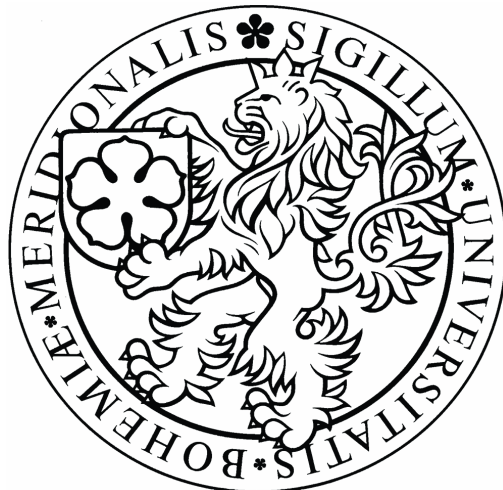


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



ROLE SÍTNICE HOLUBA
SKALNÍHO *Columba livia*
V MAGNETORECEPCI

Adam Bajgar

České Budějovice 2008

Školitel: Mgr. Pavel Němec, PhD.

Bajgar A., 2008: Role sítnice holuba skalního *Columba livia* v magnetorecepci. [Function of retina of Homing pigeon *Columba livia* in magnetoreception. Master Thesis, in Czech.]– p.53, Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic (bajgaradam@seznam.cz).

Vypracoval: Adam Bajgar

Vedoucí práce: Mgr. Pavel Němec, PhD.

Garant: Mgr. Radim Šumbera, PhD.

Školitel specialista: Doc. RNDr. Ivo Šauman, PhD.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské – diplomové – rigorózní - disertační práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Prohlašuji, že jsem uvedenou práci vypracoval samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích, dne

.....

ANNOTATION

Many animals have ability to perceive the magnetic field of the Earth and use this clue for both orientation and navigation. Yet little is known about physiological mechanism that underlies this sensory ability. Although physiological mechanism still remains unclear, there are three major hypotheses how animals can detect the magnetic field.

In this study I focused on the radical pair theory. I analyzed how manipulation of the ambient magnetic field influence the expression of CRY 1, CRY 2 and c-Fos in the pigeon's retina. I observed increased numbers of CRY1, c-Fos and CRY1+c-Fos positive cells in the inner nuclear layer (INL) of the retina in animals subjected to the periodical manipulation of the magnetic field inclination. These data demonstrate that the INL contains a population of neurons that are responsive to magnetic stimuli and strongly suggest that Cry 1 is involved in detection of the Earth magnetic field.

PODĚKOVÁNÍ:

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli Pavlu Němcovi za to, že mi umožnil pracovat na tak zajímavém projektu, mou práci finančně zajistil ze svého grantu a po celou dobu řešení této práce byl připraven pomoci mi řešit všechny problémy.

Také bych rád poděkoval Radimu Šumberovi za projevenou důvěru, když byl ochoten zaštitit mou práci (se školitelem z Karlovi univerzity v Praze) na Jihočeské univerzitě.

V neposlední řadě patří můj obrovský dík Ivo Šaumanovi a celému kolektivu přidružené laboratoře za možnost v této laboratoři pracovat, jejich ochotu mi vždy poradit a za jejich velmi vřelé přijetí.

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
Seznam použitých zkratk.....	6
1.1 MAGNETICKÉ POLE ZEMĚ.....	7
1.1.1 Inklinace.....	8
1.1.2 Deklinace.....	8
1.1.3 Specifické místo.....	8
1.1.4 Kompasová směrová orientace.....	8
1.1.5 Navigace.....	9
1.1.6 Rozpoznání specifického místa.....	9
1.2 FYZIOLOGIE MAGNETICKÉHO SMYSLU.....	10
1.2.1 Elektromagnetická indukce.....	10
1.2.2 Magnetorecepce založená na magnetitových mikročásticích.....	10
1.2.3 Chemická magnetorecepce.....	12
1.3 ROLE SÍTNICE A KRYPTOCHROMU V MAGNETORECEPCI.....	14
1.4 JINÉ FUNKCE KRYPTOCHROMU U OBRATLOVCŮ	15
1.5 CÍLE PRÁCE.....	17
2. METODY.....	18
2.1 MAGNETICKÁ STIMULACE.....	18
2.2 IMUNOCYTOCHEMIE.....	19
2.3 PROTOKOL POUŽITÉHO BARVENÍ.....	20
2.4 ANALÝZA DAT.....	20
3. VÝSLEDKY.....	22
3.1 LOKALIZACE KRYPTOCHROMŮ V SÍTNICI.....	24
3.2 VNITROBUNĚČNÁ LOKALIZACE.....	26
3.3 SROVNÁNÍ SÍTNIC EXP. A KONT. JEDINCŮ.....	28
3.3.1 Srovnatelnost sítnic.....	28
3.3.2 Srovnání v počtu pozitivních buněk v INL.....	30
CRY1 v INL.....	30
CRY2 v INL.....	30
c-Fos v INL.....	32
CRY1 + c-Fos v INL.....	32
3.3.3 Srovnání v počtu pozitivních buněk v GCL.....	34
CRY1 v GCL.....	34
CRY2 v GCL.....	34
c-Fos v GCL.....	36
CRY1 + c-Fos v GCL.....	36
3.4 SHRNU TÍ VÝSLEDKŮ.....	38
4. DISKUSE.....	39
4.1 LOKALIZACE KRYPTOCHROMŮ A c-Fosu V SÍTNICI.....	39
4.2 VNITROBUNĚČNÁ LOKALIZACE KRYPTOCHROMŮ.....	41
4.3 DISTRIBUCE POSITIVNÍCH BUNĚK V RÁMCI SÍTNICE.....	41
4.4 SROVNÁNÍ SÍTNIC EXP. A KONT. JEDINCŮ.....	42
4.5 TEORIE RADIKÁLOVÝCH PÁRŮ.....	44
4.6 NA SVĚTLE ZÁVISLÁ MAGNETORECEPCE.....	44
4.7 SMĚŘOVÁNÍ DALŠÍHO VÝZKUMU.....	45
5. LITERATURA.....	46
6. PŘÍLOHY.....	51

1. ÚVOD

Přijímání informací o vnějším prostředí je jednou ze základních charakteristik živých organismů. Organismům to umožňuje registrovat změny prostředí a adekvátně na ně také reagovat.

Výzkum smyslů a smyslového vnímání je pro člověka velmi důležitý, protože mu pomáhá pochopit, jak vzniká obraz vnějšího světa a také to, že je tento obraz velmi často dosti rozdílný a subjektivní.

Velmi důležitým pro pochopení této problematiky se stalo zjištění, že zvířecí smysly jsou často mnohem citlivější než lidské a tudíž podněty, které jsou zvířata schopna zachytit a hodnotit jsou za hranicí lidských možností. Nejde přitom jen o posouvání prahů citlivosti u pěti lidských smyslů, ale o objevy smyslů naprosto nových, pro člověka často těžko představitelných a pochopitelných. Mezi takové smysly se řadí například vnímání infračerveného záření, elektrický smysl a magnetický smysl.

Na poslední zmíněný – magnetický smysl – je v posledních letech soustředěna relativně velká pozornost a v jeho fyziologii bylo učiněno mnoho pokroků.

Já jsem se ve své práci zaměřil na jeden konkrétní typ magnetického smyslu (na světlo závislý typ magnetorecepce) a pokusil jsem se objasnit, jaké struktury a receptory mohou být zodpovědné za vnímání magnetického pole země. K tomu jsem použil kombinaci behaviorálních experimentů s imunohistochemickou analýzou tkání experimentálních zvířat.

Pro zjednodušení a větší srozumitelnost textu jsem použil zkratky pro často opakované pojmy:

INL – inner nuclear layer – vnitřní jaderná vrstva

GCL – ganglion cell layer – vrstva gangliových buněk

CRY1 – cryptochrome 1 – kryptochrom 1

CRY2 – cryptochrome 2 – kryptochrom 2

c-Fos – marker neuronální aktivity

IS/OS – inner/outer segments – vnitřní a vnější segmenty fotoreceptorů

IPL - inner plexiform layer – vnitřní plexiformní vrstva

ONFL – optic nerve fibre layer – vnější jaderná vrstva

Magnetický smysl – schopnost reagovat na magnetické pole země – byl prokázán u široké škály organismů. Od pasivní magnetotaxe u magnetotaktických bakterií (Blakemore 1975) až k aktivní orientaci magnetickým smyslem u ptáků a savců (Wiltschko et Wiltschko 1972, Burda et al. 1990).

Magnetorecepce byla prokázána u řady živočišných druhů, a to především u měkkýšů, členovců a zástupců všech hlavních tříd obratlovců (Wiltschko et Wiltschko 2005).

Chceme-li zkoumat magnetický smysl, musíme nejprve zjistit jaké informace magnetické pole země vůbec poskytuje a které z těchto informací jsou organismy schopny využít (Dusenbery 1992).

1.1 MAGNETICKÉ POLE ZEMĚ

Současné poznatky o magnetickém poli země přinesla až moderní fyzika a vývoj speciální velmi citlivé techniky. Magnetické indukční čáry jsou všudypřítomné a nezávislé na denní době, jsou tedy velmi dobrým zdrojem informací i za takových podmínek, kdy nejsou použitelná jiná orientační vodítka (Dusenbery 1992).

Kde se ale magnetické pole země bere? Země se chová jako velký dipólový magnet, který kolem sebe vytváří relativně slabé pole siločar. Magnetické pole je vyvoláno pohybem žhavého magmatu kolem jádra Země. Magma je složeno především z niklu a železa, a proto jeho pohyb vytváří elektromagnetické pole. Magnetické pole země je přirozeně poměrně slabé a pohybuje se v rozmezí od 30 000 nT [nanoTesla] na rovníku po 65 000 nT na pólech Campbell (2001). Síla magnetického pole se zmenšuje s druhou mocninou vzdálenosti od jeho zdroje. Na magnetické pole má vliv spousta vnějších činitelů, kteří ho různě modelují. Mezi hlavní vlivy patří magnetické bouře na slunci, cykly magnetické aktivity slunce (každých 11 let), pohyb nabitých částic v mořských a vzdušných proudech, magnetické horniny na Zemském povrchu, kosmické proudy a v neposlední řadě také člověk a jeho magnetoelektrické emise.

Magnetické pole země prochází také periodickými změnami. Mezi hlavní změny patří přepólování Země (změna směru toku indukčních čar), nebo periodické výkyvy v březnu a v září - v období rovnodennosti (je to způsobeno polohou zemské osy ke slunci) (Campbell 2001).

Magnetické pole může sloužit jako velmi dobrý zdroj informací o poloze jedince a směru jeho cesty (Wiltschko et Wiltschko 2005). Bylo prokázáno, že zvířata jsou schopna zpracovávat především tyto informace: inklinaci, deklinaci a specifické místo (sign post).

1.1.1 Inklinace

Proud siločar vstupuje do zemského povrchu na severním magnetickém pólu a vystupuje magnetickým jižním pólem. S rostoucí zeměpisnou šířkou roste také úhel siločar, který svírají s povrchem země. Tomuto sklonu říkáme inklinace. Inklinaci lze definovat jako úhel sevřený vektorem magnetického pole a horizontální rovinou. Vektor magnetického pole lze rozložit do dvou komponent magnetického pole, složky vertikální a horizontální (Campbell 2001). Jednoduše řečeno, se mění úhel siločar směřujících k povrchu Země. Na rovníku je tento úhel roven 0° , v naší zeměpisné šířce se pohybuje okolo 65° a na pólech je 90° na severním a -90° na jižním. Některá zvířata jsou proto schopna určit jakým směrem je pól a jestli se vyskytují severněji, nebo jižněji od místa, kam se chtějí dostat (Wiltschko et Wiltschko 2005).

1.1.2 Deklinace

K pochopení deklinace si musíme uvědomit, že magnetické a geografické póly nejsou totožné. Živočichové jsou schopni si uvědomovat a měřit tento rozdíl. Tento úhel mezi směry k magnetickému a geografickému pólu se nazývá deklinace (Wiltschko et Wiltschko 2005).

1.1.3 Specifické místo (sign post)

Za specifické místo je považována taková kombinace globálního magnetického pole a lokálních vlivů, které si živočich pamatuje a specificky ho rozpoznává. Na takovém místě dostane živočich informaci (povel), na který specificky zareaguje (Beck et Wiltschko 1988 in Wiltschko et Wiltschko 2005). Využívání této informace bylo prokázáno u ptáků (Wiltschko et Wiltschko 1992) a mořských želv (Lohmann et Lohmann 1994).

Různé živočišné druhy využívají informace z magnetického pole k různým úkonům. Můžeme je rozdělit na kompasovou směrovou orientaci, mapový navigační smysl a rozpoznání specifického místa.

1.1.4 Kompasová směrová orientace

Za kompasovou směrovou orientaci se považuje schopnost určit pouze směr, kterým má živočich cestovat. Živočichové jsou schopni určit, kterým směrem se od nich nachází pól. Z behaviorálních experimentů vyplývá, že schopnost kompasové orientace je založena na dvou různých mechanismech. První typ kompasové orientace je založen na měření inklinace indukčních čar magnetického pole – inklinací kompas. Tento typ orientace se vyskytuje

například u ptáků (Wiltschko et Wiltschko 1992), želv (Lohmann et Lohmann 1992) a obojživelníků (Phillips et Borland 1994). Pro inklinální typ magnetorecepce je charakteristické, že zvířata poznají jen směrují-li k pólu či od něj, ale nejsou schopna pomocí tohoto smyslu rozlišit, jestli se pohybují k pólu severnímu či jižnímu.

Druhý typ kompasu je kompas polaritní. Vyskytuje se například u lososů (Quin et Brannon 1982) a některých hlodavců (Marhold et al. 1997) a je typický tím, že tato zvířata jsou schopna zjistit směr k pólu a rozlišit, směrují-li k severnímu či jižnímu pólu.

1.1.5 Navigace

Navigace je definována jako schopnost jedince vrátit se na původní místo poté, co byl odvezen a vypuštěn na jiném místě. Za magnetickou navigaci se považuje schopnost orientovat se v prostoru pomocí kompasu a mapy vytvořené z magnetického pole země. K navigaci musí živočich znát svojí přesnou polohu a přesnou polohu místa, kam se chce dostat (Phillips et al. 2006). Severo-jihní gradient je poměrně dobře určitelný pomocí inklinace a intenzity magnetického pole, zatímco pro zaměření v západo východní škále zatím neexistuje uspokojivé vysvětlení. Je možné, že k tomu živočichové používají lokální mapu vytvořenou z magnetického pole země a dalších sil a vlivů, které magnetické pole ovlivňují. Magnetická navigace byla prokázána u holuba (Fisher et al. 2003 v Wiltschko et Wiltschko 2005) ale i u dalších ptáků (Wiltschko et Wiltschko 1995). Kromě ptáků používají navigaci také langusty (Boles et Lohman 2003), karety (Lohmann et al 2004) a ocasatí obojživelníci (Fisher et al. 2001, Phillips et al. 2002).

1.1.6 Rozpoznání specifického místa

Zvířata jsou schopna rozpoznat konkrétní místo na zemském povrchu. Toto místo je charakterizováno specifickými hodnotami intenzity magnetického pole a inklinace indukčních čar. Jedinci mají tyto specifické podmínky zafixované a jejich splnění je často spojeno s behaviorálními či fyziologickými projevy. Tímto projevem může být změna směru migrace (mořské želvy, *Caretta caretta* – Lohmann et Lohmann 1994, tažní ptáci, *Ficedula hypoleuca*, *Sylvia borin* - Beck et Wiltschko 1998 ve Wiltschko et Wiltschko 2005), nebo například jiné potravní chování či větší ukládání zásob (slavík tmavý, *Luscinia luscinia* - Fransson et al. 2001).

1.2 FYZIOLOGIE MAGNETICKÉHO SMYSLU

Z výše zmíněných behaviorálních experimentů vyplývá, že magnetický smysl pravděpodobně funguje na dvou zcela odlišných principech a že každý z těchto mechanismů je schopen získat z magnetického pole jen určitou informaci. Jen velmi obtížně si lze představit jeden receptor, který by byl schopen vnímat jemné nuance v intenzitě magnetického pole a zároveň by byl schopen zprostředkovávat informace o orientaci magnetického pole (Wiltschko et Wiltschko 2005). Navíc i dva typy magnetického kompasu (inklinační, polaritní) naznačují existenci minimálně dvou mechanismů magnetorecepce. Na základě těchto poznatků byly vytvořeny tři principy, na nichž by mohl magnetický smysl fungovat. Jsou to tyto teorie: elektromagnetická indukce, magnetorecepce založená na feromagnetických částicích a chemická magnetorecepce.

1.2.1 Elektromagnetická indukce

Indukční mechanismus vnímání magnetického pole je omezen pouze na mořské organismy. Byl zkoumán u příčnoústých ryb, u nichž je známa existence lorenziniho ampulí. Tyto orgány jsou dostatečně citlivé na to, aby mohli vnímat jemné změny v magnetickém poli země (Lohmann et Johnsen 2000). K jejich správné funkci však musí být okolní medium dostatečně vodivé, což splňuje pouze mořská voda, a proto je tento model pro suchozemské a sladkovodní živočichy nevyhovující. Murray (1962) dokázal, že když rejnoci plují různými směry, tak překračují siločáry magnetického pole pod různými úhly, což vyvolává rozdílné náboje v jejich lorenziniho ampulích. S tím však nesouhlasí Paulin (1995), který namítá, že mořské proudy (masa pohybujících se nabitých částic) vytváří samy o sobě magnetické pole a příliš silně a neprediktabilně ovlivňují magnetické pole země. Dále ale uvádí, že by bylo možné tento vliv odfiltrovat při pohybu jedince určitým směrem. Stále však chybí přímý důkaz, že by příčnoústí využívali schopnost magnetorecepce k orientaci (Johnsen et Lohmann 2005).

1.2.2 Magnetorecepce založená na magnetitových mikročásticích

Po zjištění, že zvířata jsou schopna vnímat magnetické pole země, se objevilo hned několik teorií vysvětlujících mechanismus tohoto děje. Mezi prvními byla existence feromagnetických částic, které by byly schopné reagovat na jemné změny magnetického pole Země (Kirschvink et al. 2001). Tato teorie byla nejprve odmítána, protože nebyl znám žádný živočich obsahující feromagnetický materiál (Griffin 1944 v Kirschvink et al. 2001), ale

s rozvojem techniky a dalším výzkumem byly feromagnetické částice objeveny u řady živočichů (Kirschvink et Gould 1981). Dnes je již známa celá řada organismů od bakterií k obratlovcům, kteří obsahují částice biogenního magnetitu (Gould et al. 1978, Walcott et al. 1979) a následné studie přinesly další důkazy podporující tuto teorii.

Magnetické částice jsou většinou z magnetitu (Fe_3O_4), nebo greigitu (Fe_3S_4), což jsou molekuly silně magnetických materiálů vytvářejících krystaly (Kirschvink et al. 2001).

U bakterií byla pozorována pasivní orientace v magnetickém poli. Krystalky jednodoménoého magnetitu v bakteriích vytvářejí dlouhé řetězce, jejichž magnetický moment má dostatečnou sílu k pootočení bakterie do určité polohy (Schuler et Frankel 1999). Řetězec jednodoménoých krystalů magnetitu je možno zmagnetizovat jen ve směru osy tohoto řetězce, a proto může jistým způsobem fungovat jako kompas (Kirschvink et al. 2001). Tento efekt lze zvrátit silným magnetickým impulsem (Kirschvink et Kobayashi-Kirschvink 1991). Tento puls je hojně využíván jako rušící faktor u behaviorálních experimentů (přehled uvádí např. Johnsen et Lohmann 2005). Magnetorecepce závislá na magnetitu byla zkoumána hlavně na včelách, ptácích, želvách a rybách, což přineslo možnosti srovnávat fungování tohoto smyslu mezi širokou škálou organismů.

Získané poznatky o magnetoreceptci založené na magnetitu umožnily zkoumat, které části nervové tkáně zpracovávají informace z magnetického smyslu. U ryb a ptáků bylo prokázáno zapojení trojklanného nervu (Semm et Beason 1990, Walker et al. 1997). U ptáků bylo prokázáno zapojení horní části zobáku, inervované také trojklanným nervem. Supraparamagnetické krystaly zde byly objeveny přímo v nervových buňkách v poloze podél buněčné membrány (Fleissner et al. 2003). Výše zmíněné elektrofyziologické experimenty byly v souladu s výsledky získanými operativním přerušením trojklanného nervu experimentálních zvířat. Tento zásah holubům znemožnil registrovat jemné změny magnetického pole (Mora et al. 2004). Magnetické krystaly objevené u holubů mají vlastnosti superparamagnetických krystalů (Hanzlík et al. 2000), což holubům umožňuje reagovat na změny magnetického pole o síle jen 0,5% přirozeného magnetického pole Země (Beason et Semm 1996). Obecně převládá názor, že to holubům umožňuje vytvářet magnetické mapy potřebné k navigaci (Wiltschko et Wiltschko 2005). Další anatomické studie za použití elektronového mikroskopu charakterizovaly magnetitové řetězce u lososovitých ryb. Tyto řetězce byly 10- 12 μm dlouhé a byly lokalizované u bazální laminy čichového epitelu. Poloha řetězců poblíž bazální laminy ukazuje na pravděpodobnou mechanickou funkci (Walker et al. 1997). Transdukce signálu proto pravděpodobně funguje tak, že magnetické řetězce mění přímo membránové potenciály buněk otevřením mechanicky ovládaného

membránového kanálu (Kirchvink et Gould 1981, Kirschvink et al. 2001). Jiným diskutovaným způsobem transdukce signálu může být tlak na sekundární mechanoreceptor (Johnsen et Lohmann 2005).

Johnsen a Lohmann (2005) z výše uvedených skutečností vyvozují, že se magnetický smysl vyvinul z jednoho ancestrálního typu do mnoha podob, které hrají rozdílné úlohy u různých organismů. U živočichů tedy zřejmě existují dva různé funkční mechanismy na magnetitu založené magnetorecepce (Johnsen et Lohmann 2005). Autoři dále diskutují, že polaritní i inkliniční kompas mohou být založeny na těchto typech (polaritní - magnetické řetězce, inkliniční – superparamagnetické krystaly) magnetorecepce. Nemusí tedy jít o chemickou magnetorepcepci, kterou existenci dvou typů polaritních kompasů vysvětlují jiní autoři (Ritz et al. 2000, Wiltschko et Wiltschko 2005 a další).

1.2.3 Chemická magnetorecepce

Fyziologie této teorie vychází z existence určité chemické reakce, jejíž průběh by byl ovlivnitelný magnetickým polem země. Vzhledem k tomu, že magnetické pole země je velmi slabé (30-60 μT), je velice obtížné najít v živých organismech nějaké molekuly a reakce, které by na tak jemný podnět reagovaly (Ritz et al. 2000). Pro tento typ magnetorecepce byly navrženy tři možné reakce. První navrhl reakci Leask (1977), který se domníval, že by mohlo jít o radiofrekvenční resonanci založenou na tripletovém stavu rodopsinu. Druhou teorii formuloval Hong (1995), který dokázal reaktivitu rhodopsinu na magnetické pole, ale jen při 1000 krát větší intenzitě, než jaká se vyskytuje v přirozených podmínkách. Poslední teorie vzešla od Schultena a kol. (1978), kteří navrhli hypotézu radikálových párů. Tuto hypotézu později detailně rozpracoval Ritz a kol. (2000) tak, aby vyhovovala přirozeným podmínkám magnetického pole země.

Teorie radikálových párů předpokládá existenci specifického ftopigmentu, který absorbuje energii fotonu a je touto energií nabuzen do excitovaného stavu. Teprve v tomto excitovaném stavu molekula vytváří radikálové páry a stává se receptivní na vlivy magnetického pole. Následně může dojít k předání elektronů mezi donorovou a akceptorovou molekulou, jejímž výsledkem může být singletový, nebo tripletový produkt. Tyto dva produkty mohou plynule přecházet jeden ve druhý, což se nazývá singlet-tripletová interkonverze. Magnetické pole ovlivňuje výtěžek těchto dvou produktů, protože magnetické pole Země výrazně ovlivňuje singlet-tripletovou interkonverzi (Schulten et al. 1978, Obr. 1).

Tato teorie velmi dobře zapadá do poznatků získaných z behaviorálních experimentů, které byly provedeny především na ptácích. Jak z teorie vyplývá, musí být její součástí

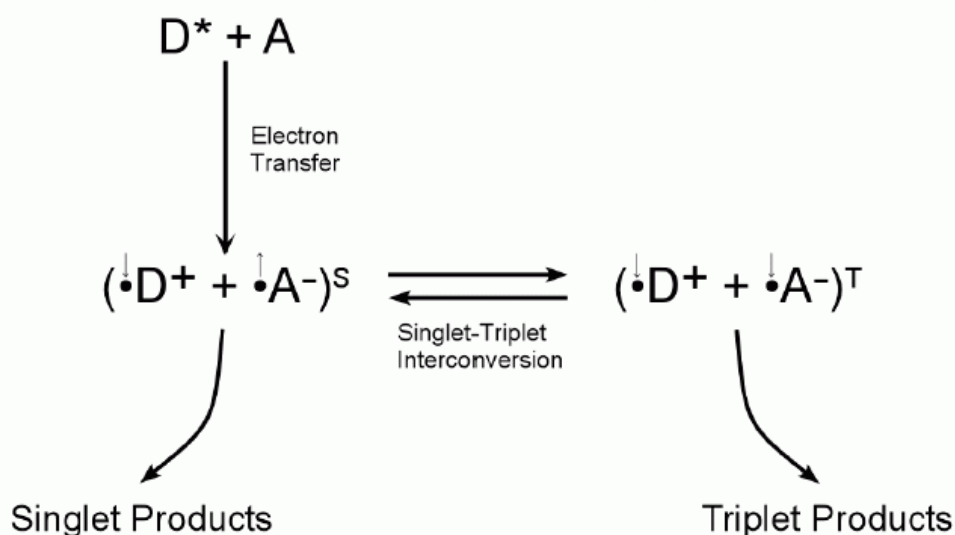
fotoreceptivní molekula, přinášející do reakce potřebnou energii. Wiltschko a Wiltschko (1981) jako první ukázali vliv světla na magnetický kompas ptáků. Potřeba světla k magnetorecepci byla následně prokázána i u obojživelníků (Phillips et Borland 1992) a mořských želv (Lohmann et Lohmann 1993). Také neurofyziologické experimenty přinesly výsledky, které byly závislé na přítomnosti světla (Semm et Demaine 1986, Semm et al. 1984). Fotoreceptivní molekula však byla stále neznámá. K jejímu odhalení přispěly až další experimenty zkoumající v jakém světle (o jaké vlnové délce) bude magnetorecepce fungovat. Z těchto experimentů vyplývá, že nejvhodnější je modré až modro-zelené světlo oproti žluto-červenému, v němž jsou ptáci desorientováni (Wiltschko et Wiltschko 2002), zatímco obojživelníci mají odchylku v kompasové orientaci o 90° (Deutschlander et al. 1999).

Průlomový objev pro teorii radikálových párů (pro původní verzi Schultena a kol. 1978) byl objev kryptochromu u savců (Todo et al. 1996) a následně i u dalších obratlovců (Miyamoto et Sancar 1998 – opět savci, Haque et al. 2002 – u ptáků). Kryptochrom velmi dobře splňuje požadavky teorie radikálových párů. Je to fotoreceptivní molekula s absorpčním maximem v oblasti modrého světla, která může tvořit radikálové páry (Giovani et al 2003). Ritz se svými kolegy (2000) ve své práci velmi detailně rozebírá teorii radikálových párů, vytváří jednoduchý matematický model ze kterého lze vyvodit další požadavky na radikálové páry. Dokazuje, že radikálové páry jsou dostatečně citlivé k tomu, aby mohli reagovat na změny polohy receptoru v magnetickém poli země (také Eveson et al 2000) a navrhuje kryptochromy jako fotoreceptory radikálové reakce. Autoři (Ritz et al. 2000) dále diskutují důležitost životnosti radikálových párů, které musí vydržet déle než 100ns na to, aby mohly být ovlivněny magnetickým polem. Tuto podmínku také kryptochromové radikálové páry splňují (Batcheler et al 1993)

Další velmi přesvědčivé důkazy podporující teorii radikálových párů přinesla možnost ovlivnit singlet-tripletovou interkonverzi pomocí radiových vln o určité frekvenci (Cashmore et al. 1999). To bylo také využito při behaviorálních experimentech, ve kterých byla pomocí radiových vln rušena schopnost orientace ptáků v magnetickém poli. (Ritz et al. 2004).

Z hlediska vysvětlení mechanismu na světle závislé magnetorecepce je velmi důležité určit místo, kde dochází k primární transdukcii magnetické informace v elektrický signál. Z informací z behaviorálních experimentů a z teoretických studií můžeme usuzovat na lokalizaci receptoru. Podmínkami je dostatečný přístup světla, spojení s nervovou soustavou, specifické sférické rozmístění receptorů, aby receptory mohly zachycovat velkou variabilitu ve směru magnetických siločar a orientace receptorů ke směru pohybu (Ritz et al. 2000).

U obojživelníků bylo prokázáno zapojení pineálního orgánu, který splňuje tyto podmínky (Deutschlander et al. 1999), ale u ptáků magnetorecepce fungovala i po disekci pineálního orgánu (Schneider et al. 1994). Výše zmíněným podmínkám ale také velmi dobře vyhovuje oko (Ritz et al. 2000). K tomu také přispěly behaviorální experimenty u ptáků (Wiltschko et al. 1995), které navíc naznačují velmi silnou lateralizaci tohoto smyslu jen do pravého oka (Wiltschko et al. 2002, Prior et al. 2004). Další fyziologické experimenty však lateralizaci na úrovni oka nepotvrdily (Mouritsen et al. 2004, Němec nepublikovaná data), ale mírná lateralizace byla potvrzena na úrovni mozku (Němec nepublikovaná data). Také sférický tvar oka je podle Ritze a kol. (2000) pro detekci magnetorecepce ideální. Neurofyziologické experimenty (Semm et al. 1986) naznačují, že fyziologická odpověď byla normální jen u zvířat s intaktní sítnicí a zrakovým nervem.



Obr.1 Schéma chemické reakce, kterou podle teorie radikálových párů může ovlivnit magnetické pole země. energii pro první reakci poskytuje vlnové záření, druhá reakce probíhá spontánně a je ovlivnitelná magnetickým polem. Převzato z Ritz et al. 2000.

1.3 ROLE SÍTNICE A KRYPTOCHROMU V MAGNETORECEPCI

Sítnice svými vlastnostmi velmi dobře vyhovuje požadavkům kladeným na možný magnetoreceptor, které vyplývají z teorie radikálových párů. Navíc po objevení kryptochromu u obratlovců mnohé práce potvrdily vysokou hladinu mRNA v tkáních sítnice a suprachiasmatickém jádru (Miyamoto et al. 1998, Kobayashi et al. 1998). Výskyt kryptochromu v sítnici se však vysvětloval jeho rolí v udržování cirkadiálních rytmů (viz. dále). U obratlovců se vyskytuje také více typů kryptochromů. Většinou jsou dva (CRY1, CRY2), ale například u ptáků byly zaznamenány až čtyři kryptochromy a u ryby *Danio rerio* (zebra fish) jich bylo objeveno dokonce šest (Kobayashi et al. 2000).

Möller a kol. (2004) popsali a geneticky definovali novou formu kryptochromu u tažných ptáků. Kryptochrom 1 rozdělují na CRY1a a CRY1b (produkty alternativního sestřihu stejného genu), přičemž CRY1b je pro tažné ptáky specifický. Tato variabilita typů kryptochromů ukazuje na jejich odlišné funkce (Kobayashi et al. 1998) a dává prostor úvahám o jejich zapojení v magnetorepci. V sítnici jsou kryptochromy přítomny v jiných vrstvách než jiné fotopigmenty a to ve vnitřní jaderné vrstvě (inner nuclear layer - INL) a vrstvě gangliových buněk (ganglion cell layer - GCL) (Thompson et al. 2003, Miamoto et Sancar 1998). Foster a kol. (1991) udává, že distribuce kryptochromu v sítnici je rovnoměrná v centrální i periferní části. Je také velmi zajímavé, že u savců je přibližně dvakrát více CRY2 než CRY1 na úrovni mRNA (Thompson et al. 2003). Thompson a kol. (2003) dále uvádějí, že pro příliš malé množství CRY1 v sítnici člověka se nepodařila jeho imunolokalizace, zatímco CRY2 se hojně nacházel v bunkách GCL a v některých buňkách INL. Rozdíly v množství kryptochromů mezi migrujícími a nemigrujícími ptáky testovali Mouritsen a kol. (2004), kteří poukazují na kryptochrom 1 jako na fotoreceptor vhodný pro magnetorepci. Ukazují také na velký rozdíl v expresi CRY1 mezi nemigrujícími a migrujícími ptáky. Podle této práce je v INL kryptochrom pozitivních asi 10-15%, zatímco v GCL jsou kryptochrom pozitivní takřka všechny buňky. Podobné výsledky uvádí i pro c-Fos (marker neuronální aktivity). C-Fos pozitivních buněk bylo podle Mouritsena a kol. (2004) v INL 5 %, zatímco v GCL byly pozitivní takřka všechny buňky. Zaznamenávají také kolokalizaci kryptochromu 1 s markery neuronální aktivity v displaced ganglion cells u migrujících ptáků, zatímco u nemigrujících ptáků nebyly tyto buňky aktivní. Tato práce však obsahuje některé údaje v rozporu s pracemi jiných autorů – viz diskuse.

Buněčná lokalizace kryptochromů může také naznačit hodně o jejich funkci. Mouritsen a kol. (2004) popisují, že CRY1 je cytosolický, zatímco CRY2 je jaderný, to se ovšem rozchází se závěry získanými jinými autory (Thompson et al. 2003, Sancar 2000), kteří popisují oba proteiny jako cytosolické s možností přejít do jádra.

1.4 JINÉ FUNKCE KRYPTOCHROMU U OBRATLOVCŮ

K tomu, abychom mohli pochopit funkci nějakého proteinu (v tomto případě kryptochromu) se musíme zabývat také jeho strukturou a rolí v jiných biologických dějích.

Kryptochromy jsou skupina proteinů blízce příbuzných fotolyázám, ale které již nemají schopnost opravovat DNA. Název kryptochrom vznikl jako slovní hříčka a to pro jeho důležitou funkci v rozmnožování kryptogamních rostlin a pro jeho skrytý a tajemný původ.

Krytochromy byly objeveny až dlouho poté, co byla předpovězena jejich existence. Tato předpověď vycházela z nutné existence ještě jiného fotopigmentu v oku, než jsou fotopigmenty odvozené od retinalu. Myši, které měly genetickou poruchu v metabolismu vitamínu A, od kterého jsou odvozeny opsiny, stále i přes nepřítomnost opsinů reagovaly na světlo a to obzvláště na modré světlo (Gressel 1979 v Sancar 2000). Z toho vyplývalo, že musí existovat ještě jiný neznámý fotopigment v obratlovčím oku.

Krytochromy se vyskytují u velmi široké škály organismů od bakterií až k člověku. Molekula krytochromu je typická tím, že obsahuje dva různé fotoaktivní pigmenty: FAD – flavinadenindinukleotid a MTHF – metenyltetrahydrofolát (Thompson et Sancar 2002). Absorpční spektrum krytochromu se nachází v rozmezí 360 – 420 nm (Emery et al. 1998). K aktivaci krytochromů, jako u jim příbuzných fotolyáz, dochází pomocí modrého světla až UV záření a aktivované krytochromy se podílí na řadě fyziologických dějů.

Roennenbegr a Foster (1997) jako první prokázali zapojení krytochromu do cirkadiálních cyklů obratlovců. V cirkadialitě obratlovců přitom hrají zcela odlišnou roli než u hmyzu. Zatímco u hmyzu pouze seřizuje endogenní cykly s vnější periodou, u obratlovců je přímo součástí zpětnovazebných smyček cirkadiální hodin (Stanewsky et al. 1998).

Vysoká exprese krytochromů v tkáních byla pozorována v sítnici, centrální nervové soustavě (hlavně v SCN – suprachiasmatic nucleus) (Miyamoto et Sancar 1998), ale také ve varlatech u myši (zatím nijak nevysvětleno) (Vitaterna et al. 1999). Je také důležité zmínit, že hladina krytochromu kolísá s periodou 24 hodin s maximem v nočních hodinách (pro přehled Miyamoto et Sancar 1998).

Někteří autoři usuzují na zapojení krytochromu u obratlovců také v dalších dějích, jako je pupilární reflex (Tu et al. 2004), či nevisuální percepce světla (Egan et al. 1999), ale tyto otázky nejsou definitivně rozřešeny. Nejrecentněji se uvažuje o vlivu cirkadiality a obzvláště krytochromu na rakovinu (hlavně na rakovinu prsu) (Gauger et Sancar 2005), ale k potvrzení role a vlivu krytochromu na rakovinu budou zapotřebí další experimenty.

Přestože výše uvedené experimenty a výsledky přináší velké množství zajímavých informací, fyziologie a molekulární podstata na světle závislého magnetického smyslu stále není zcela objasněna. Mezi autory zabývající se magnetickým smyslem, jsou stále autoři kteří pochybují a odmítají existenci na světle závislé magnetorecepce (Např. Kirschvink et al. 2001, Johnsen et Lohmann 2005, Walker et al 2002 a další). Také primární receptivní molekula a morfologické struktury, v nichž se nachází magnetický smysl, nejsou stále

spolehlivě určeny. Někteří autoři (Wiltschko et Wiltschko 2005, Ritz et al. 2000) proto navrhují zaměřit se nyní více na morfologické, fyziologické a molekulární experimenty.

Ve své práci se vydávám tímto směrem a s pomocí imunohistochemie chci charakterizovat, které anatomické struktury a molekuly jsou zodpovědné za percepci magnetického pole země.

1.5 CÍLE PRÁCE

1) Kvalitativně a kvantitativně charakterizovat expresi kryptochromu 1, kryptochromu 2 a indukovatelného transkripčního faktoru c-Fos v sítnici holuba skalního (*Columba livia*).

2) Porovnat expresi a míru kolokalizace výše zmíněných proteinů mezi kontrolními zvířaty vystavenými přirozenému magnetickému poli Země a experimentálními zvířaty vystavenými magnetickému poli, jehož inklinace byla periodicky manipulována.

2. METODY

Jako experimentální model byl využit holub skalní (*Columba livia*). Tento pták je vhodným modelem pro náš experiment z mnoha důvodů. Byl u něj prokázán velmi silně vyvinutý magnetický smysl, který holub využívá k orientaci (Wiltschko et Wiltschko 1978). Je klasickým modelem pro výzkum neurálních mechanismů magnetorecepce (Semm et al. 1984, Semm et Demaine 1986). Bylo prokázáno, že holubi mají na světle závislý typ magnetorecepce (Wiltschko et Wiltschko 1998), na který jsem se v práci zaměřil. Ohledně magnetorecepce je holub jedním z nejprozkoumanějších organismů (Wiltschko et Wiltschko 2005), přesto pro roli sítnice v magnetorepaci holubů neexistují přímé důkazy. Holubi jsou velmi dobře chovatelní, komerčně dostupní a jejich sítnice je dostatečně veliká pro takovýto typ experimentu.

Studován byl vliv magnetické stimulace na aktivitu sítnice holuba. Zvláštní důraz byl kladen na případnou magneticky indukovanou aktivitu v Cry1 nebo Cry2 pozitivních neuronech. Jako marker aktivace byl použit c-Fos. Kvantitativní analýza kolokalizace c-Fos/Cry1 respektive kolokalizace c-Fos/Cry2 byla použita jako nástroj odpovídající na otázku zda a do jaké míry jsou magnetickou stimulací specificky aktivovány populace Cry1- nebo Cry2- pozitivních neuronů.

2.1 MAGNETICKÁ STIMULACE

Skupina deseti jedinců holuba skalního byla náhodně rozdělena do dvou skupin: skupiny experimentální (E – 5 jedinců) a skupiny kontrolní (C – 5 jedinců). Tyto dvě skupiny byly chovány ve stejných podmínkách s potravou a vodou ad libitum.

Holuby byli dáni do experimentálních boxů přibližně 22 hodin před vlastním experimentem, aby se co nejvíce omezil vliv manipulace se zvířaty na výsledky experimentu. Celý experiment byl zaznamenáván na video a byl kladen důraz na přirozené chování testovaných jedinců.

Experiment začínal každý den ve stejnou dobu (mezi 8:30 a 9:30) a trval 70 minut. Kontrolní jedinci byly umístěni uvnitř vypnuté Helmholtzovy cívky, tedy vystaveni přirozenému magnetickému poli Země. Experimentální jedinci byly uvnitř vypnuté cívky přibližně 21 hodin, poté byl automaticky spuštěn program zajišťující periodickou manipulaci vertikální složky magnetického pole. Každých 30 sekund byla v tomto poli invertována inklinace magnetického pole (inklinace +66° versus inklinace -66°). Intenzita simulovaného

magnetického pole se pohybovala kolem 47000 – 47500 nT (cožn je přirozená intenzita magnetického pole, [nT] = nanoTesla).

Kromě charakteru magnetického pole byly podmínky pro obě skupiny stejné. Okamžitě po ukončení experimentu byli jedinci usmrceni letální dávkou halotanu a perfuzováni přes srdce heparinizovaným fyziologickým roztokem a následně 4% paraformaldehydem v PBS. Oči byly vypreparovány, odstřižen byl jejich přední segment a oční pohárek se sítnicí postfixován po dobu 1 hodiny ve stejné fixáži. Poté byla tkáň převedena na 24 hodin do 30 % sacharózy v PBS a dále skladována v -25 °C. Se zvířaty bylo nakládáno v souladu s platnými právními normami.

2.2 IMUNOCYTOCHEMIE

Ze zamražených očních pohárků byly odebrány vzorky sítnice a to vždy ze čtyř specifických částí: centrální část sítnice (oblast fovea centralis), část z centrální oblasti červeného pole (oblast obsahující ve svém středu foveu používanou pro binokulární vidění), temporální část a nasální část (během preparace byla zachována orientace sítnice – viz. Obr. 2). Vzorky sítnice byly montovány tak, aby byly vzájemně si odpovídající oblasti sítnic kontrolních a experimentálních byly přesně superponovány. Sítnice byly řezány na kryostatu (Leica CM3050 S) na 16 µm silné kryorezy. Sítnice byly zpracovávány takovým způsobem, že se krájely a lepily na sklíčko vždy odpovídající oblasti od experimentálních i od kontrolních jedinců. Tím bylo zaručené stejné barvení (v jedné kapce) pro kontrolní i experimentální sítnici. Sítnice se na sklíčku střídaly, takže nemohlo dojít k silnějšímu barvení jen jednoho typu sítnice nerovnoměrnou aplikací protilátek.

Pro detekci exprese protejnů Cry1, Cry2 a c-Fos byly použity následující komerčně dostupné primární polyklonální protilátky: goat-anti mouse Cry 1 (A-20), IgG (sc-5953, Santa Cruz Biotechnology, Inc.); rabbit anti-mouse Cry2, IgG (CRY21-A, Alpha Diagnostic Inc.); rabbit nebo goat anti-human c-Fos (K-25), IgG (sc-253 nebo sc-253G, Santa Cruz Biotechnology Inc.). K vizualizaci primární protilátky bylo použito následujících fluorescenčně značených sekundárních protilátek: donkey anti goat IgG konjugovaná s Alexa Fluor 488 nebo s CY-5; donkey anti rabbit IgG konjugovaná s Alexa Fluor 488 nebo CY-5 .

Sítnice byly barveny jednotlivými protilátkami zvlášť i ve vzájemných kombinacích pro analýzu kolokalizace. Použitý protokol je detailně popsán níže. Při každém barvení byly prováděny dva typy kontrol: 1) Byla vynechána primární protilátka a sledoval se barvicí efekt pouze sekundární protilátky. 2) Preabsorpční test, při kterém se primární protilátka nechala vysytit před aplikací na tkáň komerčně dodávaným proteinem. Pro potřeby preabsorbčního

testu byly použity syntetické peptidy od stejných dodavatelů (CRY21-P, Alpha Diagnostic Inc., CRY1 - sc-5953P, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), c-Fos (sc-253P, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Oba testy spolehlivě potvrdily specifitu námi používaných protilátek. Jako zalévací medium bylo použito Aqua-Poly-Mount (Polysciences Europe GmbH) nebo, pro vizualizaci buněčných jader, Vectashield Hard set Mounting medium with DAPI (Vector Laboratories). Značení buněčných jader nám umožnilo kvantifikovat všechny buňky v jednotlivých vrstvách sítnice.

2.3 PROTOKOL POUŽITÉHO BARVENÍ

1. Sklíčka vyndána z mrazicího boxu se nechají 2 minuty oschnout od vysrážené vody a řezy se obkrouží nesmáčivou linkou pro barvení v kapce (SUPER PAP-PEN)
2. Promývání v PB – 1 X 10 min.
3. Promývání v PBST – 3 X 10min.
4. Blokování nespecifických vazebných míst – 10% Normal Donkey Sérum (oslí sérum) – 30 min.
5. Aplikace primární protilátky – přes noc
 - CRY1 Santa Cruz Biotechnology, goat (1:100)
 - CRY2 Alpha Diagnostic, rabbit (1:100)
 - C-Fos Santa Cruz Biotechnology, rabbit i goat (1:100)
6. Promývání v PBST – 4 X 10 min.
7. Aplikace sekundární protilátky – 90 min.
 - Donkey anti goat IgG, Alexa Fluor 488, CY-5 (1:1000)
 - Donkey anti rabbit IgG, Alexa Fluor 488, CY-5 (1:1000)
8. Promývání v PBS – 3 X 10 min.
9. Promývání v PB – 2 X 10 min.
10. Zalití v zalévacím mediu a přikrytí krycím sklíčkem

2.4 ANALÝZA DAT

Nabarvené sítnice byly následně fotografovány s použitím mikroskopu IX71 (Olympus) vybaveného CCD kamerou (Hamamatsu ORCA-AG) a příslušným softwarem (Cell[^]R Imaging System, Olympus). Počty pozitivních buněk byly spočítány pomocí programu AnalySIS PRO (Olympus).

Z každého jedince byly analyzovány 4 oblasti sítnice, ze kterých bylo nabarveno každým typem barvení vždy přibližně 5 řezů touto částí sítnice. Z každého typu nabarvených řezů bylo uděláno pět fotografií, které byly kvantifikovány. Do statistických analýz vstupovaly průměry počtů pozitivních buněk z těchto fotografií.

Jako vhodný statistický test byla použita ANOVA repeated measures. Základní soubory (počty jednotlivých pozitivních buněk) byly otestovány na normalitu dat a homogenitu variancí. V obou těchto parametrech data splňovala podmínky pro použití ANOVY. ANOVA repeated measures nám umožnila srovnávat experimentální a kontrolní jedince v rámci

odpovídajících částí sítnice, testovala rozdíly mezi jednotlivými hodnocenými částmi sítnice a hodnotila také, jestli výsledky těchto dvou testů jsou ve vzájemném souladu. Ke zjištění vzájemných vztahů mezi jednotlivými částmi sítnice experimentálních i kontrolních jedinců nám posloužil Tukey test – mnohonásobná porovnání. Z výsledné tabulky tohoto testu je možné zjistit rozdíly mezi všemi rozlišovanými skupinami. Všechny výše popsané statistické procedury byly provedeny v programu Statistica 8 (Statsoft 2006).

Informace k použitým chemikáliím

PB – phosphate buffer (2 l H₂O + 4,32g KH₂PO₄ + 23,12g Na₂HPO₄)

PBS – phosphate buffer saline (2 l H₂O + 4,32g KH₂PO₄ + 23,12g Na₂HPO₄ + 18g NaCl)

PBST – phosphate buffer saline with Tween

Zalévací medium - Medium Aqua-Poly-Mount, Polysciences Europe GmbH

Zalévací medium - Vectashield Hard set Mounting medium with DAPI, Vector Laboratories

CRY1 – goat anti mouse (A-20) (Santa Cruz Biotechnology – Code sc-5953)

CRY2 – rabbit anti mouse (CRY21-A) (Alpha diagnostic – Code 50526A)

C-Fos - goat anti mouse (Alpha Diagnostic – Code 554C1A)

C-Fos - rabbit anti mouse (Santa Cruz Biotechnology – Code sc-81209)

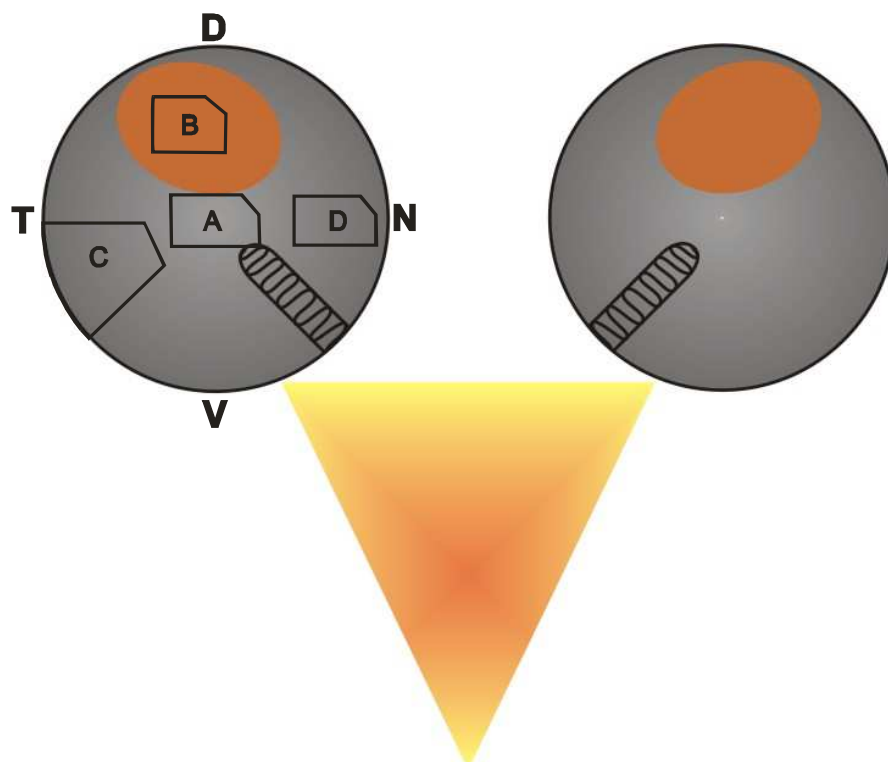
Donkey anti Goat IgG, CY-5 (Jackson ImmunoResearch –Code 705-175-003)

Donkey anti Rabbit IgG, CY-5 (Jackson ImmunoResearch –Code 711-175-152)

Donkey anti goat IgG, Alexa Fluor 488 (A11055; Molecular probes, Invitrogen Corporation)

Donkey anti rabbit IgG, Alexa Fluor 488 (A21206; Molecular probes, Invitrogen Corporation)

Normal Donkey Serum (Jackson ImmunoResearch –Code 017-000-121)



Obr. 2. Na tomto obrázku je schématicky znázorněna pozice jednotlivých hodnocených částí sítnice. **A,B,C,D** - **A** - centrální oblast, **B** – oblast červeného pole, **C** – temporální oblast, **D** – nasální oblast, Zkratky: **V** – ventrální, **N** – nasální, **D** – dorsální a **T** – temporální okraj sítnice.

3. VÝSLEDKY

V této práci jsem testoval rozdíly v počtu buněk mezi experimentálními a kontrolními jedinci. Sledoval jsem expresi proteinů kryptochrom 1, kryptochrom 2 a c-Fos. Nesledoval jsem jen počty buněk obsahujících jeden z těchto proteinů, ale zaměřil jsem se také na buňky ve kterých tyto proteiny kolokalizovali (pokud vůbec). Vyhodnocovány byly také vrstvy sítnice v nichž se pozitivní buňky nacházely.

Skutečnost, že vzorky sítnic byly odebírány ze čtyř různých oblastí každé sítnice (centrální oblasti, oblasti červeného pole, nasální a temporální část - viz metodika obr. 2) nám umožnila jejich vzájemné srovnání a současně dala vyniknout existujícím rozdílům mezi kontrolními a experimentálními zvířaty, které by v rámci celé sítnice mohly zaniknout.

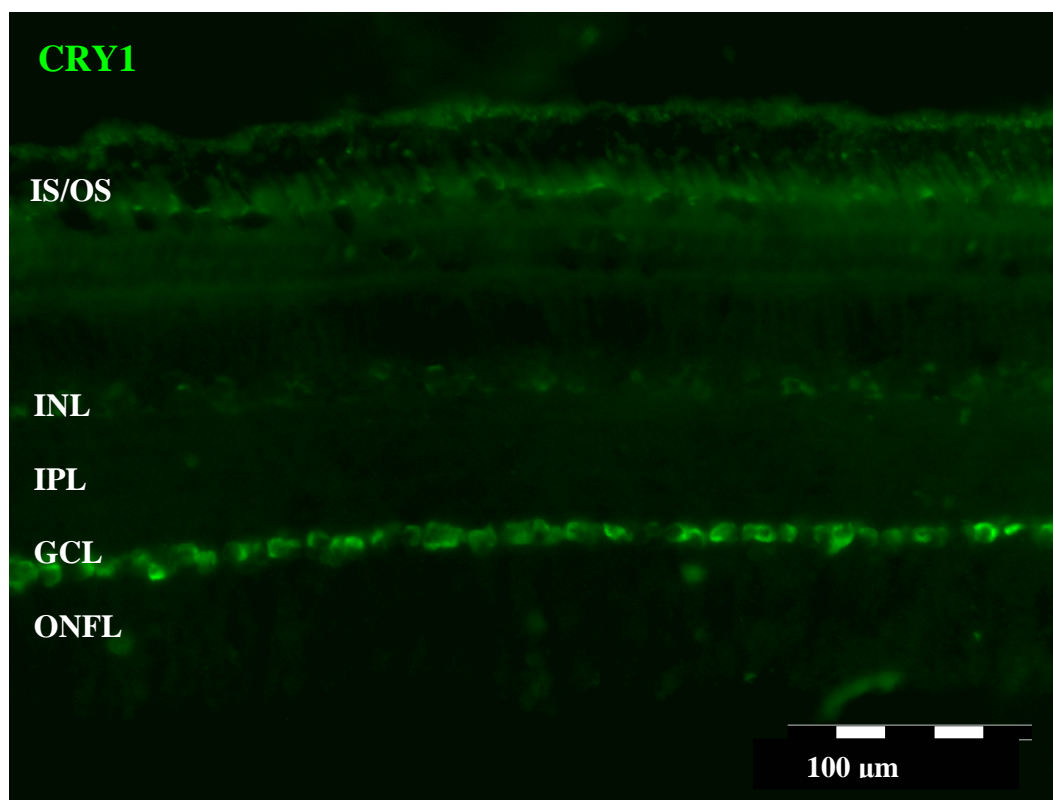
Výsledky této práce tedy můžeme rozdělit do dvou částí: v první části se zabývám především lokalizací jednotlivých proteinů v sítnici a procentuálním vyjádřením četnosti jednotlivých typů buněk v sítnici, v druhé části pak statistickým srovnáním počtu pozitivních buněk mezi experimentálními a kontrolními jedinci i mezi jednotlivými částmi sítnice.

Tab. 1. Procentuální zastoupení pozitivních buněk v rámci celé sítnice. **CRY1+c-Fos/c-Fos** – vyjadřuje jaká část buněk obsahujících c-Fos byla v kolokalizaci s CRY 1, **CRY1+c-Fos/CRY1** – vyjadřuje jaká část CRY 1 pozitivních buněk byla v kolokalizaci s proteinem c-Fos. Experiment - zvířata vystavená změnám inklinace magnetického pole, Kontrola - zvířata v přirozeném magnetickém poli, **INL** –vnitřní jaderná vrstva , **GCL** – vrstva gangliových buněk.

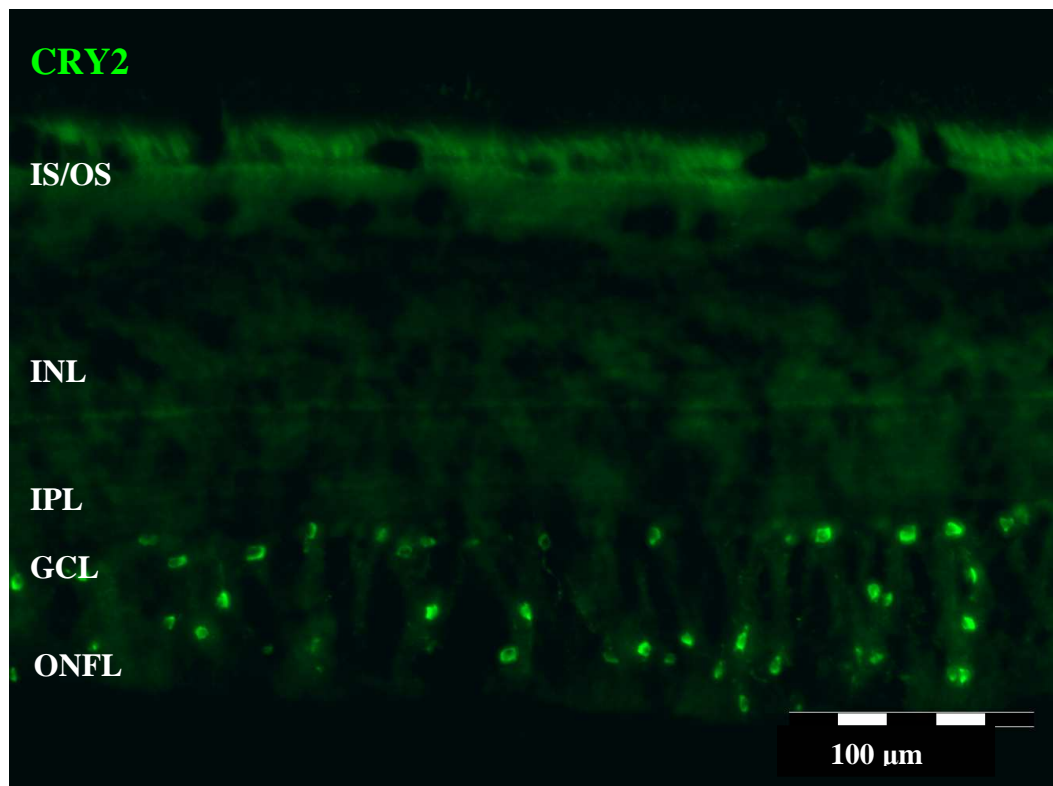
		Experiment	Kontrola
INL	CRY1	1,22	0,79
	CRY2	0,06	0,03
	c-Fos	1,07	0,45
	CRY1+c-Fos	0,25	0,08
	CRY1+c-Fos/c-Fos	22,97	17,30
	CRY1+c-Fos/CRY1	20,11	9,72
GCL	CRY1	34,69	26,57
	CRY2	15,72	17,19
	C-Fos	1,82	1,59
	CRY1+C-Fos	0,92	0,69
	CRY1+c-Fos/+c-Fos	50,36	43,34
	CRY1+c-Fos/CRY1	2,64	2,59

Tab. 2. Srovnání počtů pozitivních buněk na 1 mm sítnice u experimentálních a kontrolních jedinců. **INL** – vitální jaderná vrstva, **GCL** – vrstva gangliových buněk, **CRY1** – kryptochrom 1, **CRY2** – kryptochrom 2, **c-Fos** – marker neuronální aktivity.

		CRY1	CRY2	c-Fos	CRY1+ c-Fos	BUŇKY
EXP.	INL	8,2	0,4	7,2	1,6	670
	GCL	16	7,3	0,8	0,4	46
KONT.	INL	5,4	0,2	3	0,5	674
	GCL	12	7,9	0,7	0,3	46



Obr. 3. CRY1. Distribuce kryptochromu 1 – CRY1. je silně exprimován v subpopulaci gangliových buněk a slabě exprimován v subpopulaci neuronů ve vnitřní jaderné vrstvě (INL) centrální sítnice (lépe patrné ve větších zvětšeních). IS/OS – vnitřní a vnější segmenty fotoreceptorů, INL – vnitřní jaderná vrstve, IPL – vnitřní plexiformní vrstve, GCL – vrstve gangliových buněk, ONFL – vrstve vláken optického nervu



Obr. 4. CRY2. Distribuce kryptochromu 2 (CRY2). CRY2 silně exprimuje subpopulace gangliových buněk nacházející se ve spodní podvrstvě GCL, v centrální sítnici také gangliové buňky rozetuté ve vrstvě vláken optického nervu (ONFL). IS/OS – vnitřní a vnější segmenty fotoreceptorů, INL – vnitřní jaderná vrstve, IPL – vnitřní plexiformní vrstve, GCL – vrstve gangliových buněk, ONFL – vrstve vláken optického nervu.

3.1 LOKALIZACE KRYPTOCHROMŮ V SÍTNICI

Kryptochromy se v sítnici nacházejí ve vnitřní jaderné vrstvě (INL - inner nuclear layer) a ve vrstvě gangliových buněk (GCL - ganglion cell layer) (Obr. 3 a 4).

Procentuální vyjádření a četnosti jednotlivých pozitivních buněk jsou počítány ze sítnic kontrolních jedinců (zvířata v přirozených podmínkách) a je důležité si uvědomit, že se tyto hodnoty dost pravděpodobně mění během dne a některé z nich jsou také rozdílné mezi experimentálními a kontrolními jedinci (viz. druhá část výsledků).

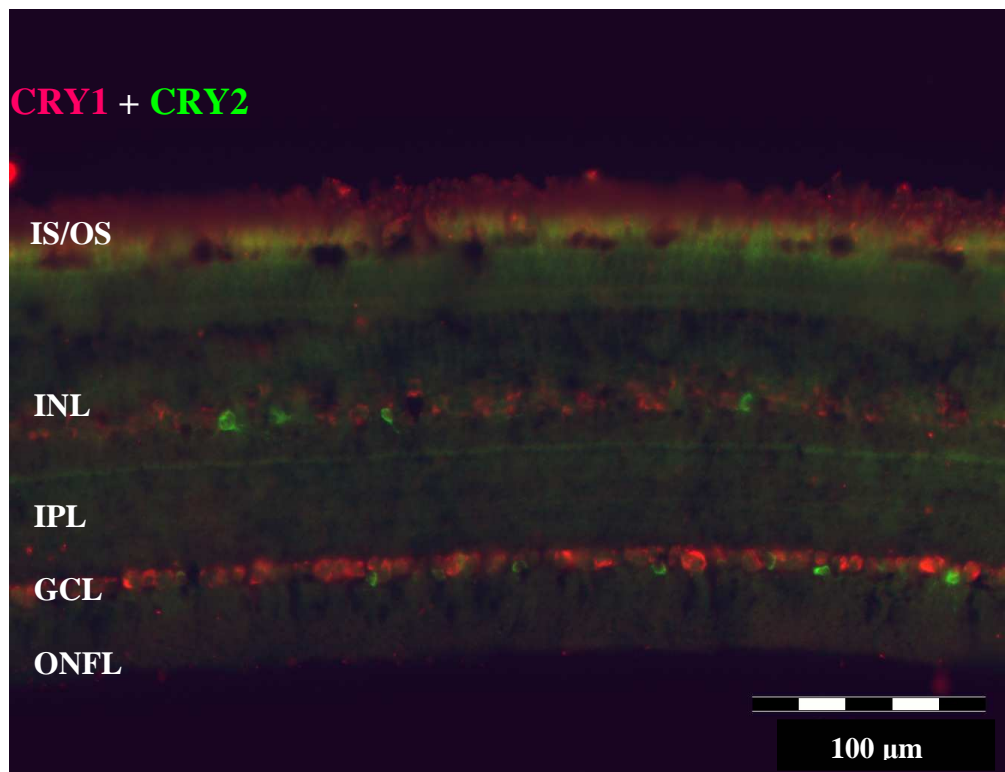
Distribuce kryptochromů (CRY1 a CRY2) v sítnici není shodná. CRY 1 je v GCL velmi hojně zastoupen, vyskytuje se v každé 4. buňce (26,7%) a je poměrně hojný i v INL, kde se vyskytuje v každé asi 125. buňce (0,79%). Oproti CRY1 je kryptochrom 2 mnohem vzácnější. Vyskytuje se více v GCL, kde je v každé asi 6. buňce (17,19%), zatímco v INL je ho opravdu velmi málo a vyskytuje se zde pouze v každé 3460 buňce (0,03%). CRY2 pozitivní buňky jsou (na rozdíl od CRY1 pozitivních buněk) také ve vrstvě vláken optického nervu (ONFL – optic nerve fibre layer) a to zejména v centrální oblasti sítnice (Obr. 4). Data o počtu těchto buněk na 1 mm sítnice shrnuje Tabulka 2.

Zajímavá je také skutečnost, že v námi analyzovaných sítnicích prakticky nebyl zaznamenán případ kolokalizace CRY 1 a CRY 2 (Obr. 5). Každý z těchto proteinů se vyskytoval v jiných buňkách, i když byly často ležících blízko u sebe. Existují tedy pravděpodobně dvě populace gangliových buněk, jedna obsahující CRY1 a druhá obsahující CRY2.

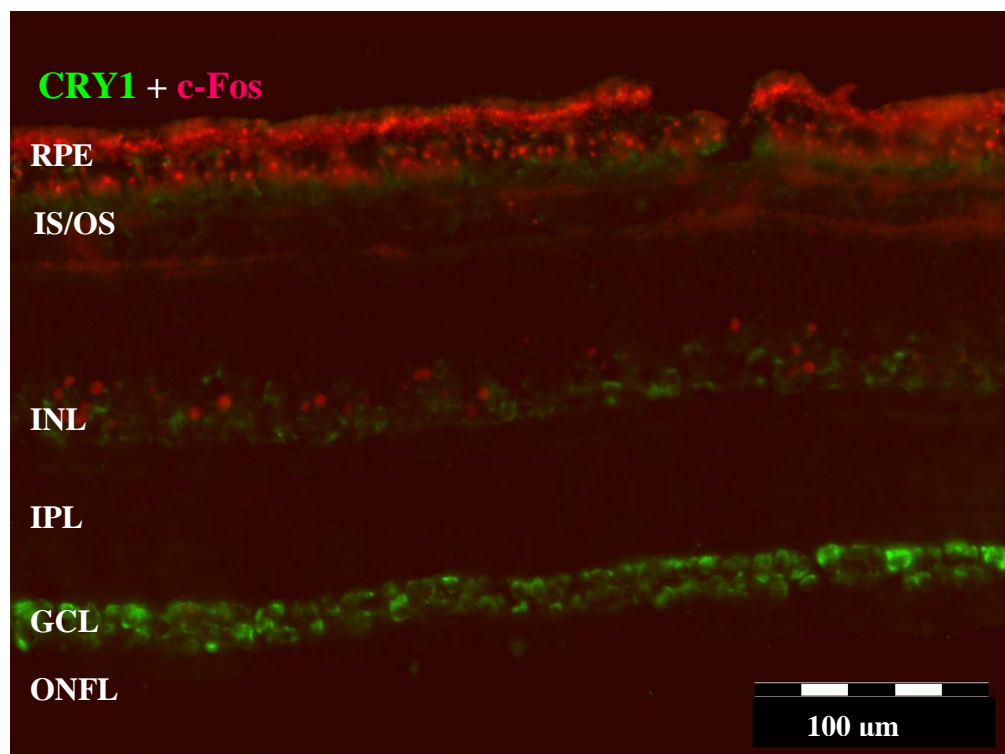
V počtu pozitivních buněk na 1mm sítnice výrazně převažoval počet c-Fos pozitivních buněk v INL (3 buňky na 1mm sítnice), ve které byla pozitivní každá 225. buňka (0,45%). Zatímco v GCL jich bylo zaznamenáno mnohem méně (0,7 buněk na 1mm sítnice), přesto však byla pozitivní každá 63. buňka (1,59%) (rozpor je způsoben různým počtem buněk v INL a GCL, počty buněk pro experimentální i kontrolní jedince na 1 mm sítnice detailně ukazuje tab. 2).

Buňky ve kterých kolokalizoval kryptochrom 1 s markerem neuronální aktivity (c-Fos) se nacházely více v INL (0,5 buněk na 1 mm sítnice), kde byla pozitivní na oba tyto proteiny každá asi 1300. buňka (0,08%), zatímco v GCL jich bylo zaznamenáno na počet méně (0,3 na 1 mm sítnice), ale i přes to byla pozitivní každá 145. buňka (0,69%) (Obr.6).

V námi hodnocených sítnicích nebyly pozorovány žádné buňky ve kterých by kolokalizoval kryptochrom 2 spolu s markerem neuronální aktivity (c-Fosem) (Obr.7).



Obr. 5. CRY1 + CRY2. Kolokalizace kryptochromu 1 (CRY1 – červená barva) s kryptochromem 2 (CRY2 – zelená barva) v periferní sítnici. Z fotografie je dobře patrné, že počet CRY1 pozitivních buněk značně převyšuje počet CRY2 pozitivních buněk. IS/OS – vnitřní a vnější segmenty fotoreceptorů, INL – vnitřní jaderná vrstve, IPL – vnitřní plexiformní vrstve, GCL – vrstve gangliových buněk, ONFL – vrstva vláken optického nervu.



Obr. 6. CRY1 + c-Fos. Kolokalizace kryptochromu 1 (zelená barva) s markrem neuronální aktivity – c-Fos (červená barva). Positivita ve vrstvě fotoreceptorů je dána autofluorescencí (olejové kapénky) této části sítnice, silná autofluorescencě je rovněž partná v pigmentovém epitelu (RPE, retinal pigment epithelium). IS/OS – vnitřní a vnější segmenty fotoreceptorů, INL – vnitřní jaderná vrstve, IPL – vnitřní plexiformní vrstve, GCL – vrstve gangliových buněk, ONFL – vrstva vláken optického nervu.

Další procentuální charakteristiky pozitivních buněk jsou uvedeny v Tab. 1 a 3, která ukazuje zejména rozdíly mezi sítnicemi experimentálních a kontrolních jedinců. Procentuální podíl pozitivních buněk u experimentálních i kontrolních jedinců v rámci všech analyzovaných částí sítnice je zobrazen v grafech v následujících podkapitolách.

3.2 VNITROBUNĚČNÁ LOKALIZACE

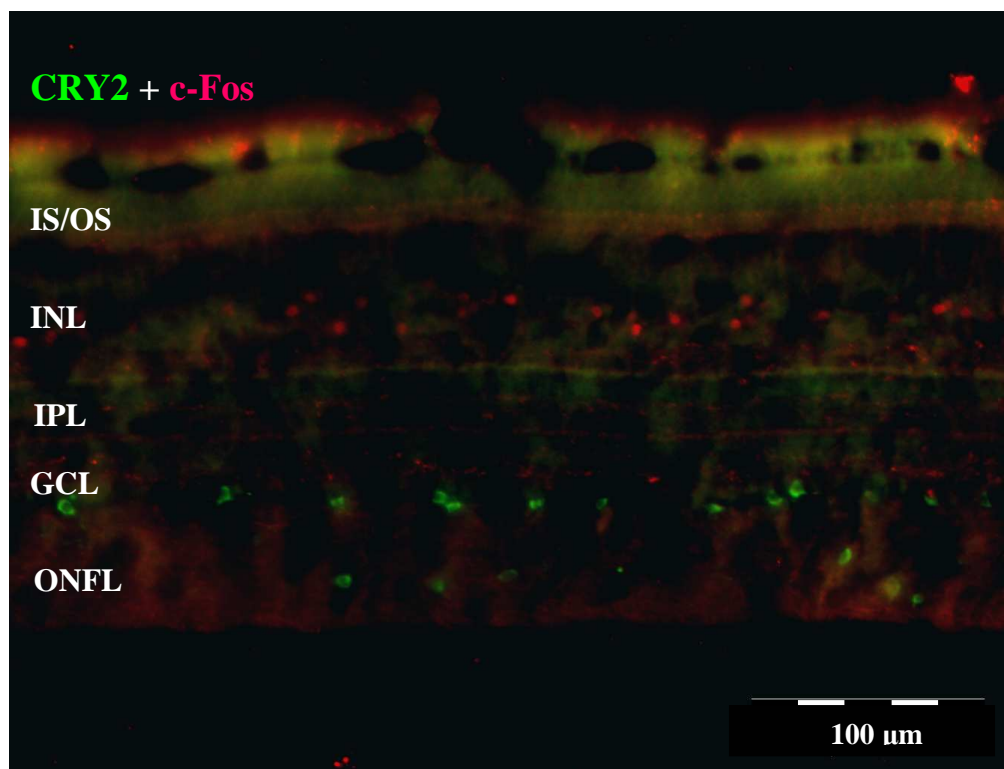
Podle výsledků ze sítnic barvených protilátkami proti CRY1, CRY2 a protilátky vázající se nespecificky na jadernou DNA (DAPI) se kryptochrom 1 i kryptochrom 2 nachází v cytosolu buněk sítnice. To bylo pozorováno mikroskopem ve velkých zvětšeníh (Obr. 8). Marker neuronální aktivity (c-Fos) byl oproti tomu pozorován v jádře, což odpovídá jeho funkci jako transkripčního faktoru ranných genů (Obr. 8).

Tab. 3. Procentuální vyjádření poměru pozitivních buněk v hodnocených vrstvách sítnice. **CRY1+c-Fos/c-Fos** – jaká část buněk obsahujících c-Fos byla v kolokalizaci s CRY1, **CRY1+c-Fos/CRY1** – jaká část CRY1 pozitivních buněk byla v kolokalizaci s proteinem c-Fos. **Exp.** – změny inklinace magnetického pole, **Kont.** – přirozené magnetické pole Země).

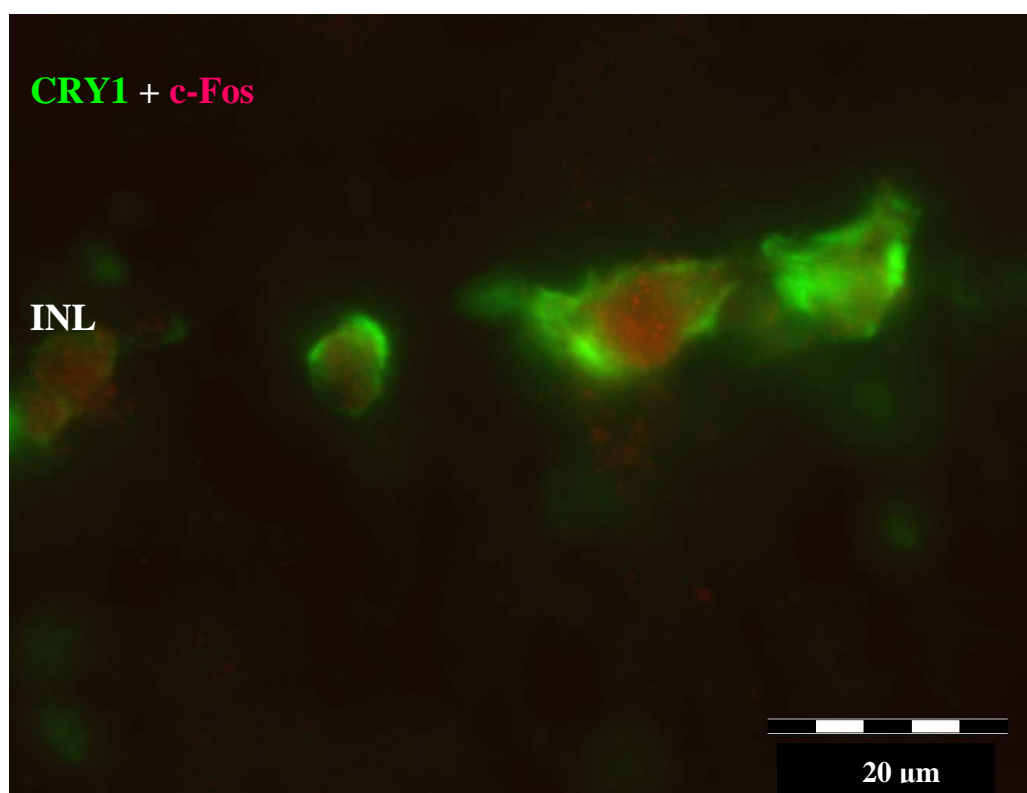
		Centrální sítnice		Červené pole		Temporální sítnice		Nasální sítnice	
		Exp.	Kont.	Eexp.	Kont.	Eexp.	Kont.	Exp.	Kont.
INL	CRY1+c-Fos/c-Fos	28,12	23,01	22,46	12,70	17,44	20,00	25,82	18,55
	CRY1+c-Fos/CRY1	19,70	10,24	24,55	12,97	19,86	9,02	14,55	7,40
GCL	CRY1+c-Fos/+c-Fos	54,74	41,11	49,22	51,25	46,15	37,25	48,72	41,67
	CRY1+c-Fos/CRY1	2,32	3,37	3,24	2,66	2,31	1,55	2,97	2,92

Tab. 4. Souhrn výsledků všech statistických srovnání mezi experimentálními a kontrolními jedinci v rámci jednotlivých hodnocených vrstev sítnice. **INL** – vnitřní jaderná vrstva, **GCL** – vrstva gangliových buněk, **CRY1** - kryptochrom 1, **CRY2** - kryptochrom 2, **c-Fos** – marker neuronální aktivity. **Exp. X Kon.** – rozdíl mezi experimentálními a kontrolními jedinci, **OBLASTI SÍTNICE** – rozdíly mezi rozlišovanými částmi sítnice, **KORELACE** – ukazuje zda rozdíly mezi oblastmi sítnice podporují rozdíly mezi **Exp. X Kon.**

VRSTVA SÍTNICE	BARVENÍ	Exp. X Kon.	OBLASTI SÍTNICE	KORELACE
INL	BUŇKY	0,101	0,000	0,290
	CRY1	0,000	0,000	0,000
	CRY2	0,115	0,023	0,842
	c-Fos	0,000	0,000	0,002
	CRY1+c-Fos	0,000	0,000	0,000
GCL	BUŇKY	0,708	0,000	0,902
	CRY1	0,012	0,000	0,000
	CRY2	0,244	0,000	0,744
	c-Fos	0,081	0,000	0,305
	CRY1+c-Fos	0,009	0,003	0,436



Obr. 7. CRY2 + c-Fos. Distribuce kryptochromu 2 (CRY2 – zelená barva) a proteinu c-Fos (marker neuronální aktivity, červená barva). Všimněte si absence kolokalizace těchto dvou proteinů. IS/OS – vnitřní a vnější segmenty fotoreceptorů, INL – vnitřní jaderná vrstva, IPL – vnitřní plexiformní vrstva, GCL – vrstva gangliových buněk, ONFL – vrstva vláken optického nervu.



Obr. 8. CRY1 + c-Fos. Detail kolokalizace kryptochromu 1 (zelená barva) s markrem neuronální aktivity (červená barva) ve větším zvětšení. Na obrázku můžeme pozorovat c-Fos pozitivní jádro buňky a CRY1 pozitivní cytoplasmu. IS/OS – vnitřní a vnější segmenty fotoreceptorů, INL – vnitřní jaderná vrstva, IPL – vnitřní plexiformní vrstva, GCL – vrstva gangliových buněk, ONFL – vrstva vláken optického nervu.

3.3 SROVNÁNÍ SÍTNIC EXPERIMENTÁLNÍCH A KONTROLNÍCH JEDINCŮ

V druhé části práce jsem testoval rozdíly mezi experimentálními a kontrolními jedinci. Testoval jsem také variabilitu mezi jednotlivými částmi sítnice a korelaci mezi variabilitou v rámci sítnice a rozdílem mezi experimentálními a kontrolními jedinci.

3.3.1 Srovnatelnost sítnic

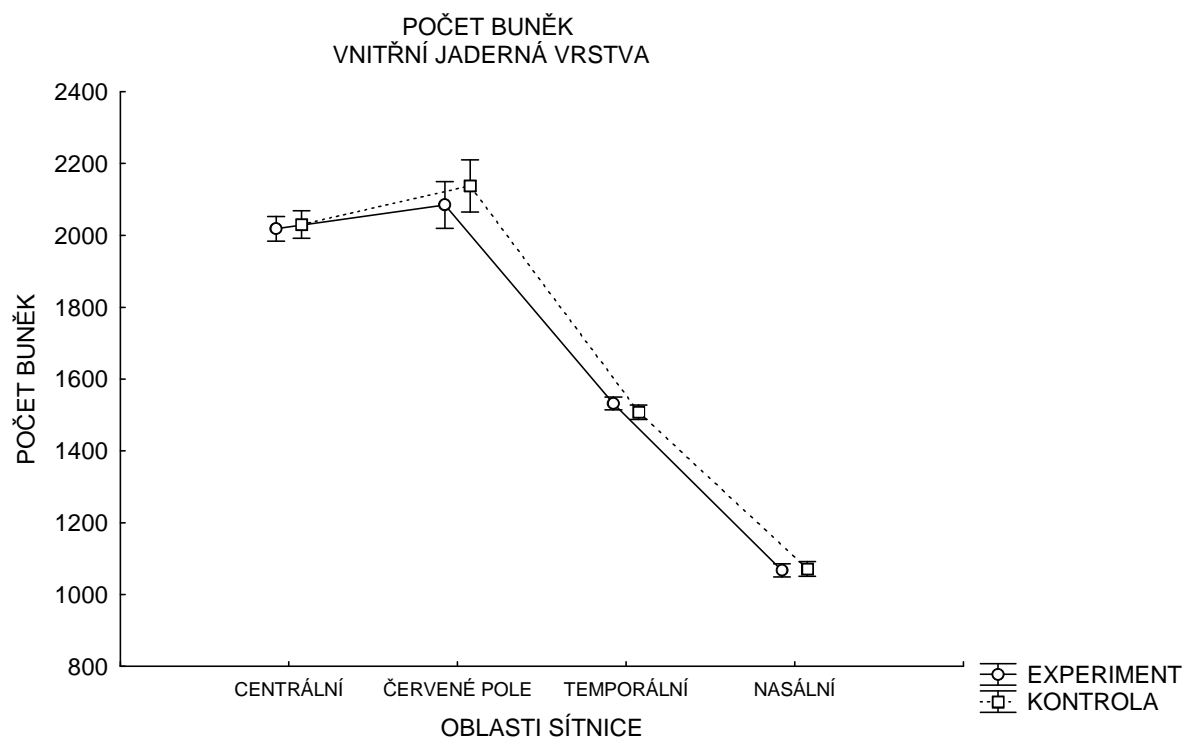
Pro zjištění, zda jsou mezi sebou srovnatelné jednotlivé oblasti izolované ze sítnic získané z kontrolních a experimentálních zvířat, bylo nejprve otestováno, zda se mezi sebou tyto sítnice liší v počtu všech buněk INL a GCL.

Výsledky, které dokumentují tabulka 4 a grafy 1 a 2, ukazují, že mezi sítnicemi experimentálních a kontrolních jedinců není žádný prokazatelný rozdíl v počtu buněk v INL ($p=0,101$) ani v GCL ($p=0,708$). Zároveň však existuje velký rozdíl v počtu buněk mezi jednotlivými částmi sítnice a to také v obou vrstvách buněk (INL - $p=0,000$, GCL - $p=0,000$). To také dokládají grafy 1 a 2.

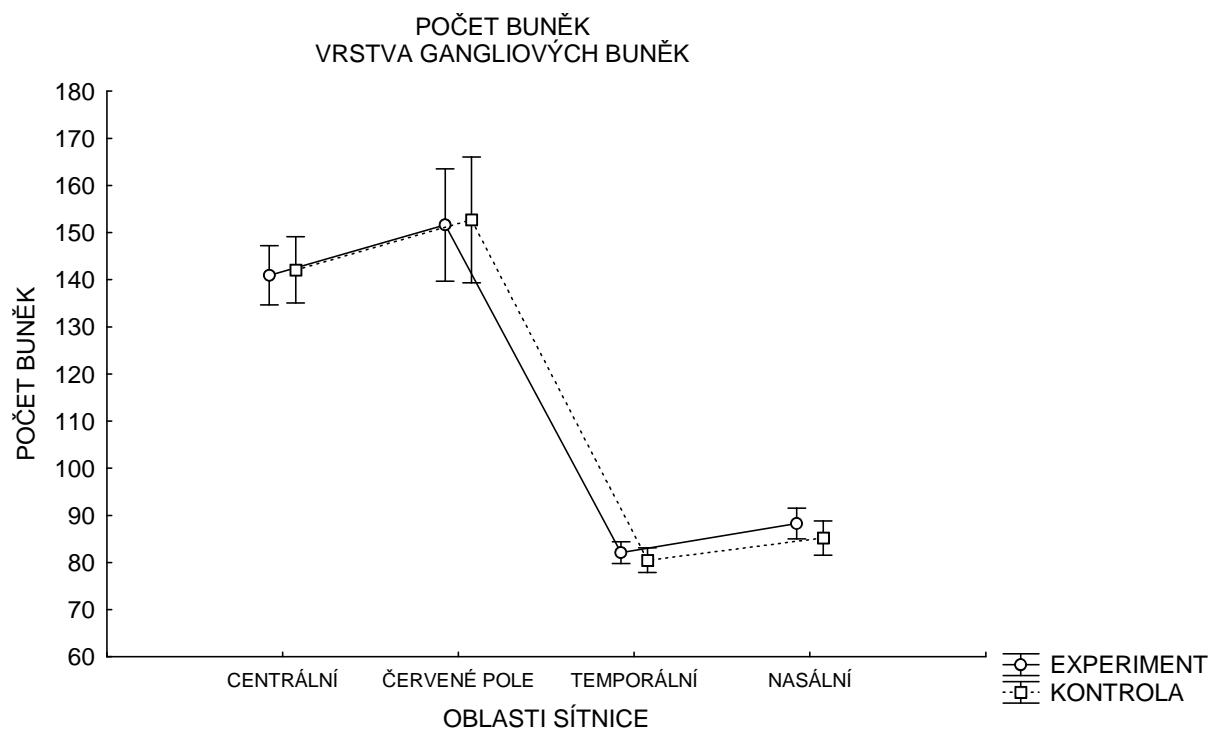
Z tabulek mnohonásobného porovnání – Tukey test (Přílohy tabulka 1 a 2) vyplývá, že centrální oblast a oblast červeného pole sítnice obsahují největší počet buněk v INL, od kterých lze odlišit oblast temporální sítnice, která buněk obsahuje prokazatelně méně. Nejméně buněk v INL je v nasální oblasti sítnice.

Ve vrstvě gangliových buněk není prokazatelný rozdíl v počtu buněk mezi centrální oblastí + oblastí červeného pole a mezi nasální + temporální oblastí sítnice. Mezi těmito dvěma skupinami je však výrazný rozdíl.

Statisticky neprůkazný rozdíl v počtu buněk mezi sítnicemi experimentálních a kontrolních jedinců dokládá srovnatelnost těchto dvou skupin vytvořených náhodným výběrem a umožňuje přistoupit k dalším srovnávacím testům.



Graf 1. Rozdíly v počtech jaderných buněk ve vrstvě gangliových buněk mezi experimentálními a kontrolními jedinci v rámci jednotlivých částí sítnice ($F_{3, 21}=1,332$, $p=0,290$). Experiment – zvířata vystavena stimulaci změnami magnetického pole, Kontrola – zvířata držena během experimentu v přirozeném magnetickém poli. Symboly zobrazují průměr a 95% konfidenční interval.



Graf 2. Rozdíly v počtech jaderných buněk ve vrstvě gangliových buněk mezi experimentálními a kontrolními jedinci v rámci jednotlivých částí sítnice ($F_{3, 21}=0,189$, $p=0,902$). Experiment – zvířata vystavena stimulaci změnami magnetického pole, Kontrola – zvířata držena během experimentu v přirozeném magnetickém poli. Symboly zobrazují průměr a 95% konfidenční interval.

3.3.2 Srovnání v počtu pozitivních buněk INL

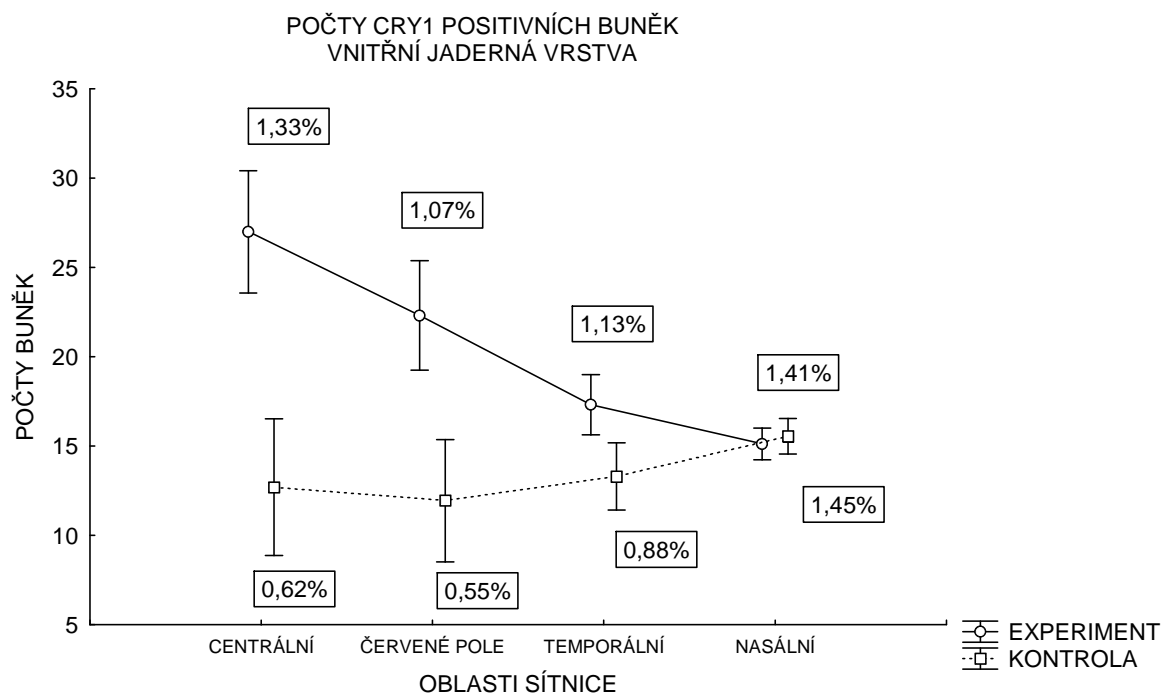
Podle našich výsledků bylo v INL obecně méně kryptochrom pozitivních buněk (platí pro kryptochrom 1 i 2), než v GCL. Marker neuronální aktivity však naopak naznačoval, že většina aktivovaných neuronů se nalézají právě v INL.

CRY1 v INL

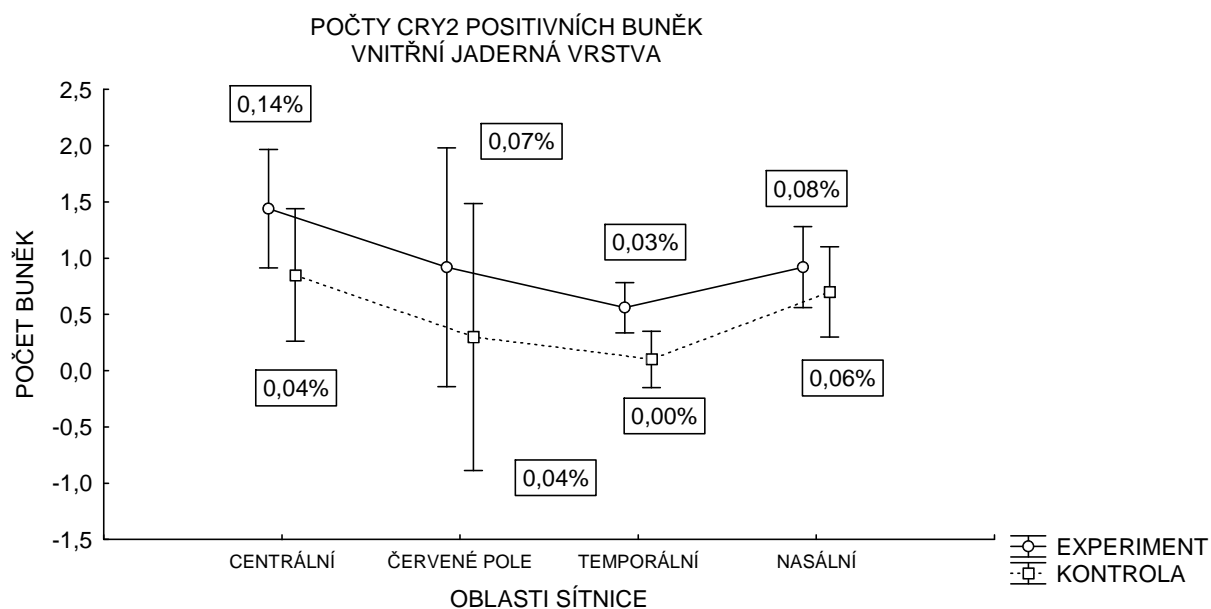
Statisticky průkazný rozdíl v počtu CRY 1 pozitivních buněk byl pozorován v této vrstvě mezi kontrolními a experimentálními jedinci ($p=0,000$). To dokládá jak tabulka 4, tak také graf 3. Z dat je také patrný rozdíl mezi jednotlivými částmi sítnice ($p=0,000$) i to že tyto dvě hodnoty spolu korelují ($P=0,000$). Z mnohonásobného porovnání počtu pozitivních buněk v jednotlivých částech sítnice vyplývá, že oblasti centrální sítnice, červeného pole a temporální oblasti se u experimentálních jedinců statisticky liší mezi sebou, ale také od všech částí sítnic kontrolních zvířat a od temporální oblasti experimentálních zvířat, které tvoří statisticky nerozdílnou skupinu (mnohonásobného porovnání viz přílohy - tabulka 3). Statisticky průkazné rozdíly mezi experimentálními a kontrolními jedinci podporují také procentuální zastoupení CRY1 pozitivních buněk v jednotlivých částech sítnice (graf 3).

CRY2 v INL

Na rozdíl od CRY1, nebyl nalezen statisticky průkazný rozdíl v počtu CRY 2 pozitivních buněk mezi experimentálními a kontrolními jedinci v INL, u CRY2 tomu tak nebylo ($p=0,115$). To také dokládá tabulka 4 a zobrazuje graf 4. Vyšel ale pozitivní rozdíl mezi jednotlivými částmi v rámci sítnice ($p= 0,023$). Ze vzájemného porovnání pomocí Tukey testu však vidíme, že jediným prokazatelným rozdílem je rozdíl v počtu kryptochrom 2 pozitivních buněk mezi centrální oblastí experimentálních zvířat a temporální oblastí zvířat kontrolních, což je výsledek, který nám nepřináší žádnou užitečnou informaci (mnohonásobná porovnání viz přílohy –tabulka 4). Neprůkazné výsledky v rozdílu mezi experimentálními a kontrolními jedinci potvrzují nevýrazně rozdílná procenta CRY2 pozitivních buněk v jednotlivých částech sítnice (graf 4).



Graf 3. Srovnání počtu kryptochrom 1 pozitivních buněk u experimentálních a kontrolních zvířat v rámci jednotlivých částí sítnice; v centrální sítnici, v oblasti červeného pole a v temporální sítnici je počet Cry1 pozitivních buněk signifikantně vyšší u experimentálních zvířat ($F_{3,21}=20,29$, $p=0,000$). Experiment – zvířata vystavena stimulaci změnami magnetického pole, Kontrola – zvířata držena během experimentu v přirozeném magnetickém poli. Procenta v rámečcích udávají jaké procento pozitivních buněk bylo v jednotlivých částech sítnice experimentálních a kontrolních jedinců. Symboly zobrazují průměr a 95% konfidenční interval.



Graf 4. Srovnání počtu kryptochrom 2 pozitivních buněk u experimentálních a kontrolních zvířat v rámci jednotlivých částí sítnice, počty Cry-2 pozitivních buněk se významně neliší ($F_{3,21}=0,276$, $p=0,842$). Experiment – zvířata vystavena stimulaci změnami magnetického pole, Kontrola – zvířata držena během experimentu v přirozeném magnetickém poli. Procenta v rámečcích udávají jaké procento pozitivních buněk bylo v jednotlivých částech sítnice experimentálních a kontrolních jedinců. Symboly zobrazují průměr a 95% konfidenční interval.

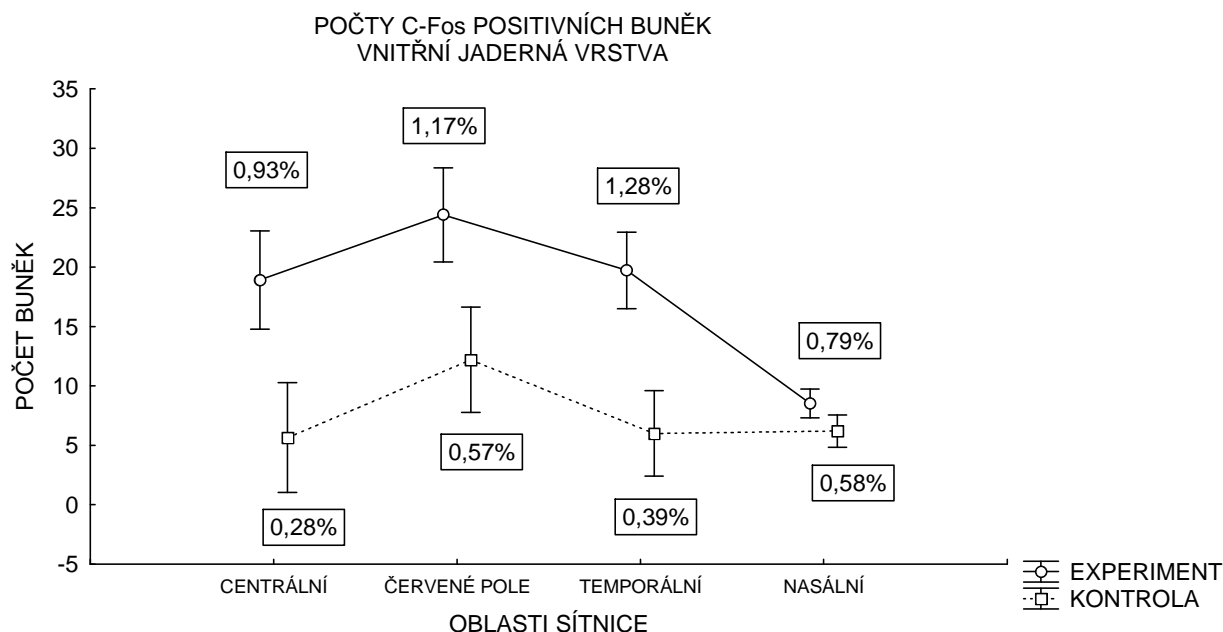
c-Fos v INL

V počtu c-Fos pozitivních buněk byl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl mezi experimentálními a kontrolními jedinci ($p=0,000$). Tuto skutečnost dokládá tabulka 4 a graf 5. Také mezi jednotlivými částmi sítnice existuje statisticky prokazatelný rozdíl ($p=0,000$), který je v korelaci s rozdíly mezi experimentálními a kontrolními jedinci ($p=0,002$). Z výsledků mnohonásobného porovnání mezi jednotlivými skupinami vyplývá, že centrální oblast sítnice, oblast červeného pole a temporální oblast u experimentálních jedinců se mezi sebou neliší a tvoří skupinu, která se prokazatelně liší od všech zbylých oblastí sítnice kontrolních i experimentálních jedinců. Zbylé části dohromady tvoří nerozlišitelnou homogenní skupinu (mnohonásobné porovnání skupin viz přílohy – tabulka 5). Tyto výsledky také podporují procenta c-Fos pozitivních buněk sítnice v jednotlivých částech, které ukazují na poměrně velký rozdíl mezi experimentálními a kontrolními jedinci (graf 5). V centrální sítnici, v oblasti červeného pole a temporální sítnici tedy dochází k indukci exprese proteinu c-Fos po magnetické stimulaci.

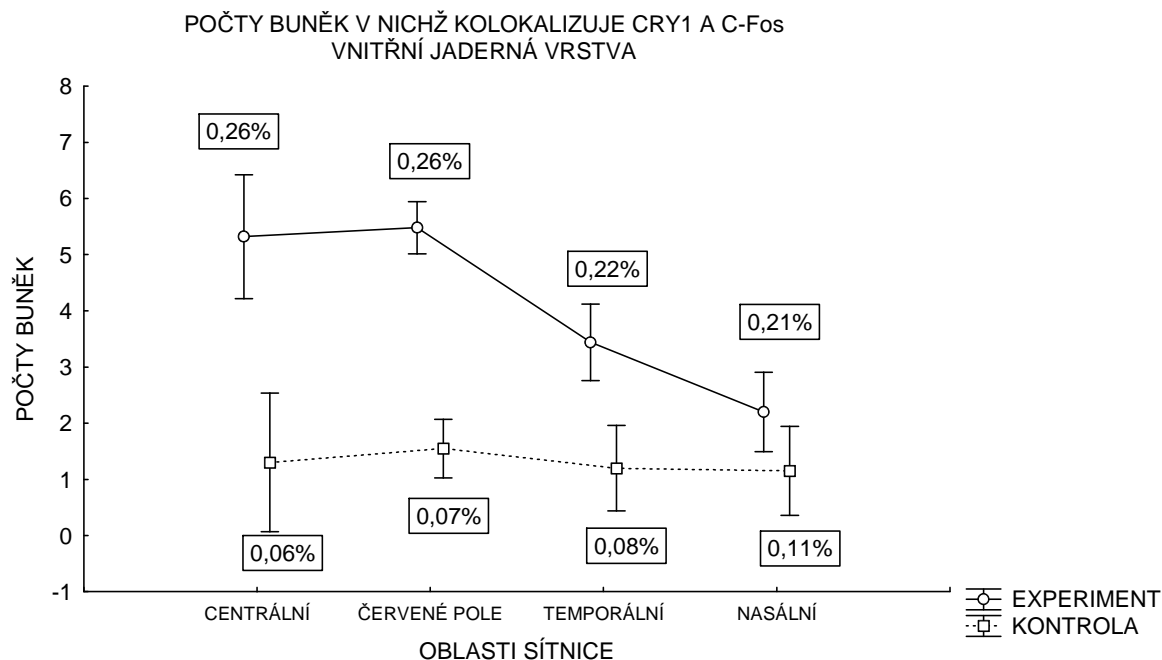
CRY1 + c-Fos v INL

Kvantitativně jsem vyhodnocoval také kolokalizace proteinů CRY1 a c-Fosu. Data ukazují průkazný rozdíl v počtu buněk exprimujících oba tyto proteiny mezi experimentálními a kontrolními jedinci ($p=0,000$). To dokládá i tabulka 4 a ukazuje graf 6. V počtu těchto buněk byl prokazatelný rozdíl také mezi jednotlivými částmi sítnice ($p=0,000$, graf 6). Tyto statistické rozdíly spolu korelují ($p=0,000$). Z výsledků mnohonásobného porovnání jednotlivých částí sítnice vyplývá, že oblast centrální sítnice, oblast červeného pole a temporální sítnice experimentálních zvířat obsahují prokazatelně více buněk v nichž kolokalizuje CRY1 a c-Fos než temporální sítnice experimentálních jedinců a než všechny zbylé oblasti sítnice kontrolních jedinců (graf 6, mnohonásobných porovnání skupin viz přílohy – tabulka 6). Poměrně výrazný rozdíl mezi kontrolními a experimentálními jedinci ukazují také procenta buněk ve kterých kolokalizuje CRY1 a c-Fos v jednotlivých částech sítnice (graf 6).

Data navíc ukazují, že u experimentálních jedinců výrazně vyšší procento buněk obsahujících CRY1 kolokalizuje s c-Fosem a také výrazně vyšší procento c-Fos pozitivních buněk kolokalizuje s CRY1, než je tomu u kontrolních jedinců (pro jednotlivé oblasti sítnice uvádí tabulka 3). Zdá se tedy, že c-Fos je indukován v Cry1 pozitivních buňkách po magnetické stimulaci.



Graf 5. Srovnání počtu c-Fos pozitivních buněk u experimentálních a kontrolních zvířat v rámci jednotlivých částí sítnice; v centrální sítnici, v oblasti červeného pole a v temporální sítnici je počet c-Fos pozitivních buněk signifikantně vyšší u experimentálních zvířat ($F_{3,21}=6,921$, $p=0,002$). Experiment – zvířata vystavena stimulaci změnami magnetického pole, Kontrola – zvířata držena během experimentu v přirozeném magnetickém poli. Procenta v rámečcích udávají jaké procento pozitivních buněk bylo v jednotlivých částech sítnice experimentálních a kontrolních jedinců. Symboly zobrazují průměr a 95% konfidenční interval.



Graf 6. Srovnání počtu buněk, ve kterých kolokalizuje CRY1 a c-Fos, u experimentálních a kontrolních zvířat v rámci jednotlivých částí sítnice; v centrální sítnici, v oblasti červeného pole a v temporální sítnici je počet buněk exprimujících oba proteiny signifikantně vyšší u experimentálních zvířat ($F_{3,21}=10,474$, $p=0,000$). Experiment – zvířata vystavena stimulaci změnami magnetického pole, Kontrola – zvířata držena během experimentu v přirozeném magnetickém poli. Procenta v rámečcích udávají jaké procento pozitivních buněk bylo v jednotlivých částech sítnice experimentálních a kontrolních jedinců. Symboly zobrazují průměr a 95% konfidenční interval.

3.3.3 Srovnání v počtu pozitivních buněk v GCL

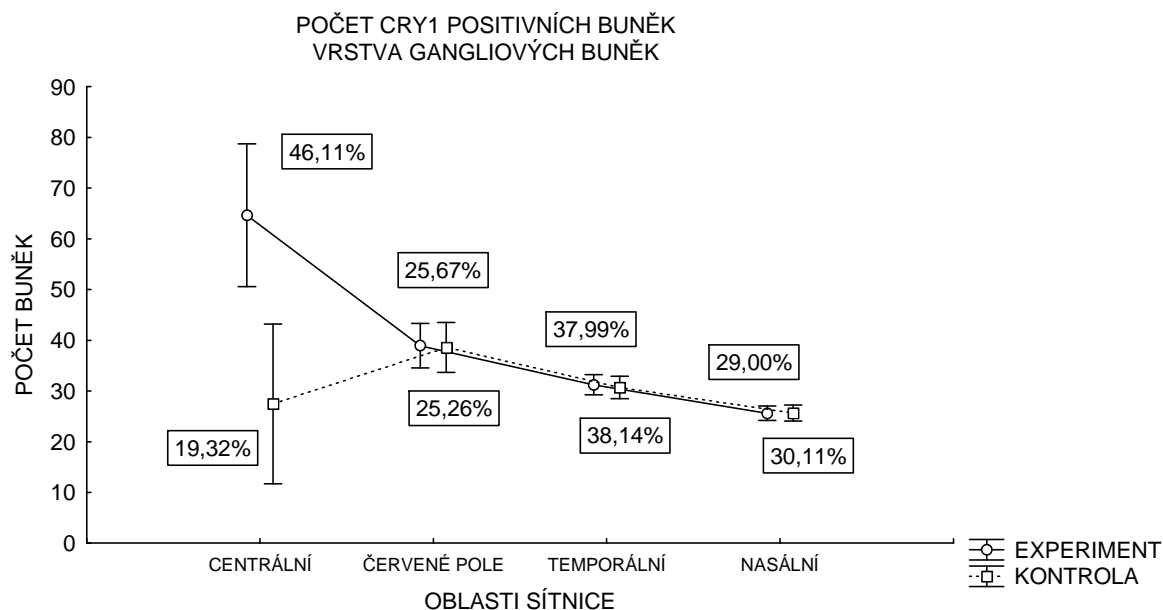
Vrstva gangliových buněk byla druhou kvantitativně vyhodnocovanou vrstvou. V této vrstvě bylo obecně více kryptochrom 1 i 2 pozitivních buněk než ve INL, ale počet c-Fos pozitivních buněk byl výrazně nižší než v INL.

CRY1 v GCL

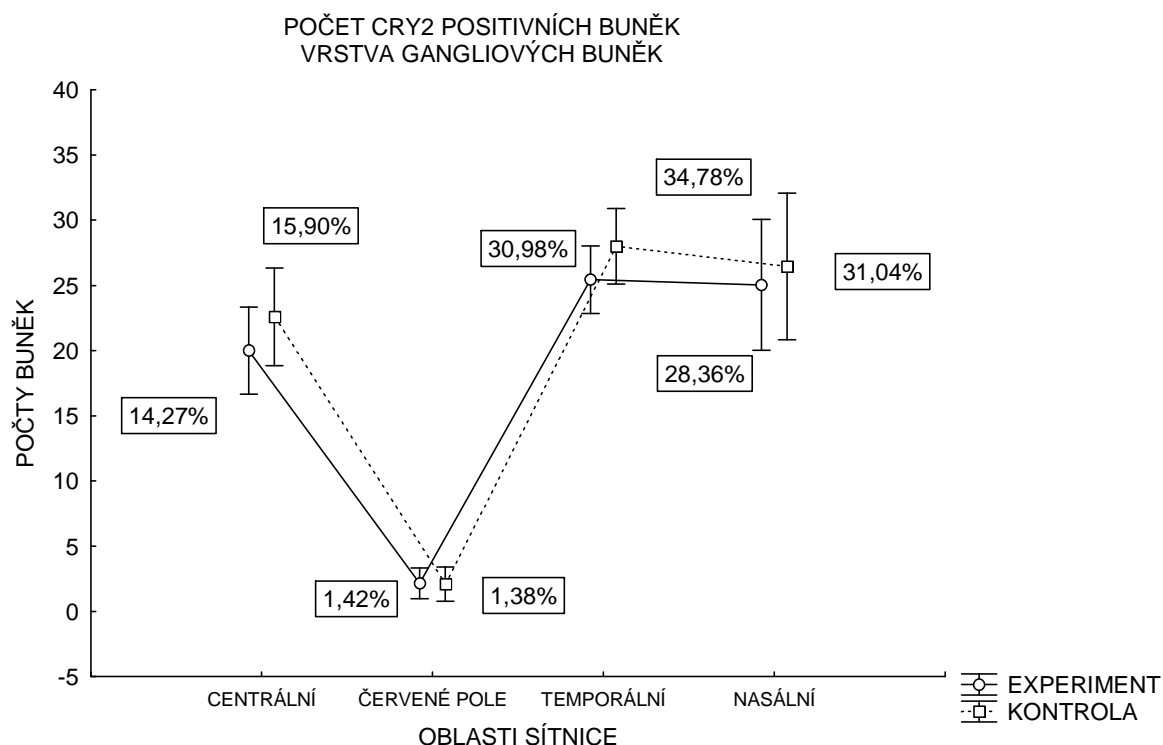
Statisticky průkazný rozdíl byl pozorován v počtu kryptochrom pozitivních buněk mezi experimentálními a kontrolními jedinci ($p=0,012$). Rozdíl existuje také mezi jednotlivými částmi sítnice ($p=0,000$). To dokládá tabulka 4. Graf 7 a tabulka s výsledky mnohonásobného porovnání (viz přílohy tabulka - 7) však ukazuje, že jediná se liší část sítnice A u experimentálních zvířat od všech ostatních částí. Mezi zbylými částmi neexistuje žádný statisticky průkazný rozdíl. Z toho důvodu lze pochybovat o věrohodnosti pozorovaného statistického rozdílu mezi kontrolními a experimentálními jedinci (více v diskusi). Nevěrohodnost rozdílu mezi experimentálními a kontrolními jedinci v počtu CRY1 pozitivních buněk GCL ukazují také procentuální zastoupení těchto buněk. Zatímco v centrální sítnici je CRY1 pozitivních buněk více než dvojnásobek počtu CRY1 pozitivních buněk kontrolních jedinců, v ostatních částech sítnice se zastoupení těchto buněk mezi experimentálními a kontrolními jedinci neliší (graf 7).

CRY2 v GCL

CRY2 pozitivní buňky jsou poměrně hojně zastoupené v GCL. Rozdíl v jejich počtu mezi kontrolními a experimentálními jedinci nebyl průkazný ($p=0,244$). To dokládá tabulka 4 a zobrazuje graf 8. Data však opět ukazují výrazný rozdíl mezi jednotlivými částmi sítnice ($p=0,000$). Z grafu 8 a tabulky výsledků mnohonásobného porovnání jednotlivých částí sítnice (viz přílohy – tabulka 8) je patrné, že mezi odpovídajícími částmi sítnice experimentálních a kontrolních jedinců nebyl zaznamenán žádný statisticky průkazný rozdíl. To také dokládá neprokazatelná korelace mezi těmito dvěma vlivy. Získaný výsledek podporují také procenta CRY2 pozitivních buněk v jednotlivých částech experimentálních a kontrolních sítnic (graf 8). Velmi zajímavý je propad počtu CRY2 pozitivních buněk v sítnici z oblasti červeného pole, kde je počet těchto buněk přibližně 10-15 krát menší než v ostatních částech sítnice.



Graf 7. Srovnání počtu kryptochrom 1 pozitivních buněk u experimentálních a kontrolních zvířat v rámci jednotlivých částí sítnice; v centrální sítnici je počet Cry1 pozitivních buněk signifikantně vyšší u experimentálních zvířat ($F_{3,21}=17,794$, $p=0,000$). Experiment – zvířata vystavena stimulaci změnami magnetického pole, Kontrola – zvířata držena během experimentu v přirozeném magnetickém poli. Procenta v rámečcích udávají jaké procento pozitivních buněk bylo v jednotlivých částech sítnice experimentálních a kontrolních jedinců. Symboly zobrazují průměr a 95% konfidenční interval.



Graf 8. Srovnání počtu kryptochrom 2 (Cry2) pozitivních buněk u experimentálních a kontrolních zvířat v rámci jednotlivých částí sítnice; počty Cry-2 pozitivních buněk se významně neliší ($F_{3,21}=0,414$, $p=0,745$). Experiment – zvířata vystavena stimulaci změnami magnetického pole, Kontrola – zvířata držena během experimentu v přirozeném magnetickém poli. Procenta v rámečcích udávají jaké procento pozitivních buněk bylo v jednotlivých částech sítnice experimentálních a kontrolních jedinců. Symboly zobrazují průměr a 95% konfidenční interval.

c-Fos v GCL

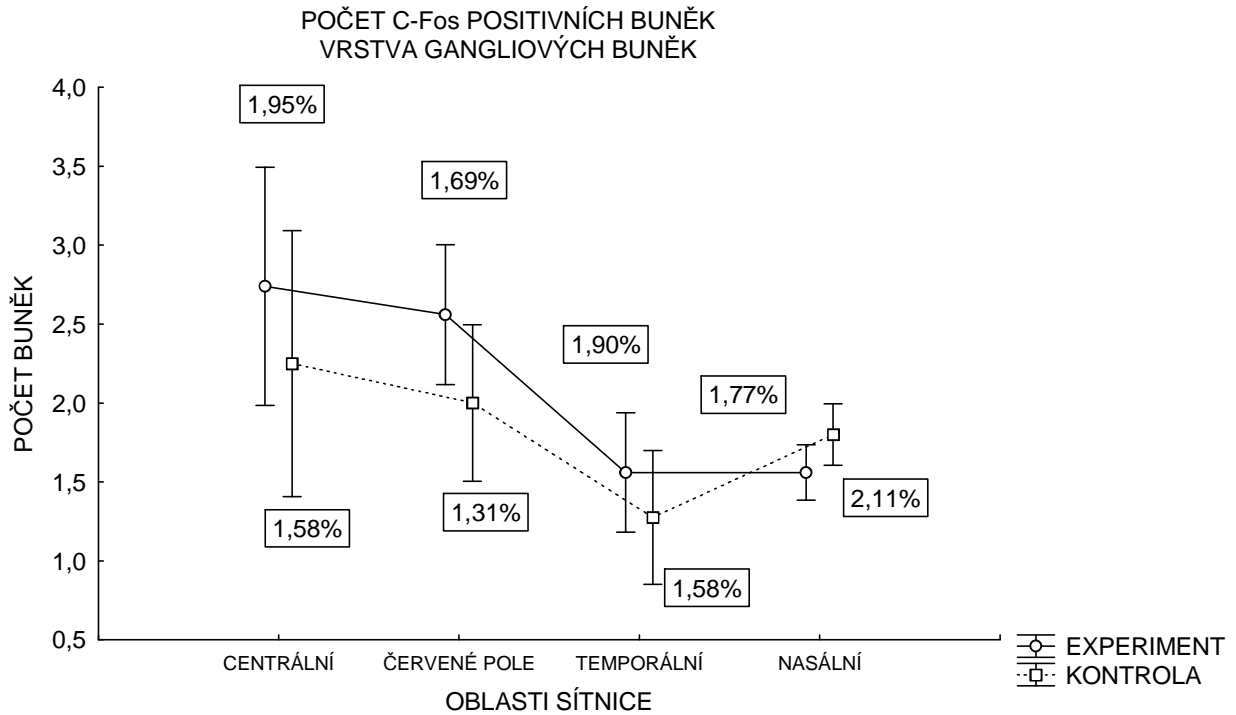
Na rozdíl od vnitřní jaderné vrstvy, ve vrstvě gangliových buněk nebyl pozorován statisticky průkazný rozdíl mezi kontrolními a experimentálními jedinci v počtu c-Fos pozitivních buněk - aktivovaných neuronů ($p=0,081$). Tuto skutečnost dokumentuje tabulka 4 a graf 9. Mezi jednotlivými částmi sítnice jsou prokazatelné rozdíly ($p=0,000$), ale tyto rozdíly nepodporují rozdílnost experimentálních a kontrolních jedinců ($p=0,305$). Neprůkaznost rozdílu mezi experimentálními a kontrolními jedinci v počtu c-Fos pozitivních buněk dokládá tabulka mnohonásobného porovnání (viz přílohy – tabulka 9) a také procentuální zastoupení těchto buněk v jednotlivých částech sítnice. Vidíme, že procenta ukazují nedostatečný rozdíl na to aby byl statisticky průkazný (graf 9).

CRY1+c-Fos v GCL

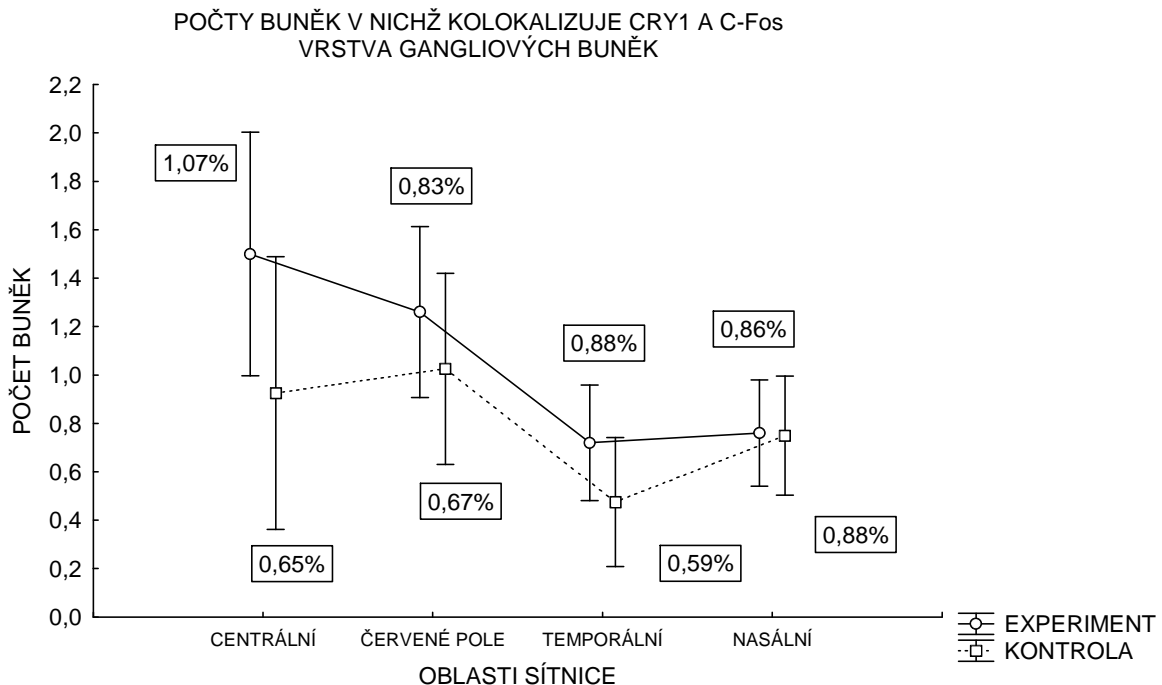
Poslední statisticky porovnávanou charakteristikou je rozdíl v počtu buněk, ve kterých kolokalizuje kryptochrom 1 spolu s markerem neuronální aktivity (c-Fos). Mezi experimentálními a kontrolními jedinci byl pozorován statisticky průkazný rozdíl v počtu těchto buněk ($p=0,009$). Mezi jednotlivými částmi sítnice byl také zaznamenán statistický významný rozdíl ($p=0,003$), ale mezi těmito dvěma charakteristikami není žádná korelace ($p=0,436$). To také dokládá tabulka 4. Z grafu 10 a tabulky mnohonásobných porovnání však vidíme, že mezi jednotlivými odpovídajícími částmi sítnice experimentálních a kontrolních zvířat není žádný statisticky průkazný rozdíl (tabulka mnohonásobných porovnání viz příloha – tabulka 10). Nemůžeme proto pozorovaný rozdíl brát příliš v úvahu a musíme se spíše přiklonit k tomu, že mezi experimentálními a kontrolními jedinci v počtu c-Fos+CRY1 pozitivních buněk není statisticky průkazný rozdíl. Musíme si také uvědomit, že se v tomto případě (CRY1+c-Fos pozitivní buňky v GCL) jedná o jednotky buněk v rozmezí od 0,5 až 2 buňky na hodnocený úsek sítnice, a proto tyto velmi nízké hodnoty mohou zkreslit výsledky statistických testů.

Z procentuálního zastoupení buněk obsahujících CRY1 i c-Fos vidíme, že mezi experimentálními a kontrolními částmi sítnice nejsou výraznější rozdíly až na oblast centrální sítnice, kde je počet kolokalizací pravděpodobně ovlivněn velkým počtem CRY1 pozitivních buněk v této části sítnice (viz oddělení **CRY1 v GCL**, graf 7).

Je zajímavé, že procentuálně vyjádřené zastoupení kolokalizujících buněk ze všech CRY1 a c-Fos pozitivních buněk není (na rozdíl od vnitřní jaderné vrstvy) příliš rozdílný mezi experimentálními a kontrolními jedinci (pro jednotlivé oblasti sítnice uvádí tabulka 3).



Graf 9. Srovnání počtu c-Fos pozitivních buněk u experimentálních a kontrolních zvířat v rámci jednotlivých částí sítnice; počty c-Fos pozitivních buněk se významě neliší ($F_{3,21}=1,284$, $p=0,305$). Experiment – zvířata vystavena stimulaci změnami magnetického pole, Kontrola – zvířata držena během experimentu v přirozeném magnetickém poli. Procenta v rámečcích udávají jaké procento pozitivních buněk bylo v jednotlivých částech sítnice experimentálních a kontrolních jedinců. Symboly zobrazují průměr a 95% konfidenční interval.



Graf 10. Srovnání počtu buněk ve kterých kolokalizuje CRY1 a c-Fos u experimentálních a kontrolních zvířat v rámci jednotlivých částí sítnice; počty buněk exprimujících oba proteiny se významě neliší ($F_{3,21}=0,946$, $p=0,436$). Experiment – zvířata vystavena stimulaci změnami magnetického pole, Kontrola – zvířata držena během experimentu v přirozeném magnetickém poli. Procenta v rámečcích udávají jaké procento pozitivních buněk bylo v jednotlivých částech sítnice experimentálních a kontrolních jedinců. Symboly zobrazují průměr a 95% konfidenční interval.

3.4 SHRNU TÍ VÝSLEDKŮ

V tomto odstavci shrnuji nejzajímavější z výše zmíněných výsledků.

- Kryptochrom 1 a 2 spolu v buňkách sítnice nekolokalizují, jsou tedy exprimovány v různých neuronálních populacích..
- S markrem neuronální aktivity c-Fos kolokalizuje jen kryptochrom 1.
- Kryptochrom 1 i 2 jsou lokalizovány v cytosolu buněk.
- Mezi experimentálními a kontrolními jedinci byl v INL pozorován rozdíl v počtu buněk exprimujících kryptochrom 1, c-Fos a v počtu buněk exprimujících oba tyto proteiny.
- V počtu CRY2 pozitivních buněk nebyl pozorován rozdíl mezi experimentálními a kontrolními jedinci.
- Mezi experimentálními a kontrolními jedinci byly zaznamenány rozdíly v odpovídajících částech sítnice jen v INL (vnitřní jaderné vrstvě).
- Mezi experimentálními a kontrolními jedinci byly zaznamenány rozdíly v centrální sítnici, v oblasti červeného pole a v temporální sítnici. V nasální sítnici nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly.

Tyto výsledky demonstrují, že INL sítnice obsahuje populaci magnetoresponzivních neuronů, která je pravděpodobně zapojena v detekci magnetického pole nebo se podílí na zpracování magnetické informace. Specifická aktivace byla rovněž pozorována v Cry1 pozitivních buňkách, což je v souladu s předpokládanou rolí kryptochromu 1 v transdukci magnetické informace v elektrický signál.

4. **DISKUSE**

Jak bylo detailněji shrnuto v úvodu této práce, recentně navržený model předpokládá, že magnetický kompas ptáků je založen na chemických reakcích, při nichž vznikají radikálové páry (Ritz et al. 2000). Spinové stavy radikálových párů mohou být, s pravděpodobností závislou na orientaci molekuly vzhledem k magnetickému poli, ovlivněny magnetickým polem Země. Hypotetickým místem primárních transdukčních procesů jsou fotoreceptory nebo vnitřně fotosenzitivní neurony v hlubších vrstvách sítnice. Kandidátní magnetotransdukční molekulou jsou kryptochromy. Pro tyto hypotézy však stále chybí experimentální podpora. V této práci jsem se pokusil tyto předpoklady experimentálně testovat.

S použitím indukovatelného transkripčního faktoru c-Fos jakožto markeru aktivace jsem studoval vliv magnetické stimulace na aktivitu v sítnici holuba skalního. Zvláštní důraz jsem kladl na případnou magneticky indukovanou aktivitu v Cry1 nebo Cry2 pozitivních neuronech. Předložená práce nejen přináší nová data o lokalizaci kryptochromů v sítnici holuba, ale především demonstruje vliv magnetické stimulace na expresi kryptochromu 1 a na aktivitu sítnice. Po stimulaci experimentálních jedinců periodickou manipulací vertikální komponenty magnetického pole byl pozorován rozdíl v počtu aktivovaných (tj. c-Fos exprimujících) neuronů sítnice, buněk obsahujících kryptochrom 1 (CRY1) i v počtu aktivovaných CRY1 pozitivních neuronů (kolokalizace CRY1+c-Fos). Tyto výsledky jsou ve shodě s teorií radikálových párů, naznačují roli CRY1 v primárním magneto-transdukčním procesu a zapojení vnitřní jaderné vrstvy sítnice v percepci/procesování magnetické informace.

Prací zabývajících se kryptochromy v sítnici není příliš mnoho a to především pro komplikace spojené se studiem sítnic u obratlových modelů a kvůli problematickému omezení vnějších vlivů na fyziologii sítnice. Přesto (a možná právě proto) se mezi takovými pracemi najdou často dost rozporuplné výsledky. I naše výsledky jsou s některými pracemi v souladu a s jinými v rozporu. Jejich srovnání a podrobná analýza budou náplní následujících odstavců.

4.1 LOKALIZACE KRYPTOCHROMŮ A c-Fosu V SÍTNICI

Nejvíce CRY1 a CRY2 pozitivních buněk bylo pozorováno v GCL. Přibližně 25% gangliových buněk je Cry 1 pozitivních u kontrolních zvířat, 35% pak u zvířat experimentálních. Relativní počet Cry2 pozitivních gangliových buněk se pohyboval u

kontrolních i experimentálních zvířat na úrovni 15%. Tato zjištění se liší od výsledků Mouritsena a kol. (2004), kteří bohužel hodnotili jen CRY1 a udávají, že u pěnice slavíkové se relativní počet CRY1 pozitivních gangliových buněk pohybuje na úrovni 95 -100%. V INL bylo CRY1 pozitivních buněk kolem 0,8% u kontrolních a 1,2% u experimentálních zvířat; CRY2 pozitivních buněk cca 0,03%. Mouritsena a kol. (2004) naproti tomu expresi na úrovni 10-15%. Tyto výrazné rozdíly pravděpodobně odrážejí mezidruhovou variabilitu.

Zde prezentované výsledky ukazují kryptochromy zejména v GCL, méně pak v INL. Toto zjištění nachází oporu v mnohých předchozích pracích (Mouritsen et al 2004, Miyamoto et Sancar 1998, Partch et Sancar 2005, Thompson et al. 2003, Ruan et al. 2006), ale někteří autoři popisují trochu jiné rozložení (Bailey et al. 2002 – CRY2 hlavně v INL méně v GCL, Haque et al. 2002 – CRY1 dokonce ve fotoreceptorech).

Je zajímavé, že práce analyzující sítnici savčích modelů uvádějí větší množství proteinu CRY2 oproti CRY1. V této práci jsem zaznamenal opačný poměr. Ačkoli to vypadá na zarážející rozdíl, není to v rozporu s námi představenými výsledky. Může to být jednoduše vysvětleno rozdílným způsobem kvantifikace exprese. Zatímco většina prací používá ke kvantifikaci mRNA (real-time PCR), případně northern blotting, já jsem se zaměřil na počítání pozitivních buněk a je možné, že počet proteinů v těchto buňkách může být výrazně na straně CRY2. Je navíc důležité si uvědomit, že tyto údaje se mohou lišit i mezi druhy, natož mezi savci a ptáky.

Zde je také velmi důležité upozornit na to, že kryptochromy, jakožto proteiny zapojené do cirkadiality, mají přirozeně cyklickou expresi s maximem v noci. Většina prací citovaných v této části se zabývá právě expresí kryptochromů v sítnici z hlediska cirkadiality, ale i přesto není zcela jasné, jakou roli kryptochromy sítnice v cirkadialitě zastávají, ani zda je jejich transkripce v sítnici opravdu cirkadiální (konstantní exprese - Miyamoto et Sancar 1998, Thompson et al. 2003, cyklující exprese - Ruan et al. 2006, Park et Kang 2006). To jen dokládá, jak málo je známo o funkci a lokalizaci kryptochromů v sítnici obratlovců.

Množství c-Fos pozitivních buněk sítnice u ptáku během tahového neklidu diskutují ve své práci Mouritsen a kol. (2004), kteří udávají, že c-Fos pozitivní byly takřka všechny gangliové buňky, zatímco jiné typy buněk byly pozitivní jen vzácně. To je ve výrazném rozporu s mými daty a s daty dalších autorů (Nir et Agarwal 1993), kteří popisují shodně s námi největší expresi v INL a mnohem slabší expresi v GCL. Nir a Agarwal (1993) se ve svém článku zabývají cirkadiální změnou exprese a distribucí c-Fosu v sítnici a jejich výsledky jsou v rozporu s interpretací výsledků Mouritsenem a kol. (2004) týkajících se detekce magnetosensitivních buněk (více dále v textu).

4.2 VNITROBUNĚČNÁ LOKALIZACE KRYPTOCHROMŮ

V otázce buněčné lokalizace kryptochromu nejsou autoři jednotní. U kryptochromu 1 se zde prezentovaná data, která u holubů ukazují lokalizaci CRY1 v cytosolu, shodují s výsledky Mouritsena a kol. (2004) a potvrzují to i jiní autoři na myši (Kobayashi et al. 1998).

Vnitrobuněčnou lokalizací CRY 2 se zabývali například Thompspon a kol. (2003), ve shodě s naší studií demonstrovali cytoplasmatickou lokalizaci CRY2 se shoduje s mým výsledkem. To je ovšem v rozporu se zjištěním jiných autorů (Mouritsena a kol. 2004, Kobayashi et al. 1998), kteří ho popisují jako jaderný. Kobayashia kol. (1998) však svoje výsledky vyvozují z experimentů na buněčných kulturách hepatocytů, což může dávat odlišné výsledky od lokalizace přímo v tkáni sítnice. Thompson a kol. (2003) přináší pro cytoplasmatickou lokalizaci velmi silné důkazy založené na rozdělení buněčného obsahu centrifugací a následných analýzách obsahu proteinu v těchto frakcích.

Ačkoli se může zdát, že boj o lokalizaci kryptochromů v sítnici je malicherností, je tomu právě naopak. Vnitrobuněčná lokalizace proteinu jasně určuje děje do kterých může a do kterých nemůže zasahovat (většinou autorů jde hlavně o to, zda CRY fungují jen ve zpětnovazebné smyčce cirkadiálních hodin - jádro, nebo se podílejí také na seřizování endogenních hodin s vnější fotoperiodou – cytoplasma).

Ritze a kol. (2000) předpokládají, že primární magneto-transduční molekula musí být pro případné zapojení kryptochromu v teorii radikálových párů lokalizována v cytoplasmě, což podle mých výsledků splňují kryptochromy oba a podle obecně uznávaných výsledků určitě alespoň CRY1.

4.3 DISTRIBUCE POSITIVNÍCH BUNĚK V RÁMCI SÍTNICE

Ze zde prezentovaných výsledků vidíme, že distribuce kryptochromu pozitivních buněk v rámci sítnice není příliš variabilní. Zaměříme-li se na počet pozitivních buněk v normálním stavu (u kontrolních jedinců) vidíme, že počet pozitivních buněk se pro jednotlivé části sítnice příliš nemění (více tabulky mnohonásobného porovnávání, srovnání mezi kontrolami – přílohy). Tento fakt potvrzují ve svých pracích i další autoři popisující distribuci CRY1 a CRY2 jako rovnoměrnou (Foster et al. 1991, Miyamoto et Sancar 1998, Thompson et al. 2003). Jakmile se ale zaměříme na distribuci CRY1 pozitivních buněk v sítnici experimentálních jedinců, vidíme, že mezi jednotlivými hodnocenými částmi sítnice jsou výrazné rozdíly. Zejména v INL, kde byly zaznamenány statisticky průkazné rozdíly se

ukazuje, že největší změně CRY1 pozitivních buněk došlo v centrální sítnici a v oblasti červeného pole. Menší ale rovněž prokazatelný rozdíl byl zaznamenán v temporální sítnici. Tato data nejsou doposud publikována jinými autory, a proto není možné je srovnat. Ukazují však na důležitost experimentálního rozdělení sítnice do několika částí, protože rozdíly mezi jednotlivými částmi by příliš zvýšily varianci testovaného souboru, která by mohla zamaskovat existující rozdíly.

4.4 SROVNÁNÍ SÍTNIC EXPERIMENTÁLNÍCH A KONTROLNÍCH JEDINCŮ

Pokud je nám známo neexistuje studie srovnávající expresi aktivních markerů v sítnici mezi jedinci stimulovanými změnami magnetického pole země a jedinci v přirozeném magnetickém poli. Mé výsledky jsou proto jen velmi těžko srovnatelné s jinými experimenty. Nejvýraznější rozdíly mezi experimentálními a kontrolními jedinci jsme zaznamenali ve vnitřní jaderné vrstvě – INL. V této vrstvě se od sebe experimentální a kontrolní jedinci lišili počtem CRY1 pozitivních buněk, c-Fos pozitivních buněk a počtem buněk v nichž tyto dva proteiny kolokalizovaly. U experimentálních jedinců tvořily kolokalizující buňky větší podíl ze všech CRY1 pozitivních buněk v INL než u kontrolních jedinců (experiment – asi 20%, kontrola – asi 10%). Stejně tomu bylo u podílu kolokalizujících buněk ze všech c-Fos pozitivních buněk v INL (experiment – asi 23%, kontrola – asi 17%).

Podobnou práci publikovali také Mouritsen a kol. (2004), kteří srovnávali počet CRY1, c-Fos a CRY1+c-Fos pozitivních buněk mezi dvěma druhy ptáků ve dne a v noci. Jejich práce (přestože byla publikována) obsahuje několik sporných momentů. Za hlavní problém této práce považují srovnání dvou druhů ptáků (zebričky šedé- *Taeniopygia guttata* a pěnice slavíkové – *Sylvia borin*) z nichž jeden je tažný a druhý ne. Mezi těmito ptáky je však také výrazný rozdíl v denní aktivitě, zatímco zebrička je striktně denní pták, pěnkava vykazuje v době tahu soumráchnou až noční aktivitu. Na tom také Mouritsen a kol. (2004) postavili důkaz zapojení CRY1 v magnetorecepci. Vycházejí v této práci z toho, že pěnice táhne v noci a proto se musí magneticky orientovat v noci. Proto srovnávají expresi CRY1 a c-Fosu mezi těmito druhy v noci a ve dne. Zvýšenou expresi CRY1 a c-Fosu v noci pak mylně interpretují, jako důkaz zapojení CRY1 v magnetorecepci. V této práci však chybí jakákoli kontrolní skupina a navíc jsou zanedbány vlivy cirkadiální exprese těchto proteinů, která byla prokázána v sítnici savců. Oba charakterizované proteiny (CRY1 i c-Fos) podléhají cyklům exprese s maximem právě v noci (Nir et Agarwal 1993, Sancar 2000, Park et Kang 2006 a další). To by mohlo vysvětlovat rozdíly v expresi získané Mouritsenem a kol. (2004). Také

výsledky těchto autorů popisující kolokalizaci především v GCL, kde kolokalizovalo 95-100% (jak uvádějí sami autoři) je dost podezřelé a v rozporu s mými daty.

Oproti tomu výsledky prezentované v této práci jasně ukazují, že stimulace změnami magnetického pole má výrazný vliv na fyziologii sítnice. Ptáci stimulovaní změnami magnetického pole měli mnohem více aktivních neuronů, než jedinci kontrolní. Rozdíly v počtu aktivních neuronů sítnice (zejména INL) indikují, že na úrovni sítnice docházelo během experimentu ke zpracování velkého množství informací, které byly procesovány do centrální nervové soustavy.

Pro rozdíly v počtu CRY1 pozitivních buněk (hlavně jen v INL) mezi kontrolními a experimentálními jedinci již nemám tak jednoduché vysvětlení. Zvýšené množství CRY1 pozitivních buněk je pravděpodobně dáno velmi masivní expresí CRY1, která následovala stimulaci magnetickým polem země. Expresie musí být velmi rychlá vzhledem k tomu, že vlastní experiment trval 70 minut. To může být vysvětleno několika způsoby. Jedním je, že v buňkách je nasyntetizováno velké množství mRNA, a stimulací magnetickým polem může být zpuštěna velmi rychlá translace. Dalším vysvětlením může být přítomnost proteinu v buňkách v různých konformacích. Jedna z těchto konformací může způsobit nesnadný přístup protilátek k antigennímu epitopu (doc. I. Šauman – ústní sdělení). Odpovědi na tyto otázky by poskytlo zopakování tohoto experimentu a stanovení množství CRY1 mRNA v sítnicích ptáků.

Ve vrstvě gangliových buněk nebyla pozorována příliš velká variabilita mezi jednotlivými oblastmi sítnice kontrolních ani experimentálních jedinců. Výrazný rozdíl byl pozorován jen v počtu CRY1 pozitivních buněk v centrální oblasti sítnice mezi experimentálními a kontrolními jedinci. Tento výsledek však podle mého mínění není příliš důvěryhodný. Tomu nasvědčuje skutečnost, že ve zbylých třech hodnocených oblastech sítnice je počet CRY1 pozitivních buněk v GCL u kontrolních a experimentálních jedinců naprosto stejný. Jediné vysvětlení vzniku tohoto artefaktu, které mě napadá, je nešťastný náhodný výběr částí nabarvených sítnic při pořizování fotografií. Je možné, že byly vybrány zrovna oblasti s velkým počtem CRY1 pozitivních buněk na experimentálních sítnicích. Jestli je rozdíl způsoben právě nešťastným výběrem, nebo je náznakem nějaké funkce těchto buněk by mohlo odhalit pořízení a vyhodnocení většího množství fotografií této oblasti sítnice.

Jinými experimenty se stimulací zvířat změnami magnetického pole se zabývali především Nemeč a kol. (2001), kteří pomocí magnetické stimulace a imunolokalizace proteinu c-Fos identifikovali na savčím modelu (rypoš druhu *Cryptomys anselli*) populaci magnetoresponzivních neuronů v *superior collikulus*. Toto podkorové centrum

pravděpodobně integruje magnetickou informaci se senzory vstupy z ostatních modalit. Podobné ještě nepublikované experimenty byly provedeny také na holubech, u kterých na stimulaci změnami magnetického pole reagovaly části hypokampu (Nemec, osobní sdělení).

4.5 TEORIE RADIKÁLOVÝCH PÁRŮ

Zde představené výsledky naznačují, že by sítnice mohla být zapojena ve vnímání magnetického pole země. Podněty, kterými byly vyvolány změny odehrávající se na sítnici (změny vertikální složky magnetického pole – změny inklinace), odpovídají teorii o fungování inklinálního kompasu, který byl na základě behaviorálních experimentů u ptáků předpovězen (Wiltschko et Wiltschko 1972).

Zapojení kryptochromu do magnetorecepce a lokalizace magnetoreceptivní tkáně v oku, odpovídá teorii radikálových párů, kterou do podrobnosti rozpracovali Ritz a kol. (2000). Tito autoři na základě teorie radikálových párů předpověděli roli fotoreceptorů v na světle závislé magnetorepci. Jako možný fotoreceptor navrhuje kryptochrom a obratlovčí oko jim připadá, jako místo vhodné k magnetorepci. Naše data tedy přinášejí experimentální podporu této teoretické práci. Můžeme také tvrdit, že s největší pravděpodobností je v magnetorepci ptáků zapojen spíše CRY1 než CRY2 to tvrdí také Mouritsen a kol (2004), ale i jiní autoři (Möller et al. 2004). Ritz a kol. (2000) jdou ve svých teoriích ještě dál a předpokládají, že magnetické pole přímo ovlivňuje efektivitu transdukce světla v elektrický signál, a že tudíž magnetická informace je vnímána jako komplexní zrakový vjem. Námí zaznamenaná nízká aktivita v gangliových buňkách (1,59 % gangliových buněk je c-Fos pozitivních) podporuje spíše představu paralelního procesování magnetické informace. (předpokládá existenci specifického typu gangliových buněk, které procesují magnetický směrový signál odděleně od zrakové percepce).

4.6 NA SVĚTLE ZÁVISLÁ MAGNETORECEPCE

Za posledních několik let se nashromáždila velká řada experimentů potvrzujících existenci na světle závislé magnetorecepce, založené na chemické reakci a ovlivněné magnetickým polem země (pro přehled Wiltschko et Wiltschko 2005). Výsledky těchto experimentů jsou ze široké škály biologických i biofyzikálních oborů a přinášejí řadu velmi věrohodných argumentů, které dávají odpovědi na nejčastější výtky odpůrců tohoto typu magnetorecepce (Kirschvink et al. 2001, Walker et al 2002) . Výsledky tohoto experimentu jednoznačně podporují roli sítnice v magnetorepci holuba a tudíž experimentální podporu pro magnetorepci závislou na světle.

4.7 SMĚŘOVÁNÍ DALŠÍHO VÝZKUMU

Do dnešní doby se nastřádala řada především behaviorálních experimentů, ze kterých vychází mnoho hypotéz a testovatelných předpokladů. Dnes musí přijít na řadu trochu odlišný přístup, který bude oěřovat pravdivost těchto hypotéz a splnitelnost všech předpokladů. Jako další krok ve snaze pochopit funkci a podstatu magnetického smyslu je třeba se více zabývat experimenty, v nichž se kombinují behaviorální testy s moderními metodami molekulární biologie a umožňují testovat platnost na základě behaviorálních testů formulovaných hypotéz.

Za velmi nadějně považuji zejména snažení Johna Philipse a kol., kteří prokázali magnetorecepci na dvou modelových laboratorních druzích (octomilka a myš) (myš - Muheim et al 2006 a octomilka - Phillips - nepublikovaná data). U těchto jedinců jsou vytvořeni mutanti v genech kryptochromů. Dostatečně silná behaviorální esej provedená s normálními a mutantními jedinci by měla jednoznačně rozřešit zapojení kryptochromu v magnetorecepci.

Experiment presentovaný v této práci nabízí řadu směrů, kterými by se měl rozvíjet. Velmi zajímavá by byla kombinace zde uvedeného imunohistochemického přístupu s dalšími kvantifikacemi kryptochromu v sítnici. Kvantifikace by mohla probíhat na úrovni mRNA (RT-PCR) i na úrovni proteinu (kvantifikovaný western blot). Takto získaná data by umožnila přesnější srovnání množství jednotlivých produktů a mohla by také přinést zajímavé informace o dynamice těchto produktů.

Velkým přínosem a zajímavým přispěním nejen na pole fyziologie magnetorecepce, ale také cirkadiality by bylo určení vnitrobuněčné lokalizace kryptochromů. Je třeba s jistotou určit, nejen zda se kryptochromy nacházejí v jádře či v cytoplasmě, ale na jaké struktury jsou napojeny a jak to může ovlivnit jejich funkce. Z uložení v cytoplasmě mě napadají minimálně dvě možné lokalizace. První na cytoskeletu v celém objemu buňky a druhé vázané na membránu buňky v celé její délce. Tento problém by bylo možné vyřešit pomocí elektronové mikroskopie neuronů sítnice.

Teorie radikálových párů vychází z poměru proteinů v tripletovém a singletovém stavu. Tyto produkty se od sebe liší jen velmi nepatrně (změnou spinů elektronů). Hypoteticky se předpokládá, že singletové a tripletové stavy vedou k různým signálním kaskádám. Myslím si proto, že dokud nebudeme schopni detekovat změny v poměrech singletových a tripletových reakčních produktů a nebudeme schopni biochemicky charakterizovat návazné děje, bude pro nás fyziologie magnetického smyslu stále nerozřešeným tajemstvím.

5. LITERATURA:

- Bailey M. J., Chong N. W., Xiong J., Cassone V. M. 2002.** Chickens' Cry2: molecular analysis of an avian cryptochrome in retina and pineal photoreceptors. *FEBS letters*. 513, 169-174.
- Batcheler S., Kay C., McLaughlan K., Shkrob I. 1993.** Time-resolved and modulation methods in the study of the effects of magnetic fields on the yields of free radical reactions. *Journal of Physiological Chemistry*. 97, 13250–13258.
- Beason R.C., Semm P. 1996.** Does the avian optic nerve carry magnetic navigational information? *Journal of experimental biology*. 199, 1241-1244.
- Blakemore R. P. 1975.** Magnetotactic bacteria. *Science*. 190, 377-379.
- Boles L. C., Lohmann K. J. 2003.** True navigation and magnetic map in spiny lobsters. *Nature*. 421, 60–63.
- Burda H., Marhold S., Westenberger T., Wiltshko R., Wiltschko W. 1990.** Magnetic compass in the subterranean rodent *Cryptomys hottentotus* (Bathyergidae). *Experientia*. 46, 528–530.
- Campbell W. H. 2001.** Earth magnetism – a guided tour through magnetic fields. *A Hartcourt Science and Technology Company*. San Diego, California, USA.
- Cashmore A., Jarillo J., Wu Y-J., Liu D. 1999.** Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science*. 284, 760–765.
- Deutschlander M., Borland S., Phillips J. 1999.** Extraocular magnetic compass in newts. *Nature*. 400, 324 – 325.
- Dusenbery, D. B. 1992.** Sensory Ecology. *W.H.Freeman company press*, New York. Page 28.
- Egan E. S., Franklin T. M., Hilderbrand-Chae M. J., McNeil G. P., Roberts M. A., Schroeder A. J., Zhang X., Jackson F. R. 1999.** An extraretinally expressed insect cryptochrome with similarity to the blue light photoreceptors of mammals and plants. *The journal of neuroscience*. 19 (10), 3665 – 3673.
- Emery P., Stanewsky R., Hall J. C., Rosbash M. 1998.** CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*. 95, 669-679.
- Eveson R. W., Timmel C. R., Brocklehurst B., Hore P. J., McLauchlan K. A. 2000.** The effects of weak magnetic fields on radical recombination reactions in micelles. *International journal of radiation biology*. 76, 1509–1522.
- Fisher J. H., Freake M.J., Borland S.C., Phillips J.B. 2001.** Evidence for the use of magnetic map information by an amphibian. *Animal behavior*. 62, 1-10.
- Fleissner G. E., Holtkamp-Rotzler E., Hanzlik M., et al. 2003.** Ultrastructural analysis of a putative magnetoreceptor in the beak of homing pigeons. *Journal of Comparative Neurology*. 458, 350–360.
- Foster R.G., Provencio I., Hudson D., Fiske S., DeGrip W., Menaker M. 1991.** Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). *Journal of Comparative Physiology A*. 169, 39–50.
- Fransson T., Jakobsson S., Johansson P., Kuellberg C., Lind J., Vallin A. 2001.** Magnetic cues trigger extensive refuelling. *Nature*. 414, 35.
- Gauger M. A., Sancar A. 2005.** Cryptochrome, circadian cycle, cell cycle checkpoints, and cancer. *Cancer Research*. 65 (15), 6828-6834.
- Giovani B., Byrdin M., Ahmad M., Brettel K. 2003.** Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Nature Structural Biology*. 6, 489–490.
- Gould J.L., Kirschvink J.L., Deffeyes K.S. 1978.** Bees have magnetic remanence. *Science*. 201,1026-1028.

- Hanzlik M., Heunemann C., Holtkamp-Rotzler E., Winklhofer M., Petersen N., Fleissner G. 2000.** Superparamagnetic magnetite in the upper beak tissue of homing pigeons. *Biometals*. 13, 325-331.
- Haque R., Charausia S.S., Wessel J.H., Iuvone P.M. 2002.** Dual regulation of cryptochrome I mRNA expression in chicken retina by light and circadian oscillators. *Neuroreport*. 13, 2247–2251.
- Hong F. T. 1995.** Magnetic field effects on biomolecules, cells, and living organisms. *BioSystems*. 36:187–229.
- Johnsen S., Lohmann K. J. 2005.** The physics and neurobiology of magnetoreception. *Nature reviews neuroscience*. Published online 15 August 2005, doi: 10.1038/nrn1745.
- Kirschvink J.L., Gould J.L. 1981.** Biogenic magnetite as a basis for magnetic field sensitivity in animals. *Biosystems*. 13, 181-201.
- Kirschvink J. L., Kobayashi-Kirschvink, A. 1991.** Is geomagnetic sensitivity real? Replication of the Walker–Bitterman conditioning experiment in honeybees. *American Zoologist*. 31, 169–185.
- Kirschvink J. L., Walker M. M., Diebel C. D. 2001.** Magnetite-based magnetoreception. *Current Opinion in Neurobiology*. 11, 462-467.
- Kobayashi K., Kanno S., Smit B., Horst G. T. J., Takao M., Yasu A. 1998.** Characterization of photolyase/blue-light receptor homologs in mouse and human cells. *Nucleic acid research*, 26 (22), 5086-5092.
- Kobayashi Y., Ishikawa T., Hirayama J., Daiasu H., Kanai S., Toh H., Fukuda I., Tsujimura T., Terada N., Kamei Y., Zuba S., Iway S., Todo T. 2000.** Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. *Genes cells*. 5, 752-738.
- Leask M. 1977.** A physicochemical mechanism for magnetic field detection by migratory birds and homing pigeons. *Nature*. 267,144 –145.
- Lohmann K. J., Lohmann C. M. F. 1992.** Orientation to oceanic waves by green turtle hatchlings. *Journal of Experimental Biology*. 171, 1–13.
- Lohmann K.J., Lohmann C.M.F. 1993.** A light-independent magnetic compass in the leatherback sea turtle. *Biological Bulletin*. 185, 149–151
- Lohmann K. J., Lohmann C. M. F. 1994.** Detection of magnetic inclination angle by sea turtles: a possible mechanism for determining latitudes. *Journal of Experimental Biology*. 194, 23–32.
- Lohmann K. J., Lohmann C. M. F., Erhart L. M., Bagley D. A., Swing T. 2004.** Geomagnetic map used in sea-turtle navigation. *Nature*. 428, 909–910.
- Lohmann K. L., Johnsen S. 2000.** The neurobiology OF magnetoreception in vertebrate animals. *Trends in neuroscience*. 23, 153-159.
- Marhold S., Burda H., Wiltschko W. 1997.** A magnetic polarity compass for direction finding in a subterranean mammal. *Naturwissenschaften*. 84, 421–423.
- Miyamoto Y., Sancar A. 1998.** Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *PNAS*. 95, 6097–6102.
- Möller A., Sagasser S., Wiltschko W. 2004.** Retinal cryptochrome in migratory passerine bird: a possible transducer for the avian magnetic compass. *Naturwissenschaften*. 91, 585-588.
- Mora C. V., Davison M., Wild J. M., Walker M. M. 2004.** Magnetoreception and its trigeminal mediation in the homing pigeon. *Nature*. 432,508–511.

- Mouritsen H., Janssen-Bienhold U., Liedvogel M., Feenders G., Stalleicken J., Dircks P., Weiler R. 2004.** Cryptochrome and neuronal-activity markers colocalize in the retina of migratory birds during magnetic orientation. *PNAS*. 101 (39), 14294-14299.
- Muheim R., Edgar N. M., Sloan K. A., Phillips J. B. 2006.** Magnetic compass orientation in C57BL/6J mice. *Learning and Behavior*. 34 (4), 366-373.
- Murray R.W. 1962.** The response of the ampullae of Lorenzini of elasmobranchs to electrical stimulations. *Journal of Experimental Biology*. 39, 119-128.
- Nemec P., Altmann J., Marhold S., Burda H., Oelschlager H. H. A. 2001.** Neuroanatomy of Magnetoreception: The Superior Colliculus Involved In Magnetic Orientation in a Mammal. *Science*. 294, 366-368.
- Nir I., Agarwal N. 1993.** Diurnal expression of c-fos in the mouse retina. *Molecular Brain Research*. 19, 47-54.
- Paulin M. G. 1995.** Electroreception and the compass sense of sharks. *Journal of theoretical biology*. 174, 325-339.
- Park K., Kang H. M. 2006.** Circadian expression of clock genes in the rat eye and brain. *Molecules Cells*. 22 (3), 285-290.
- Partch C. L., Sancar A. 2005.** Photochemistry and photobiology of cryptochrome blue-light photopigments: The Search for a Photocycle. *Photochemistry and Photobiology*. 81, 1291-1304.
- Phillips J.B., Borland S.C. 1992.** Behavioral evidence for use of a light-dependent magnetoreception mechanism by a vertebrate. *Nature*. 359, 142-144.
- Phillips J. B., Borland S. C. 1994.** Use of a specialized magnetoreception system for homing by the eastern red-spotted newt *Notophthalmus viridescens*. *Journal of Experimental Biology*. 188, 275-291.
- Phillips J. B., Freake M. J., Borland S. C. 2002.** Behavioral titration of magnetic map coordinates. *Journal of Comparative Physiology A*. 188, 157-160.
- Phillips J.B., Schmidt-Koenig K., Muheim R. 2006.** True navigation: Sensory bases of gradient maps. In **Brown M.F., Cook R.G. (Eds.)**. *Animal Spatial Cognition: Comparative, Neural, and Computational Approaches*. [On-line]. Available: www.pigeon.psy.tufts.edu/asc/phillips/
- Prior H., Wiltschko R., Stapput K., Gunturkun O., Wiltschko W. 2004.** Visual lateralization and homing in pigeons. *Behav Brain Research*. 154, 301-310.
- Quinn T. P., Brannon E. L. 1982.** The use of celestial and magnetic cues by orienting sockeye salmon smolts. *Journal of Comparative Physiology*. 147, 547-552.
- Ritz T., Adem S., Schulzen K. 2000.** A Model for Photoreceptor-Based Magnetoreception in Birds. *Biophysical Journal*. 78, 707-718.
- Ritz T., Thalau P., Phillips J.B., Wiltschko R., Wiltschko W. 2004.** Resonance effects indicate a radical pair mechanism for avian magnetic compass. *Nature*. 429, 177-180.
- Roenneberg T., Foster G. R. 1997.** Twilight times: Light and the circadian system. *Photochemistry and photobiology*. 66, 5, 549-561.
- Ruan G.-X., Zhang D.-Q., Zhou T., Zamazaki S., McMahon D. G. 2006.** Circadian organization of the mammalian retina. *PNAS*. 103 (25), 9703-9708.
- Sancar A. 2000.** Cryptochrome: The second photoactive pigment in the eye and its role in circadian photoreception. *Annual reviews in biochemistry*. 69, 31-67.

- Semm P., Beason R.C. 1990.** Responses to small magnetic variations by the trigeminal system of the bobolink. *Brain Research Bulletin*. 25, 735-740.
- Semm P., Demaine C. 1986.** Neurophysiological properties of magnetic cells in the pigeon's visual system. *Journal of Comparative Physiology A*. 159, 619–625.
- Semm P., Nohr D., Demaine C., Wiltshko W. 1984.** Neural basis of the magnetic compass: interaction of visual, magnetic and vestibular inputs in the pigeon's brain. *Journal of Comparative Physiology A*. 155, 283–288.
- Schneider T., Thalau H.-P., Semm P., Wiltshko W. 1994.** Melatonin is crucial for the migratory orientation of pied flycatchers *Ficedula hypoleuca pallas*. *Journal of Experimental Biology*. 194, 255–262.
- Schuler D., Frankel R.B. 1999.** Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52, 464-473.
- Schulten K., Swenberg C., Weller A. 1978.** A biomagnetic sensory mechanism based on magnetic field modulated coherent electron spin motion. *Journal of Physiological Chemistry*. 111, 1–5.
- Stanewsky R., Kaneko M., Emery P., Beretta B., Wagner-Smith K., Kay S. A., Roshbach M., Hall J. C. 1998.** The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*. 95, 681-692.
- StatSoft, Inc. (2006).** STATISTICA (data analysis software system), version 8. www.statsoft.com.
- Thompson C.L., Rickman C.B., Shaw S.J., Ebright J.N., Kelly U., Sancar A., Rickman D.W. 2003.** Expression of the blue-light receptor cryptochrome in the human retina. *Investigative ophthalmology and Visual science*. 44 (10), 4515-4521.
- Thompson C. L., Sancar A. 2002.** Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock. *Oncogene*. 21, 9034-9056.
- Todo T., Ryo H., Yamamoto K., Toh H., Inui T., Ayaki H., Nomura T., Ikenaga M. 1996.** Similarity among the *Drosophila* (6-4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. *Science*. 272 (5258), 109-112.
- Tu D.C., Batten M.L., Palczewski K., Van Gelder R. N. 2004.** Nonvisual photoreception in the chick iris. *Science*. 306, 5693, pg. 129.
- Vitaterna M. H., Selby C. P., Todo T., Niwa H., Thompson C. 1999.** Differential regulation of mammalian Period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *PNAS*. 96, Oct. 12, 12114-12119.
- Walker M. M., Diebel C. E., Haugh C. V., Pankhurst P. M., Montgomery J. C., Green C. R. 1997.** Structure and function of the vertebrate magnetic sense. *Nature*. 390, 371-376.
- Walker M. M., Dennis T.E., Kirschvink J. L. 2002.** The magnetic sense and its use in long-distance navigation by animals. *Current opinion in Neurobiology*. 12, 735-744.
- Walcott C., Gould J.L., Kirschvink J.L. 1979.** Pigeons have magnets. *Science*. 205,1027-1029.
- Wiltshko W., Wiltshko R. 1972.** Magnetic compass of European Robins. *Science*. 176, 62–64.
- Wiltshko R., Wiltshko W. 1978.** Evidence for the use of magnetic outward-journey information in homing pigeons. *Naturwissenschaften*. 65, 112.
- Wiltshko W., Wiltshko R. 1981.** Disorientation of inexperienced young pigeons after transportations in total darkness. *Nature*. 291, 433-434.
- Wiltshko R., Wiltshko W. 1998.** Pigeon homing: Effect of various wavelengths of light during displacement. *Naturwissenschaften*. 85, 164.

Wiltschko W., Wiltschko R. 1992. Migratory orientation: magnetic compass orientation of Garden Warblers (*Sylvia borin*) after a simulated crossing of the magnetic equator. *Ethology*. 91, 70–79.

Wiltschko R., Wiltschko W. 1995. Magnetic Orientation in Animals. *Springer*, Berlin Heidelberg New York.

Wiltschko W., Wiltschko R. 2002. Magnetic compass orientation in birds and its physiological basis. *Naturwissenschaften*. 89, 445-452.

Wiltschko W., Munro U., Wiltschko W., Kirschvink J.L. 2002. Magnetite-based magnetoreception in birds: the effect of a biasing field and a pulse on migratory behavior. *Journal of Experimental Biology*. 205, 3031–3037.

Wiltschko, W., Wiltschko, R. 2005. Magnetic orientation and magnetoreception in birds and other animals. *Journal of Comparative Physiology A*. 191,675 – 693.

6. PŘÍLOHY

TABULKY MNOHONÁSOBNÉHO POROVNÁNÍ

Následující tabulky ukazují výsledky mnohonásobného porovnání v počtu buněk mezi kontrolními a experimentálními jedinci.

POČET VŠECH BUNĚK INL

Tukey HSD test; variable DV_1 (Spreadsheet19)										
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests										
Error: Between; Within; Pooled MS = 1354,2, df = 23,324										
Cell No.	ZASAH	R1	E A 2018,4	E B 2084,8	E C 1532,2	E D 1067,6	C A 2030,4	C B 2137,8	C C 1507,8	C D 1071,2
1	E	A		0,231	0,000	0,000	1,000	0,002	0,000	0,000
2	E	B	0,231		0,000	0,000	0,384	0,418	0,000	0,000
3	E	C	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,972	0,000
4	E	D	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	1,000
5	C	A	1,000	0,384	0,000	0,000		0,025	0,000	0,000
6	C	B	0,002	0,418	0,000	0,000	0,025		0,000	0,000
7	C	C	0,000	0,000	0,972	0,000	0,000	0,000		0,000
8	C	D	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	

Tabulka 1. Rozdíl mezi experimentálními a kontrolními jedinci v počtu buněk v jednotlivých částech sítnice. Zvýrazněná pole zobrazují hodnoty srovnávající odpovídající části sítnice u experimentálních a kontrolních jedinců. **A, B, C, D** – hodnocené části sítnice, **A** - centrální oblast, **B** – oblast červeného pole, **C** – temporální oblast, **D** – nasální oblast. **E** – zvířata držena během experimentu v nestabilním magnetickém poli, **C** – zvířata držena během experimentu v přirozeném magnetickém poli.

POČET VŠECH BUNĚK GCL

Tukey HSD test; variable DV_1 (Spreadsheet19)										
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests										
Error: Between; Within; Pooled MS = 44,232, df = 25,714										
Cell No.	ZASAH	R1	E A 140,92	E B 151,60	E C 82,120	E D 88,280	C A 142,10	C B 152,70	C C 80,500	C D 85,200
1	E	A		0,317	0,000	0,000	1,000	0,187	0,000	0,000
2	E	B	0,317		0,000	0,000	0,424	1,000	0,000	0,000
3	E	C	0,000	0,000		0,868	0,000	0,000	1,000	0,997
4	E	D	0,000	0,000	0,868		0,000	0,000	0,660	0,997
5	C	A	1,000	0,424	0,000	0,000		0,457	0,000	0,000
6	C	B	0,187	1,000	0,000	0,000	0,457		0,000	0,000
7	C	C	0,000	0,000	1,000	0,660	0,000	0,000		0,980
8	C	D	0,000	0,000	0,997	0,997	0,000	0,000	0,980	

Tabulka 2. Rozdíl mezi experimentálními a kontrolními jedinci v počtu buněk v jednotlivých částech sítnice. Zvýrazněná pole zobrazují hodnoty srovnávající odpovídající části sítnice u experimentálních a kontrolních jedinců. **A, B, C, D** – hodnocené části sítnice, **A** - centrální oblast, **B** – oblast červeného pole, **C** – temporální oblast, **D** – nasální oblast. **E** – zvířata držena během experimentu v nestabilním magnetickém poli, **C** – zvířata držena během experimentu v přirozeném magnetickém poli.

POČET CRY1 POSITIVNÍCH BUNĚK V INL

Tukey HSD test; variable DV_1 (Spreadsheet19) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between; Within; Pooled MS = 5,5187, df = 26,256										
Cell No.	ZASAH	R1	E A	E B	E C	E D	C A	C B	C C	C D
			27,000	22,320	17,320	15,120	12,700	11,950	13,300	15,550
1	E	A		0,044	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	E	B	0,044		0,027	0,001	0,000	0,000	0,000	0,005
3	E	C	0,000	0,027		0,743	0,106	0,038	0,219	0,946
4	E	D	0,000	0,001	0,743		0,782	0,494	0,938	1,000
5	C	A	0,000	0,000	0,106	0,782		1,000	1,000	0,590
6	C	B	0,000	0,000	0,038	0,494	1,000		0,985	0,315
7	C	C	0,000	0,000	0,219	0,938	1,000	0,985		0,815
8	C	D	0,000	0,005	0,946	1,000	0,590	0,315	0,815	

Tabulka 3. Rozdíl v počtu CRY1 pozitivních buněk v jednotlivých částech sítnice mezi experimentálními a kontrolními jedinci. Zvýrazněná pole zobrazují hodnoty srovnávající odpovídající části sítnice u experimentálních a kontrolních jedinců. **A, B, C, D** – hodnocené části sítnice, **A** – centrální oblast, **B** – oblast červeného pole, **C** – temporální oblast, **D** – nasální oblast. **E** – zvířata držena během experimentu v nestabilním magnetickém poli, **C** – zvířata držena během experimentu v přirozeném magnetickém poli.

POČET CRY2 POSITIVNÍCH BUNĚK V INL

Tukey HSD test; variable DV_1 (Spreadsheet19) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between; Within; Pooled MS = ,35393, df = 23,739										
Cell No.	ZASAH	R1	E A	E B	E C	E D	C A	C B	C C	C D
			1,4400	,92000	,56000	,92000	,85000	,30000	,10000	,70000
1	E	A		0,751	0,180	0,751	0,811	0,128	0,046	0,592
2	E	B	0,751		0,950	1,000	1,000	0,772	0,470	0,999
3	E	C	0,180	0,950		0,950	0,995	0,998	0,938	1,000
4	E	D	0,751	1,000	0,950		1,000	0,772	0,470	0,999
5	C	A	0,811	1,000	0,995	1,000		0,797	0,474	1,000
6	C	B	0,128	0,772	0,998	0,772	0,797		0,999	0,951
7	C	C	0,046	0,470	0,938	0,470	0,474	0,999		0,722
8	C	D	0,592	0,999	1,000	0,999	1,000	0,951	0,722	

Tabulka 4. Rozdíl mezi experimentálními a kontrolními jedinci v počtu CRY2 pozitivních buněk v jednotlivých částech sítnice. Zvýrazněná pole zobrazují hodnoty srovnávající odpovídající části sítnice u experimentálních a kontrolních jedinců. **A, B, C, D** – hodnocené části sítnice, **A** – centrální oblast, **B** – oblast červeného pole, **C** – temporální oblast, **D** – nasální oblast. **E** – zvířata držena během experimentu v nestabilním magnetickém poli, **C** – zvířata držena během experimentu v přirozeném magnetickém poli.

POČET c-Fos POSITIVNÍCH BUNĚK V INL

Tukey HSD test; variable DV_1 (Spreadsheet19) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between; Within; Pooled MS = 9,9748, df = 27,719										
Cell No.	ZASAH	R1	E A	E B	E C	E D	C A	C B	C C	C D
			18,920	24,400	19,720	8,5200	5,6500	12,200	6,0000	6,2000
1	E	A		0,141	1,000	0,001	0,000	0,063	0,000	0,000
2	E	B	0,141		0,285	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	E	C	1,000	0,285		0,000	0,000	0,026	0,000	0,000
4	E	D	0,001	0,000	0,000		0,869	0,665	0,928	0,953
5	C	A	0,000	0,000	0,000	0,869		0,097	1,000	1,000
6	C	B	0,063	0,000	0,026	0,665	0,097		0,132	0,157
7	C	C	0,000	0,000	0,000	0,928	1,000	0,132		1,000
8	C	D	0,000	0,000	0,000	0,953	1,000	0,157	1,000	

Tabulka 5. Rozdíl mezi experimentálními a kontrolními jedinci v počtu c-Fos pozitivních buněk v jednotlivých částech sítnice. Zvýrazněná pole zobrazují hodnoty srovnávající odpovídající části sítnice u experimentálních a kontrolních jedinců. **A, B, C, D** – hodnocené části sítnice, **A** – centrální oblast, **B** – oblast červeného pole, **C** – temporální oblast, **D** – nasální oblast. **E** – zvířata držena během experimentu v nestabilním magnetickém poli, **C** – zvířata držena během experimentu v přirozeném magnetickém poli.

POČET CRY1+c-Fos POSITIVNÍCH BUNĚK V INL

Tukey HSD test; variable DV_1 (Spreadsheet19) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between; Within; Pooled MS = ,53671, df = 25,242										
Cell No.	ZASAH	R1	E A 5,3200	E B 5,4800	E C 3,4400	E D 2,2000	C A 1,3000	C B 1,5500	C C 1,2000	C D 1,1500
1	E	A		1,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	E	B	1,000		0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	E	C	0,004	0,002		0,107	0,004	0,014	0,003	0,002
4	E	D	0,000	0,000	0,107		0,606	0,882	0,480	0,420
5	C	A	0,000	0,000	0,004	0,606		0,999	1,000	1,000
6	C	B	0,000	0,000	0,014	0,882	0,999		0,994	0,987
7	C	C	0,000	0,000	0,003	0,480	1,000	0,994		1,000
8	C	D	0,000	0,000	0,002	0,420	1,000	0,987	1,000	

Tabulka 6. Rozdíl mezi experimentálními a kontrolními jedinci v počtu CRY1+ c-Fos pozitivních buněk v jednotlivých částech sítnice. Zvýrazněná pole zobrazují hodnoty srovnávací odpovídající části sítnice u experimentálních a kontrolních jedinců. **A, B, C, D** – hodnocené části sítnice, **A** - centrální oblast, **B** – oblast červeného pole, **C** – temporální oblast, **D** – nasální oblast. **E** – zvířata držena během experimentu v nestabilním magnetickém poli, **C** – zvířata držena během experimentu v přirozeném magnetickém poli.

POČET CRY1 POSITIVNÍCH BUNĚK V GCL

Tukey HSD test; variable DV_1 (Spreadsheet19) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between; Within; Pooled MS = 49,921, df = 26,293										
Cell No.	ZASAH	R1	E A 64,640	E B 38,920	E C 31,200	E D 25,600	C C 27,450	C B 38,575	C C 30,700	C D 25,650
1	E	A		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	E	B	0,000		0,583	0,065	0,273	1,000	0,666	0,138
3	E	C	0,000	0,583		0,866	0,992	0,771	1,000	0,933
4	E	D	0,000	0,065	0,866		1,000	0,156	0,956	1,000
5	C	A	0,000	0,273	0,992	1,000		0,286	0,996	1,000
6	C	B	0,000	1,000	0,771	0,156	0,286		0,683	0,148
7	C	C	0,000	0,666	1,000	0,956	0,996	0,683		0,951
8	C	D	0,000	0,138	0,933	1,000	1,000	0,148	0,951	

Tabulka 7. Rozdíly mezi experimentálními a kontrolními jedinci v počtu CRY1 pozitivních buněk v jednotlivých částech sítnice. Zvýrazněná pole zobrazují hodnoty srovnávací odpovídající části sítnice u experimentálních a kontrolních jedinců. **A, B, C, D** – hodnocené části sítnice, **A** - centrální oblast, **B** – oblast červeného pole, **C** – temporální oblast, **D** – nasální oblast. **E** – zvířata držena během experimentu v nestabilním magnetickém poli, **C** – zvířata držena během experimentu v přirozeném magnetickém poli.

POČET CRY2 POSITIVNÍCH BUNĚK

Tukey HSD test; variable DV_1 (Spreadsheet19) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between; Within; Pooled MS = 9,9774, df = 26,124										
Cell No.	ZASAH	R1	E A 20,000	E B 2,1600	E C 25,440	E D 25,040	C A 22,600	C B 2,1000	C C 28,000	C D 26,450
1	E	A		0,000	0,109	0,164	0,916	0,000	0,016	0,085
2	E	B	0,000		0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
3	E	C	0,109	0,000		1,000	0,875	0,000	0,922	1,000
4	E	D	0,164	0,000	1,000		0,938	0,000	0,851	0,997
5	C	A	0,916	0,000	0,875	0,938		0,000	0,200	0,581
6	C	B	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000
7	C	C	0,016	0,000	0,922	0,851	0,200	0,000		0,994
8	C	D	0,085	0,000	1,000	0,997	0,581	0,000	0,994	

Tabulka 8. Tato tabulka ukazuje, že mezi experimentálními a kontrolními jedinci nejsou žádné rozdíly v počtu CRY2 pozitivních buněk v jednotlivých částech sítnice. Zvýrazněná pole zobrazují hodnoty srovnávací odpovídající části sítnice u experimentálních a kontrolních jedinců. **A, B, C, D** – hodnocené části sítnice, **A** - centrální oblast, **B** – oblast červeného pole, **C** – temporální oblast, **D** – nasální oblast. **E** – zvířata držena během experimentu v nestabilním magnetickém poli, **C** – zvířata držena během experimentu v přirozeném magnetickém poli.

POČET c-Fos POSITIVNÍCH BUNĚK V GCL

Tukey HSD test; variable DV_1 (Spreadsheet19) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between; Within; Pooled MS = ,21020, df = 27,503										
Cell No.	ZASAH	R1	E A 2,7400	E B 2,5600	E C 1,5600	E D 1,5600	C A 2,2500	C B 2,0000	C C 1,2750	C D 1,8000
1	E	A		0,999	0,015	0,015	0,750	0,278	0,001	0,081
2	E	B	0,999		0,054	0,054	0,969	0,612	0,006	0,249
3	E	C	0,015	0,054		1,000	0,359	0,835	0,981	0,993
4	E	D	0,015	0,054	1,000		0,359	0,835	0,981	0,993
5	C	A	0,750	0,969	0,359	0,359		0,994	0,124	0,874
6	C	B	0,278	0,612	0,835	0,835	0,994		0,415	0,999
7	C	C	0,001	0,006	0,981	0,981	0,124	0,415		0,767
8	C	D	0,081	0,249	0,993	0,993	0,874	0,999	0,767	

Tabulka 9. Rozdíly mezi experimentálními a kontrolními jedinci v počtu c-Fos pozitivních buněk buněk v jednotlivých částech sítnice. Zvýrazněná pole zobrazují hodnoty srovnávající odpovídající části sítnice u experimentálních a kontrolních jedinců. **A, B, C, D** – hodnocené části sítnice, **A** - centrální oblast, **B** – oblast červeného pole, **C** – temporální oblast, **D** – nasální oblast. **E** – zvířata držena během experimentu v nestabilním magnetickém poli, **C** – zvířata držena během experimentu v přirozeném magnetickém poli.

POČET CRY1+c-Fos POSITIVNÍCH BUNĚK V GCL

Tukey HSD test; variable DV_1 (Spreadsheet19) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between; Within; Pooled MS = ,10802, df = 25,597										
Cell No.	ZASAH	R1	E A 1,5000	E B 1,2600	E C ,72000	E D ,76000	C A ,92500	C B 1,0250	C C ,47500	C D ,75000
1	E	A		0,958	0,040	0,058	0,199	0,410	0,002	0,039
2	E	B	0,958		0,294	0,381	0,790	0,958	0,028	0,325
3	E	C	0,040	0,294		1,000	0,980	0,856	0,948	1,000
4	E	D	0,058	0,381	1,000		0,994	0,924	0,893	1,000
5	C	A	0,199	0,790	0,980	0,994		1,000	0,636	0,996
6	C	B	0,410	0,958	0,856	0,924	1,000	0,9998,000	0,400	0,952
7	C	C	0,002	0,028	0,948	0,893	0,636	0,400		0,952
8	C	D	0,039	0,325	1,000	1,000	0,996	0,952	0,952	

Tabulka 10. Rozdíly mezi experimentálními a kontrolními jedinci v počtu c-Fos pozitivních buněk buněk v jednotlivých částech sítnice. Zvýrazněná pole zobrazují hodnoty srovnávající odpovídající části sítnice u experimentálních a kontrolních jedinců. **A, B, C, D** – hodnocené části sítnice, **A** - centrální oblast, **B** – oblast červeného pole, **C** – temporální oblast, **D** – nasální oblast. **E** – zvířata držena během experimentu v nestabilním magnetickém poli, **C** – zvířata držena během experimentu v přirozeném magnetickém poli.

PROCENTA POSITIVNÍCH BUNĚK V JEDNOTLIVÝCH ČÁSTECH SÍTNICE								
	E - A	C - A	E - B	C - B	E - C	C - C	E - D	C - D
INL - CRY1	1,33	0,62	1,07	0,55	1,13	0,88	1,41	1,45
INL - CRY2	0,07	0,04	0,04	0,14	0,03	0,00	0,08	0,06
INL - c-Fos	0,93	0,28	1,17	0,57	1,28	0,39	0,79	0,58
INL - CRY1+c-Fos	0,26	0,06	0,26	0,07	0,22	0,08	0,21	0,11
INL - CRY1+c-Fos/c-Fos	28,12	23,01	22,46	12,70	17,44	20,00	25,82	18,55
INL - CRY1+c-Fos/CRY1	19,70	10,24	24,55	12,97	19,86	9,02	14,55	7,40
GCL - CRY1	46,11	19,32	25,67	25,26	37,99	38,14	29,00	30,11
GCL - CRY2	14,27	15,90	1,42	1,38	30,98	34,78	28,36	31,04
GCL - c-Fos	1,95	1,58	1,69	1,31	1,90	1,58	1,77	2,11
GCL - CRY1+c-Fos	1,07	0,65	0,83	0,67	0,88	0,59	0,86	0,88
GCL - CRY1+c-Fos/+c-Fos	54,74	41,11	49,22	51,25	46,15	37,25	48,72	41,67
GCL - CRY1+c-Fos/CRY1	2,32	3,37	3,24	2,66	2,31	1,55	2,97	2,92

Tabulka 11. Procentuální zastoupení pozitivních buněk v hodnocených vrstvách sítnice. **CRY1+c-Fos/c-Fos** – vyjadřuje jaká část buněk obsahujících c-Fos byla v kolokalizaci s kryptochromem 1, **CRY1+c-Fos/CRY1** – vyjadřuje jaká část kryptochrom 1 pozitivních buněk byla v kolokalizaci s c-Fosem. **E** – experimentální zvířata (vystavená změnám vertikální složky m. pole), **C** – kontrolní zvířata (v přirozeném magnetickém poli), **A, B, C, D** – hodnocené části sítnice, **A** - centrální oblast, **B** – oblast červeného pole, **C** – temporální oblast, **D** – nasální oblast, **INL** – vnitřní jaderná vrstva (inner nuclear layer), **GCL** – vrstva gangliových buněk (ganglion cell layer), **CRY1**- kryptochrom 1, **CRY2** – kryptochrom 2, **c-Fos** – marker neuronální aktivity.