina, 5-metoksy-N,N-dimetylotryptoamina, oraz enzymy antyutleniające zabezpieczałyby komórkę zarówno przed egzogennymi, jak i endogennymi wolnymi rodnikami oraz innymi związkami o silnym potencjale oksydacyjnym zagrażającym homeostazie komórki. Melatonina niszcząc wolne rodniki przekształca wiele z nich w związki, które również mają właściwości zmiataczy wolnych rodników, a kaskadowość tego procesu sprawia, że ta indoloamina jest niezwykle skutecznym zmiataczem wolnych rodników. Na uwagę zasługuje pogląd, że już na tak wczesnym etapie ewolucji funkcji melatoniny mogły zarysować się okołodobowe oscylacje jej stężenia w komórce. Reakcje szlaku fotosyntezy, w efekcie których powstaje tlen, mogą zająć w obecności światła, czyli należy oczekiwać, przynajmniej w środowisku zamieszkiwanym przez organizmy fotosyntetyzujące, wzrostu stężenia tlenu za dnia oraz jego spadku w nocy wskutek zużycia go w procesach oddychania. Ponadto promieniowanie słoneczne docierające do powierzchni Ziemi, na przykład w zakresie ultrafioletu, sprzyja powstawaniu w środowisku związków o dużym potencjale oksydacyjnym. Ten czynnik abiotyczny miał prawdopodobnie większe znaczenie w okresie, gdy Ziemia nie posiadała jeszcze warstwy ozonowej, co miało miejsce we wczesnym etapie rozwoju życia.

Ujawniła się też możliwość przekazywania sygnału za pośrednictwem melatoniny i produktów jej metabolizmu. Rytmiczne

zmiany stężenia melatoniny związane z jej ochronną funkcją, które, na przykład powodowały spadek jej stężenia za dnia, w związku z ochroną przed szkodliwym działaniem promieniowania ultrafioletowego, mogły stać się dobrymi wyznacznikami endogennego rytmu dobowego. Nocne szczyty melatoniny wraz z mechanizmami jej cyklicznej syntezy, mogą odgrywać rolę w pomiarze długości nocy. Natomiast zwiększony poziom syntezy melatoniny występujący za dnia kompensuje podwyższone stężenie wolnych rodników w środowisku o tej właśnie porze doby. To umożliwiło pomiar długości dnia.

Pierwotna funkcja melatoniny, jako zmiatacza wolnych rodników oraz przeciwutleniacza, mogła również sprzyjać regulacji syntezy i aktywności enzymów katalizujących powstawanie i rozkład związków utleniających.

Melatonina i jej metabolity mogły stać się mikroskładnikami „odżywczymi” – uzupełnieniem diety innych organizmów (głównie bakterii i grzybów) – razem z innymi antyutleniaczami.

Produkowana najprawdopodobniej przez wszystkie rośliny oraz wszystkie zwierzęta mogła w środowiskach wodnych stać się nośnikiem informacji dla zasiedlających zbiornik organizmów o niektórych, zwłaszcza biotycznych, składowych stanu otoczenia.

Model HARDELANDA i POEGGELERA niestety jest dość trudny do weryfikacji. Ślady kopalne pozwalają na bezpośrednią rekonstrukcję jedynie morfologii i niektórych składowych środowiska życia nieistniejących już gatunków, a dopiero na ich podstawie, w sposób pośredni, można wnioskować o pewnych aspektach ich fizjologii i ekologii. Rekonstrukcja ewolucji procesów fizjologicznych, w tym regulacji hormonalnej, jest dużo trudniejsza. Dysponujemy jedynie wynikami badań współcześnie istniejących gatunków oraz modelem filogenezy opartym na analizie materiału kopalnego i badaniach porównawczych. Dopiero znajomość tych danych pozwala, również w sposób pośredni, rekonstruować przebieg ewolucji określonej funkcji fizjologicznej oraz zaangażowanych w nią substancji.

#### BADANIA NAD MELATONINĄ U BEZKRĘGOWCÓW

W dociekaniach nad ewolucją funkcji melatoniny ważną rolę odgrywają badania bezkręgowców. Liczne gatunki tej grupy

przetrwały w niezmienionej formie setki milionów lat, jednocześnie bezkręgowce są grupą zwierząt, w obrębie której istnieje duże

zróźnicowanie budowy ciała. Daje to możliwość szerokiego spojrzenia na zagadnienie ewolucji. Niestety do tej pory opublikowano jedynie nieliczne prace omawiające występowanie i funkcje tego hormonu u zwierząt bezkręgowych. Prac o podobnej tematyce dotyczących zwierząt kręgowych jest bez porównania więcej.

#### BIOSYNTENZA MELATONINY

Biosynteza melatoniny została najlepiej poznana u zwierząt kręgowych, u których znany jest pełny szlak jej powstawania. Melatonina (N-acetylo-5-metoksy-tryptamina) jest indoloaminą, pochodną tryptofanu. Kluczowym etapem jej syntezy jest N-acetylowanie serotoniny, katalizowane przez N-acetylowy transferazę serotoninową (NAT). Enzym ten, wykazuje dobowy wzorzec aktywności, zgodny z rytmem wydzielania melatoniny. Ostatnim etapem biosyntezy jest O-metylowanie N-acetylowoserotoniny przez transferazę hydroksyindolo-O-metylową (HIOMT). Aktywność tego enzymu nie wykazuje rytmicznych zmian w ciągu doby, bowiem uczestniczy on w przenoszeniu grupy metylowej na jeszcze inne pochodne tryptofanu, powstające w szyszynce. U kręgowców melatonina metabolizowana jest w wątrobie, a jej metabolity, siarczany 6-hydroksymelatoniny lub glukuroniany 6-hydroksymelatoniny, wydalone są wraz z moczem, wykazując taki sam rytm dobowy jak aktywność NAT i poziom melatoniny. Degradacja melatoniny zachodzi szybko, a czas połowicznego rozpadu wynosi około 10 minut. Szlak ten zapewne jest rozpowszechniony również u innych taksonów, o czym świadczy występowanie głównych enzymów biosyntezy melatoniny (NAT i HIOMT) u odległych taksonomicznie gatunków (VIVIEN-ROELS i PEVET 1993).

#### METODY BADAŃ BIOLOGICZNYCH FUNKCJI MELATONINY U BEZKRĘGOWCÓW

Badania nad melatoniną u bezkręgowców prowadzone są w dwóch kierunkach. Pierwszy z nich ma na celu określenie występowania endogennej melatoniny w ciałach zwierząt poprzez określenie narządów lub części ciała, w których hormon ten występuje oraz w jakich stężeniach. Bada się też sezonowe i dobowe zmiany stężenia melatoniny. Podejmowane są również próby określenia aktywności enzymów szlaku jej biosyntezy. Drugi kierunek badań ma określić, czy pod wpływem egzogennej melatoniny występują zmiany określonych funkcji fizjologicznych i/lub behawioru oraz

jaki mają one charakter. Liczba gatunków bezkręgowców przebadanych zgodnie z oboma kierunkami nie jest zbyt duża.

Pośrednich dowodów na synteze melatoniny u danego gatunku dostarczają wspomniane już badania aktywności enzymów szlaku jej biosyntezy oraz obecności jej prekursorów. Najczęściej badanymi enzymami są NAT i HIOMT. Szuka się również prekursora melatoniny – N-acetylowoserotoniny (NAS).

#### WYSTĘPOWANIE MELATONINY U BEZKRĘGOWCÓW

Przebadane pod kątem obecności melatoniny gatunki należą do: tobołków (Dinoflagellata), parzydełkowców (Cnidaria), wstężniaków (Nemertini), płazińców (Platyhelminthes), skorupiaków (Crustacea), owadów (Insecta) i mięczaków (Mollusca).

U jednokomórkowych tobołków, *Gonyaulax polyedra*, wykryto melatoninę w stężeniu zbliżonym do wykrywanego u kręgowców; w czasie nocnego maksimum wynosi ono 2,5 ng/mg białka. W organizmach tych wykryto ponadto 5-metylotryptaminę oraz enzymy szlaku biosyntezy melatoniny: NAT i HIOMT (BALZER i HARDELAND 1991).

Najprymitywniejszym ewolucyjnie wielokomórkowcem przebadanym pod kątem obecności melatoniny jest parzydełkowiec *Renilla koellikeri*. W ciągu 13 miesięcy badań nie stwierdzono u tego gatunku dobowej rytmiki zmian stężenia melatoniny, ale wykazano zmiany sezonowe (MECHAWAR i ANCTIL 1997).

U wstężniaka, *Lineus lacteus*, stwierdzono obecność melatoniny w oczach i mózgu (ARNOULT i współaut. 1994). Należy spodziewać się, że posiadają ją również inne gatunki z tego rodzaju, np. *L. sanguineus*, u którego, podobnie jak u *L. lacteus*, badano wpływ egzogennej melatoniny na regenerację ciała (ARNOULT i VERNET 1995).

Płazińcami przebadanymi pod kątem obecności melatoniny są 2 gatunki wirków, *Dugesia dorotocephala* oraz *D. japonica*. W głowie dekapitowanego wirka, *D. dorotocephala*, stwierdzono 31–37 pg melatoniny (MORITA i współaut. 1987), a u *D. japonica* – od blisko zera do około 104 pg na jednego osobnika (ITOH i współaut. 1999). Tylko u *D. japonica* przebadano zmiany stężenia melatoniny w cyklu dobowym i stwierdzono nocny szczyt stężenia tego hormonu. U tego gatunku wykazano również obecność HIOMT i produktu reakcji katalizowanej przez NAT-NAS, których najwyższe stężenia stwierdzono

w środku nocy, a najniższe podczas środka dnia (ITOH i współaut. 1999).

Nieco więcej wiadomo o obecności melatoniny u skorupiaków z rzędu dziesięcionogów (Decapoda). Najwięcej badań przeprowadzono na raku Luizjańskim, *Procambarus clarkii*, u którego wykryto melatoninę w słupku ocznym w stężeniu od 30 do 1813 pg (BALZER i współaut. 1997). Stwierdzono u niego dobowe zmiany stężenia melatoniny. Wyniki badań nie są jednoznaczne: zespół BALZERA i współaut. (1997) wskazał nocny szczyt jej stężenia, natomiast AGAPITO i współaut. (1995) – dzienny. Melatoninę wykryto również u dwóch krabów: *Carcinus meanas* oraz *Uca pugilator*. U *C. meanas* melatoninę wykryto w oku (od 2800 do 3680 pg) oraz nieco więcej w słupku ocznym wraz z płatem wzrokowym; nie wykazano jednak istotnych zmian okołodobowych w jej stężeniu (VIVIEN-ROELS i PÉVET 1986). Kraby te żyją w strefie pływów, należało więc oczekiwać, że ich dobowa aktywność będzie raczej zależać od wschodów i zachodów Księżyca niż Słońca. Jednak wykluczono korelację z ruchem Księżyca (VIVIEN-ROELS i PÉVET 1993). U *U. pugilator* melatoninę wykryto w słupku ocznym; u zwierząt hodowanych w fotoperiodzie L:D=12:12 szczyt jej stężenia przypadł na środek dnia. Osobniki trzymane w ciągłym oświetleniu wykazują istotnie podwyższone stężenie melatoniny, w porównaniu ze zwierzętami trzymanymi w stałej ciemności, jak i pozostającymi w fotoperiodzie L:D=12:12. Aktywność NAT, badana w tym samym doświadczeniu, rosła wraz ze wzrastającym poziomem melatoniny (TILDEN i współaut. 2001). Kolejne dwa gatunki skorupiaków przebadane w tym kierunku to krewetki: morska *Penaeus monodon* oraz słodkowodna *Macrobrachium rosenbergii*. U tej pierwszej wykryto melatoninę w płacie wzrokowym. U *P. monodon* oprócz melatoniny wykryto również HIOMT (w niskich stężeniach w porównaniu z innymi organizmami) oraz NAT (WITHYACHUMNARNKUL i współaut. 1995). O *M. rosenbergii* wiadomo, że melatonina obecna jest w płacie wzrokowym w stężeniu od 0,5 do 5,5 pg/mg białka w tym narządzie (WITHYACHUMNARNKUL i współaut. 1992). U tego gatunku wykazano istnienie dziennego szczytu stężenia melatoniny, ale u samic w innej porze dnia niż u samców (WITHYACHUMNARNKUL i współaut. 1999). Przyczyna tej różnicy nie jest znana. W płacie wzrokowym tej krewetki stwierdzono również aktywność NAT, ale enzym ten nie wykazywał

dobowych zmian stężenia. Ciekawe jest, że u *M. rosenbergii* trzymanych przez miesiąc w warunkach ciągłego oświetlenia aktywność NAT była znacząco wyższa niż u osobników trzymanych w L:D=12:12, przy jednoczesnym braku zasadniczych różnic w stężeniach melatoniny między tymi grupami (WITHYACHUMNARNKUL i współaut. 1992). Narządem, w którym być może zachodzi synteza tego związku u wymienionych skorupiaków jest narząd Bellonciego, zlokalizowany w płacie wzrokowym. Wykazano, że zbudowany jest on z komórek podobnych do pinealocytów kręgowców oraz stwierdzono w nim obecność serotoniny, NAT i melatoniny.

Wśród wioślarek (Cladocera) przebadano rozwielitkę z gatunku *Daphnia magna*. W ciągu doby badano stężenia melatoniny w całych ciałach *D. magna*, w jedno- lub dwugodzinnych odstępach. Średnie stężenie melatoniny wahało się od  $10,5 \pm 8,6$  do  $99,6 \pm 40,8$  pg/mg białka. Zwierzęta hodowane w fotoperiodzie letnim L:D=16:8 wykazują szczyt stężenia melatoniny w pierwszej połowie dnia (Bentkowski i współaut., wyniki nieopublikowane).

Spośród owadów, u których badano obecność melatoniny, dwa gatunki należą do prostoskrzydłych (szarańcza wędrowna *Locusta migratoria* i świerszcz *Gryllus bimaculatus*), a trzy gatunki do much (*Musca autumnalis*, *Drosophila melanogaster* i *D. simulans*). Ponadto przebadano jeden gatunek motyla (jedwabnik *Bombyx mori*), jeden gatunek mszyc (*Acyrtosiphon pisum*) oraz karaluchy (w tym *Periplaneta americana*). U szarańczy melatoninę stwierdzono w oku w stężeniach: 10,5 do 26,5 pg/oko (metodą radioimmunologiczną – RIA) oraz 2,4 do 6,5 pg/oko (metodą chromatografii gazowej i spektrometrii masowej GC/MS) oraz wykazano nocny szczyt jej stężenia (VIVIEN-ROELS i współaut. 1984). U świerszcza, *G. bimaculatus*, w mózgu, oku złożonym i w palpi zaobserwowano większe stężenie melatoniny w nocy niż za dnia, natomiast w cersus, pokładelku i w odnóżach stężenia tej indoloaminy były większe za dnia niż w nocy (ITOH i współaut. 1995a). Melatoninę stwierdzono także w jajach tego gatunku już na wczesnym etapie ontogenezy, zaraz po złożeniu jaj przez samicę, i zaobserwowano dobowe wahania jej stężenia, z nocnym szczytem. Natomiast aktywność NAT, wykazującej szczyt nocą, ma różny przebieg w trakcie rozwoju jaja. Autorzy wykryli ten enzym trzeciej nocy od jego złożenia, a dziewiątego dnia nastąpił gwałtowny wzrost ak-

tywności NAT, podczas którego nasiliła się różnica między dniem a nocą. Dobowa różnica stopniowo malała, aby piętnastego dnia, czyli tuż przed wykluciem, zaniknąć. Stosując różne metody pomiaru wykryto melatoninę w stężeniu:  $0,17 \pm 0,05$  pg/jajo (metoda RIA) oraz  $0,19 \pm 0,04$  pg/jajo (metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej – HPLC) (ITOH i SUMI 1998).

U *M. autumnalis* melatonina występuje w jej mózgu w stężeniu ok.  $162 \pm 39$  nmoli/mózg. Wykazano również dobowy rytm jej syntezy ze szczytem w nocy (WETTERBERG i współaut. 1987). U *D. melanogaster* stwierdzono obecność tej indoloaminy w głowie w stężeniu  $39,5 \pm 5,3$  pmoli/g głowy, ale nie badano okołodobowych zmian jej stężenia. Również u *D. simulans* stwierdzono obecność melatoniny, lecz bez wskazania narządów w jakich występuje (VIVIEN-ROELS i PEVET 1993). Dość dobrze przebadanym gatunkiem jest jedwabnik *B. mori*, u którego melatoninę wykryto i zmierzono jej stężenie w głowie oraz w hemolimfie. W głowie stężenie to wynosiło od 70 do 370 pg, natomiast w hemolimfie od 180 do 480 pg/ml. W obu przypadkach stwierdzono nocne, nakładające się, szczyty jej stężenia. W głowie badanych osobników wykryto również nocny szczyt aktywności NAT. Badania *B. mori* w trzech różnych warunkach świetlnych: L:D=12:12, ciągłym światłem i ciągłej ciemności wykazały, że różnica w dobowych stężeniach melatoniny utrzymuje się również w ciągłej ciemności, ale znika u zwierząt trzymany w ciągłym świetle. Podobne zależności zaobserwowano badając stężenia melatoniny zarówno w głowie, jak i w hemolimfie, przy czym ujawniał się wyraźny spadek jej stężenia podczas okresu subiektywnej nocy u osobników hodowanych cały czas w świetle (ITOH i współaut. 1995b).

U mszyc, *A. pisum*, wykazano obecność melatoniny w stężeniach od  $44,0 \pm 9,5$  do  $116,5 \pm 21,0$  pg/100 mg ich ciała. W ciemnej fazie doby stężenie jest nieco wyższe niż w jasnej, jednak autorzy nie stwierdzili różnic istotnych statystycznie (GAO i HARDIE 1997).

Wykazano też obecność melatoniny w mózgu i/lub płacie wzrokowym u karaluchów, i jak stwierdzono, jej stężenie w tych narządach waha się między 20-150 pg (VIVIEN-ROELS i PEVET 1993). Dobowe zmiany jej stężenia wykazują szczyt nocą. W płacie wzrokowym karalucha wykryto również HIOMT (TAKEDA i współaut. 1985). U *P. americana* hodowanego w warunkach oświetlenia L:D=12:12 zaobserwowano obecność melatoniny w mózgu (od

$3,23 \pm 1,7$  w dzień do  $15,3 \pm 1,1$  pg/mg białka w nocy), siatkówce (od  $4,6 \pm 0,7$  w dzień do  $9,2 \pm 1,1$  pg/mg białka w nocy) i hemolimfie (od  $12,1 \pm 3,6$  w dzień do  $144,2 \pm 40,0$  pg/mg białka w nocy). Zbadano również aktywność NAT. Mierzając ją dwa razy w ciągu doby – w środku dnia i w środku nocy – stwierdzono jej aktywność w mózgu, jelicie środkowym, jajnikach, gruczołach dodatkowych i w jądrach. W mózgu, aktywność NAT była większa w nocy niż w czasie dnia, natomiast w gruczołach dodatkowych u samic zwiększała się w dzień. W pozostałych narządach nie stwierdzono różnic w aktywności między dniem a nocą (BEMBENEK i współaut. 2005).

Wśród mięczaków przebadano mątwę, *Sepia officinalis*, oraz ślimaki, *Aplysia californica* i *Helix aspersa maxima*. Melatonina została stwierdzona w siatkówce mątwy w stężeniu od 2100 do 2800 pg/siatkówkę, co w przeliczeniu na jej masę daje od 2,9 do 3,5 pg/mg siatkówki. Brak informacji o dobowych zmianach stężenia tego związku w ciele mątwy (VIVIEN-ROELS i PEVET 1986). Natomiast u *A. californica* wykazano, że w oku i w zwoju głowowym szczyt stężenia melatoniny występuje w czasie dnia, zaś w zwoju nożnym indoloamina ta jest ledwie wykrywalna (ABRAN i współaut. 1994). U *H. a. maxima* przebadano trzy struktury: zwój głowowy, zwój trzewny i słupek oczny. W zwoju głowowym szczyt stężenia melatoniny wykryto pod koniec nocy. W pozostałych strukturach jej poziom był na granicy czułości stosowanej metody. Ciekawe jest, że u tego gatunku nie stwierdzono aktywności NAT, ale wykryto HIOMT, którego obecność autorzy wiążą raczej z syntezą 5-metoksytryptofolu (5-ML) u tego ślimaka (BLANC i współaut. 2003).

#### WPLYW MELATONINY NA FIZJOLOGIĘ I BEHAVIOR U BEZKRĘGOWCÓW

W licznych badaniach wykazano zależności, które ukazują związki, jakie zachodzą między dobową rytmiką stężenia melatoniny a rytmemi u kręgowców. Również u bezkręgowców postuluje się jej wpływ na zjawiska fizjologiczne, które wykazują rytmikę dobową, choć prac doświadczalnych omawiających to zagadnienie jest znacznie mniej niż u kręgowców.

Potwierdzeniem hipotezy o roli melatoniny w regulacji aktywności dobowej jest doświadczenie, w którym podawano świerszczom, *Acheta domesticus*, melatoninę w wodzie do picia. Stwierdzono spadek aktywności lokomotorycznej tego gatunku wraz z podawaniem melatoniny w stężeniu

200 µg/ml i wyższych (YAMAMOTO i współaut. 2001).

U raka luizjańskiego, *Procambarus klarkii*, melatonina wstrzyknięta w nasadę odnóża kroczonego wczesną wiosną odwracała rytm aktywności lokomotorycznej. Zwierzęta doświadczalne były aktywniejsze w jasnej fazie doby i mniej aktywne w fazie ciemnej – odwrotnie niż w grupie kontrolnej. Dodatkowo, melatonina podawana o różnych porach doby, miała różny wpływ na badane zwierzęta. Podana o godz. 12.00 (środek fazy jasnej) i o godz. 15.00 podnosiła aktywność lokomotoryczną badanych osobników, natomiast wstrzyknięta o godz. 18.00 (koniec fazy jasnej) i o godz. 21.00 powodowała spadek aktywności. W eksperymentach przeprowadzonych w porze wiosennej stwierdzono, że egzogenna melatonina nie wpływała modyfikująco na rytm zmian stężenia glukozy/mleczanu. Natomiast w doświadczeniu powtórzonym późnym latem, gdy aktywność lokomotoryczna i stężenie glukozy/mleczanu było wyższe, podanie melatoniny w fazie jasnej powodowało zaniknięcie cykli i wyrównanie dobowej aktywności oraz stężenia badanych metabolitów (TILDEN i współaut. 2003).

U *D. magna*, trzymanych w fotoperiodzie symulującym lato L:D=16:8, egzogenną melatoninę podawano w wodzie, w której żyły zwierzęta, w obecności lub nieobecności planktonożernej ryby, karmionej osobnikami tego samego gatunku. Dwa razy w ciągu doby, w środku dnia i w środku nocy, badano głębokość, na jakiej przebywały zwierzęta. Zaobserwowano obniżenie średniej głębokości przebywania osobników eksponowanych na melatoninę, ale tylko przy jednoczesnej obecności kairomonu. Wobec braku sygnału zagrożenia zwierzęta poddane wpływowi melatoniny nie zmieniały preferowanej głębokości, w stosunku do grup nieeksponowanych na melatoninę (Bentkowski i współaut. dane nieopublikowane).

Na podstawie tych wyników można przypuszczać, że melatonina bierze udział w regulacji cykli okołodobowych, jak i sezonowych, choć, wobec złożoności czynników kształtujących behavior zwierząt, można przypuszczać, że nie jest ona jedynym, w pełni decydującym, czynnikiem.

Inną, udokumentowaną funkcją melatoniny u bezkręgowców jest jej wpływ na regenerację ciała. U wyplawka, *Dugesia japonica* (YOSHIZAWA i współaut. 1991), oraz u wstężniaka, *Lineus lacteus* (ARNOULT i VERNET 1995), melatonina hamuje regenerację. Natomiast u kraba, *Uca pugnator*, melatonina wstrzykiwana u nasady odnóża przyspie-

sza tempo regeneracji usuniętego odnóża, zarówno w grupach, którym pozostawiono lub usunięto słupek oczny, będący potwierdzonym miejscem występowania endogennej melatoniny i prawdopodobnym miejscem jej syntezy (TILDEN i współaut. 1997). Mechanizm działania melatoniny w tych przypadkach pozostaje jednak niewyjaśniony.

Melatonina ma również wpływ na procesy metaboliczne oraz na procesy związane z rozrodem i zmianami form życiowych. Rozmnażające się partenogenetycznie mszyce, *Acyrtosiphon pisum*, karmione były spreparowanym pokarmem zawierającym melatoninę. Zaobserwowano, że mszyce te mają opóźniony rozwój, wytwarzają mniej potomstwa i mniej osobników młodocianych dożywa stadium dojrzałego. Zaobserwowano dodatnio korelację między stężeniem melatoniny w pokarmie a odsetkiem samców i samic w potomstwie, zdolnych do rozrodu seksualnego. W zastosowanym fotoperiodzie L:D=16:8 egzogenna melatonina sprzyjała pojawianiu się samców i samic zdolnych do zapłodnienia, co w warunkach naturalnych zachodzi zwykle jesienią (GAO i HARDIE 1997).

Wpływ melatoniny na wybór kierunku ontogenezy przez osobniki zaobserwowano także u jednokomórkowca, tobołka *Gonyaulax polyedra*, u którego pod wpływem melatoniny rozpuszczonej w medium, częściej tworzone są cysty. Podobny efekt wywołuje obniżenie temperatury do 15°C. Powoduje to wytwarzanie 5-metoksytrypaminy i prowadzi, niezależnie od fotoperiodu, przejście w formę cyst (BALZER i HARDELAND 1991).

Obserwuje się również wpływ melatoniny na układ hormonalny u bezkręgowców. Wyizolowane corpora cardiaca szarańczy, *Locusta migratoria*, w odpowiedzi na stymulację melatoniną, uwalniały neuroparsyny, białka związane z prekursorem hormonu adipokinetycznego oraz peptydów diuretycznych. Działanie większości z tych substancji nie jest w pełni wyjaśnione, ale za autorami badań warto zwrócić uwagę, że substancje te mają szerokie spektrum biologicznego działania – od udziału w hormonalnej regulacji ontogenezy, przez regulację metabolizmu, do udziału w procesach nerwowych (HUYBRECHTS i współaut. 2005).

Dostępne, choć ciągle nieliczne, dane eksperymentalne pozwalają przychylnie patrzeć na model ewolucji funkcji melatoniny zaproponowany w 2003 r. przez HARDELANDĄ i POEGGELERĄ, przynajmniej w odniesieniu do zwierząt. Ciekawą implikacją tego modelu jest fakt, że melatonina pełni wiele funkcji u osob-

nika jednego gatunku, różnych w zależności od taksonomicznej przynależności i złożoności budowy zwierzęcia, przy czym, wraz z ewolucyjnym zaawansowaniem budowy ciała zwierzęcia, następuje wzrost bogactwa i złożoności funkcji pełnionych przez melatoninę. Jest to interesujący przykład jak dobór naturalny, zamiast tworzyć nowe rozwiązania, wykorzy-

stuje już istniejące mechanizmy, modyfikując je do nowych wymagań środowiska.

#### PODZIĘKOWANIA

Niniejsza praca powstała w ramach prac badawczych finansowanych przez grant Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 2 PO4F 036 26.

## EVOLUTION OF PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS OF MELATONIN IN INVERTEBRATES

### Summary

Melatonin is one of most widespread biological particles. Till now its presence is confirmed in vast range of organisms belonging to bacteria, protozoa, plants, fungi and animals. Recent studies show a large number of roles played by this small molecule. They vary from protective role in intracellular metabolism to involvement in photoperiodism and circadian behaviour and all this only among vertebrates. Those facts rise question about processes which lead to such diversity. We looked into the model of evolution of melatonin functions proposed by HARDELAND and POEGGELER (2003). Authors suggest protective role in cell metabolism as free radical scavenger and antioxidant as the preliminary function of melatonin. Its relevance rose in cooperation with increasing concentration of oxygen both in cell and in environment (as a result of development of photosynthesis and mitochondria). As the photosynthesis is a circadian process concentration of oxygen in early atmosphere could also varied with circadian rhythm what could in turn cause rhythmic demand for antioxidant action. This process would later lead to endogenous circadian oscillation of melatonin

concentration triggered by light what resulted in involvement in photoperiodically regulated actions. We confronted the proposed model with results of melatonin-linked studies held on invertebrates – a polyphyletic taxon which presents many types of organisms physiology and morphology. In some cases research teams found multilevel involvement of melatonin in biology of investigated species. On the contrary to vertebrates, invertebrates show not only day-peak pattern of melatonin circadian concentration. Also night peaks and lack of rhythm were observed even in closely related species (e.g. Decapoda). Correlation between presence of exogenous melatonin and circadian behaviour modification was also shown in a few species. In spite of limited data and not large number of species investigated we can conclude that the model fits available data pretty well. Interesting conclusion of this review is that the new function of melatonin does not replace the older one, only develops in parallel. The natural selection process does not create a new attribute in response to environment challenge, it only adopts one of existing features of organisms.

### LITERATURA

- ABRAN D., ANCTIL M., ALI M. A., 1994. *Melatonin activity rhythms in eyes and cerebral ganglia of Aphysia Californica*. Gen. Comp. Endocrinology 96, 215–222.
- AGAPITO M., HERRERO B., PABLOS M. I., MIGUEL J. L., RECIO J. M., 1995. *Circadian rhythms of melatonin and N-acetyltransferase activity in Procambarus clarkii*. Comp. Biochem. Physiol. 112A, 179–185.
- ARNOULT F., VERNET G., 1995. *Inhibition of regeneration by melatonin in nemertine worm of the genus Lineus*. Comp. Biochem. Physiol. 110A, 319–328.
- ARNOULT F., VIVIEN-ROELS B., VERNET G., 1994. *Melatonin in nemertine worm Lineus lacteus, identification of daily variations*. Biol. Signals 3, 296–301.
- BALZER I., HARDELAND R., 1991. *Photoperiodism and Effects of Indoleamines in a Unicellular Alga, Gonyaulax polyedra*. Science 253, 795–797.
- BALZER I., HARDELAND R., 1997. *Daily variations of immunoreactive melatonin in the visual system of cry fish*. Biol. Cell 89, 539–543.
- BEMBENEK J., SEHADOVA H., ICHIHARA N., TAKEDA M., 2005. *Day/night fluctuations in melatonin content, arylalkylamine N-acetyltransferase activity and NAT mRNA expression in the CNS, peripheral tissues and hemolymph of the cockroach, Periplaneta americana*. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 140, 27–36.
- BLANC A., VIVIEN-ROELS B., PÉVET P., ATTIA J., BUISSON B., 2003. *Melatonin and 5-methoxytryptofanol (5-ML) in nervous and/or neurosensory structures of a gastropod mollusca (Helix aspersa maxima); synthesis and diurnal rhythms*. Gen. Comp. Endocrinol. 131, 168–175.
- GAO N., HARDIE J., 1997. *Melatonin and the Pea Aphid, Acyrthosiphon pisum*. J. Insect Physiol. 43, 615–620.
- HARDELAND R., POEGGELER B., 2003. *Non-vertebrate melatonin*. J. Pineal Res. 34, 233–241.
- HUYBRECHTS J., DE LOOF A., SCHOOF L., 2005. *Melatonin-induced neuropeptide release from isolated locust corpora cardiaca*. Peptides 26, 73–80.
- ITOH M. T., SUMI Y., 1998. *Melatonin and serotonin N-acetyltransferase activity in developing eggs of cricket Gryllus bimaculatus*. Brain Res. 781, 91–99.
- ITOH M. T., HATTORI A., SUMI Y., SUZUKI T., 1995a. *Day-night changes in melatonin levels in different organs of the cricket (Gryllus bimaculatus)*. J. Pineal Res. 18, 165–169.



- ITOH M. T., HATTORI A., NOMURA T., SUMI Y., SUZUKI T., 1995b. *Melatonin and arylalkylamine N-acetyltransferase activity in the silkworm, Bombyx mori*. Mol. Cell Endocrinol. 115, 59–64.
- ITOH M. T., SHINOZAWA T., SUMI Y., 1999. *Circadian rhythms of melatonin-synthesizing enzyme activities and melatonin levels in planarians*. Brain Res. 830, 165–173.
- LERNER A. B., CASE J. D., TAKAKASHI Y., LEE T. H., MORI W., 1958. *Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes*. J. Am. Chem. Soc. 80, 2587.
- MCCORD C. P., ALLEN F. P., 1917 *Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation*. J. Exp. Zool. 23:207–214.
- MECHAWAR N., ANCTIL M., 1997. *Melatonin in a primitive metazoan, Seasonal changes of levels and immunohistochemical visualization in neurons*. J. Comp. Neurol. 387, 243–254.
- MORITA M., HALL F., BEST J. B., GERN W., 1987. *Photoperiodic modulation of cephalic melatonin in planarians*. J. Exp. Zool. 241, 383–388.
- PANDI-PERUMAL S. R., SRINIVASAN V., MAESTRONI G. J. M., CARDINALI D. P., POEGGELER B., HARDELAND R., 2006. *Nature's most versatile biological signal? FEBS J. 276, 2813–2838*.
- TAKEDA M., WESTROM W., HAMIL A., GOLDMAN B., 1985. *Neuropeptide and monoamine immunoreactivity of the circadian pacemaker in Periplaneta*. Biomed. Res. 6, 395–406.
- TILDEN A. R., RASMUSSEN P., AWANTANG R. M., FURLAN S., GOLDSTEIN J., PALSGROVE M., SAUER A., 1997. *Melatonin cycle in the fiddler crab Uca pugilator and influence of melatonin on limb regeneration*. J. Pineal Res. 23, 142–147.
- TILDEN A. R., ALT J., BRUMMER K., GROTH R., HERWIG K., WILSON A., WILSON S., 2001. *Influence of photoperiod on N-acetyltransferase activity and melatonin in the fiddler crab Uca pugilator*. Gen. Comp. Endocrinol. 122, 233–237.
- TILDEN A. R., BRAUCH R., BALL R., JANZE A. M., GHAFARI A. H., SWEENEY C. T., YUREK C. J., COOPER R. L., 2003. *Modulatory effects of melatonin on behavior, hemolymph metabolites, and neurotransmitter release in crayfish*. Brain Res. 992, 252–262.
- VIVIEN-ROELS B., PEVET P., 1986. *Is melatonin an evolutionary conservative molecule involved in the transduction of photoperiodic information in all living organisms?* Adv. Pineal Res. 1, 153–157.
- VIVIEN-ROELS B., PEVET P., 1993. *Melatonin, presence and formation in invertebrates*. Experientia 49, 642–647.
- VIVIEN-ROELS B., PÉVET P., BECK O., FÈVRE-MONTAGNE M., 1984. *Identification of melatonin in the compound eye of an insect, the locust (Locusta migratoria), by radioimmunoassay and gas-chromatography-mass spectrometry*. Neurosci. 49, 153–157.
- WETTERBERG L., HAYES D. K., HALBERG F., 1987. *Circadian rhythms of melatonin in the brain of the face fly, Musca autumnalis*. De Geer Chronobiologia 14, 377–381.
- WITHYACHUMNARNKUL B., BUPPANINOJ K., PONGSA-ASAWAPAIBOOM A., 1992. *N-acetyltransferase and melatonin levels in the optic lobe of the giant freshwater prawns, Macrobrachium rosenbergii de Man*. Comp. Biochem. Physiol. 102A, 703–707.
- WITHYACHUMNARNKUL B., PONGTIPPEE P., AJPRU S., 1995. *N-acetyltransferase, hydroxyindole-O-methyltransferase and melatonin in the optic lobes of the giant tiger shrimp Penaeus monodon*. J. Pineal Res. 18, 217–221.
- WITHYACHUMNARNKUL B., RACHAWONG S., PONGSA-ASAWAPAIBOOM A., SUMRIDTHONG A., 1999. *Sexual dimorphism in N-acetyltransferase and melatonin levels in the giant freshwater prawn Macrobrachium rosenbergii de Man*. J. Pineal Res. 26, 174–177.
- YAMAMOTO H., WATARI Y., ARAI T., TAKEDA M., 2001. *Melatonin in drinking water influences a circadian rhythm of locomotor activity in the house cricket, Acheta domesticus*. J. Insect Physiol. 47, 943–949.
- YOSHIZAWA Y., WKABAYASHI K., SHINOZAWA T., 1991. *Inhibition of planarian regeneration by melatonin*. Hydrobiologia 227, 31–40.