

Zum Einfluss von Melatonin auf Insulinsekretion, Signaltransduktion und Sekretionsrhythmik pankreatischer B-Zellen *in vitro*

I. Einleitung, Generierung und Synchronisation biologischer Rhythmen

Mit der Etablierung der Chronobiologie als medizinisch-biologische Teildisziplin wurden jahrtausendealte Beobachtungen und Erkenntnisse einer wissenschaftlichen Analytik zugeführt. Dabei stand die Frage nach dem Ort einer möglichen „inneren Uhr“, also dem Ort der Generierung biologischer Rhythmen und einem möglichen „Zeitsinn“, ganz im Vordergrund. Wir wissen heute, dass dem Licht und damit dem Licht perzipierenden optischen System nicht nur bei der gnostischen, sondern auch bei der räumlichen und zeitlichen Orientierung ein ganz entscheidender Stellenwert zukommt, da sich die Bedeutung des Lichtes nicht allein auf unverzichtbare Voraussetzungen für Erkennungsmechanismen reduzieren lässt. Vielmehr synchronisiert Licht als stärkster „Zeitgeber“ alle biologischen Abläufe im Tages- und Jahresgang und nimmt damit koordinierenden und modifizierenden Einfluss auf endogen generierte Rhythmen und somit auf alle physiologischen Funktionen. Neben den genannten circadianen (circa 24 h, zwischen 20 h und 28 h; Zimmerman und Menaker, 1979; Binkley, 1990, 1993; Reiter, 1993) und circannualen Rhythmen (mit Periodenlängen von ungefähr einem Jahr; Reiter, 1974, 1980, 1991a, b, 1993; Arendt, 1986; Pévet, 1988) werden ultradiane Schwingungen (hochfrequente mit Periodenlängen im Minuten- und Stundenbereich) und infradiane (niederfrequente, z. B. septadiane und mensuelle) Rhythmen anerkannt. Neben dem Licht können auch thermische, akustische und chemische Reize Zeitgeberbedeutung haben.

In der aufsteigenden Wirbeltierreihe, bis zur Entwicklungshöhe der Reptilien, tritt zu den Augen im landläufigen Sinne, den „Lateralaugen“,

ein zusätzliches Lichtsinnesorgan, ein medianes „drittes“ Auge, das Parietalaug. Nachdem die Phylogenese Beweise für die Existenz eines dritten (medianen) Auges in der aufsteigenden Wirbeltierreihe bis hin zu den Reptilien geliefert hat, ist es von Interesse, wie die Entwicklung bei den Vögeln, vor allem aber bei den Säugetieren und insbesondere bei den Primaten, eingeschlossen *homo sapiens*, vonstatten ging. Hier begegnet uns im Zuge der Phylogenese ein beispielloses Phänomen. Die zur Lichtperzeption befähigten, mit zapfenähnlichen Außengliedern ausgestatteten Zellen des Pinealkomplexes der rezenten Fische und Amphibien bzw. des Parietalauges der Reptilien fehlen bei den Säugetieren. Unabhängig von der reduzierten Anzahl zur Lichtperzeption befähigter Pinealozysten der Reptilien (und Vögel) wurde in den Epiphysen aller bisher untersuchten Wirbeltiere eine Melatonin synthese nachgewiesen. Allein bei Mäuse-Inzuchtstämmen (zit. nach Reiter, 1991b), beim Hausschwein (Reiter et al., 1987) oder beim Feldhamster, *Cricetus cricetus* (Pévet et al., 1989), wird zu bestimmten Jahreszeiten die nächtliche Erhöhung der rhythmischen Synthese und Ausschüttung von Melatonin in Frage gestellt.

Die bisherigen Feststellungen machen deutlich, dass die oftmals simplifizierte Darstellung der Umwandlung einer Sinneszelle in eine Drüsenzelle zu korrigieren ist. Der photoneuroendokrine Pinealozyt, ausgestattet mit Sinnes- und endokriner Funktion, wird während der Phylogenese vielmehr dergestalt spezialisiert, dass die Sinnesfunktion bei den niederen Vertebraten zunehmend reduziert und die sekretorische Funktion bei den hoch entwickelten Säugetieren beherrschend in den Vordergrund tritt. Aus einem ambivalenten photoneu-

* Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle–Wittenberg, Halle, Bundesrepublik Deutschland

roendokrinen Pinealozyten beim Neunauge, *Lam-petra*, entwickelt sich auf der einen Seite die sensorische Zelle des Parietalauges der Reptilien und auf der anderen Seite die sekretorische Zelle der Säugetierepiphyse (Dodt, 1966; Gusek, 1981; Vollrath, 1981; Ueck, 1982; Korf, 1986; Oksche, 1987, 1988; Falcon und Collin, 1989).

An dieser Stelle sei ein historisierender Einschub erlaubt, der verdeutlicht, dass die seit mehr als 2000 Jahren bekannte Epiphysis cerebri oftmals Gegenstand metaphysischer, esoterischer und philosophischer Spekulationen war (Gusek, 1968). Herophilos (geb. in Chalkedon um 335 v. Chr.) sah in der Epiphyse eine Art Ventil für die Bewegung der Seele, aber bereits Galen (etwa 130 bis 201 n. Chr.) sprach von einer Drüse. In der Folgezeit wurde in sie der Sitz des Hellsehens, des „sechsten Sinnes“, oder auch der Sitz der Träume verlegt (Schopenhauer, 1788–1860). Von besonderer Bedeutung für die Frage nach einem möglichen „dritten Auge“ sind jedoch die Abhandlungen zur Philosophie des Lebendigen von René Descartes (1596–1650), nämlich der „Traité de l’homme“ (1632) und „La description du corps humain“ (1648), die „als Beginn konsequent kausalanalytischen Denkens in Biologie und Physiologie“ verstanden werden können. In diesen Schriften ordnete der geniale französische Aufklärer mit antizipierender Kraft dem optischen System eine epithalamische Hirnanhangsstruktur zu, die Epiphysis cerebri, die von ihm als „Sitz des erkennenden Teiles der Seele“, der *res cogitantes*, verstanden wurde. Sinneseindrücke unserer „Lateralaugen“ projizieren nach Descartes direkt zur median liegenden Epiphyse, „wo sich der Sitz des Vorstellungsvermögens und des *sensus communis* befindet“, und repräsentieren so tatsächlich, wie auch heute oftmals treffend bezeichnet, das „Tor zur Seele“. Diese Epiphyse, wegen ihrer Ähnlichkeit mit einem Pinienzapfen als Zirbeldrüse oder Pinealorgan bezeichnet, wird von Descartes als „Quellort der *spiritus* in der Mitte des Gehirns liegend und als Zentrum der Sinneswahrnehmung, des *sensorium commune*“, verstanden (Rothschuh, 1969). Aus diesem kleinen Exkurs, vor allem in die erste Hälfte des 17. Jahrhunderts, erhellt, dass bereits vor mehr als 350 Jahren in genialer Weise eine epithalamische Hirnanhangsdrüse, das Pinealorgan, in funktioneller Einheit mit dem optischen Sinn gesehen wurde.

Das bekannteste und mit hoher Wahrscheinlichkeit bedeutendste Hormon der Epiphyse ist ein sich von der essenziellen Aminosäure Tryptophan ableitendes Indolamin, das Melatonin (N-Acetyl-5-methoxytryptamin), dessen Isolierung aus Rinderepiphysen (1958) und Strukturaufklärung (1959) Lerner und Mitarbeitern gelang. Es entsteht über die Zwischenstufen 5-Hydroxytryptophan, 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) und N-Acetylserotonin, wobei die Enzyme N-Acetyltransferase und 5-Hydroxyindol-O-methyltransferase für die Melatoninsynthese von entscheidender Bedeutung sind (Illnerova und Vanecek, 1980; Erlich und Apuzzo, 1985; Ebadi und Govitrapong, 1986; Reiter, 1987; Illnerova, 1988; Sugden, 1989). Dass Melatonin nicht nur in der Epiphyse, sondern (bezeichnenderweise) auch in der Retina (Hardeland et al., 1996a) und einer bei Nagetieren vorkommenden retrobulbären Orbitaldrüse, der HARDERSchen Drüse, synthetisiert wird (Pang et al., 1977; Pévet et al., 1980; Hoffman et al., 1989; Menendez-Palaez, 1990; Menendez-Palaez und Buzzell, 1992; Payne, 1994), sei der Vollständigkeit wegen am Rande genannt (siehe auch Vollrath, 1981). Es bleibt die Frage: Welche funktionellen Aufgaben erfüllt das Melatonin bei den Säugetieren? Gibt es den Zusammenhang zum optischen System überhaupt noch? Waren die Antizipationen des genialen und seiner Zeit weit voraus-eilenden Descartes möglicherweise doch nur Irrtümer?

Es steht außer Frage, dass der funktionelle Zusammenhang zwischen Epiphyse und dem optischen System in eindrucksvoller Weise erhalten geblieben ist. Melatonin ist einer besonderen circadianen Sekretionsrhythmik unterworfen, die darin besteht, dass es ausnahmslos in der Dunkelzeit stark erhöht freigesetzt wird. Verkürzt könnte man vom „Hormon der Dunkelzeit“ sprechen (Reiter, 1991c) oder auch von dem Hormon, das die uns umgebende Dunkelheit in ein hormonelles Signal umsetzt, einen gegenüber der Lichtzeit exzessiv erhöhten Melatoninspiegel. Melatonin ist schlechthin als das entscheidende, unsere Lebensabläufe synchronisierende Hormon zu verstehen, wobei es grundsätzlich unerheblich ist, wo die Rhythmusgenerierung stattfindet (Armstrong, 1989). Eine erstaunliche Besonderheit im Sekretionsmuster des Melatonins ist ferner darin zu sehen, dass sowohl tag- als auch nachtaktive Tiere während der Dunkelzeit – also unabhängig von ih-

rem Aktivitätszustand – einen hohen Melatoninspiegel aufweisen, der bereits in Beantwortung kürzester Lichtblitze extrem stark abfällt.

Unter den zahlreichen Einflüssen auf das Endokrinium muss die antigonadotrope Bedeutung des Melatonins hervorgehoben werden. Die Epiphyse im Kontext mit der Gonadenachse zu sehen, gründet sich auf die schon vor mehr als 100 Jahren gemachte Beobachtung, dass bei Epiphysen-zerstörenden Tumoren das klinische Bild der *pubertas praecox*, einer sexuellen Frühreife, resultiert (Gutzzeit, 1896). Diese klinische Phänomenologie hat der Epiphyse die Bezeichnung „Keuschheitsdrüse“ eingetragen.

Eine weitere Besonderheit dieses schon bei höheren Pflanzen (Van Tassel et al., 1993; Balzer und Hardeland, 1995, 1996; Dubbels et al., 1995; Hattori et al., 1995; Kolár et al., 1995; Hardeland und Fuhrberg, 1996; Hardeland et al., 1996a, b), Prokaryonten (Manchester et al., 1995; Tilden et al., 1997) sowie Eukaryonten (Poeggeler et al., 1989; Balzer und Fuhrberg, 1996; Balzer et al., 1996; Hardeland und Fuhrberg, 1996; Hardeland et al., 1996a, b) nachgewiesenen archaischen Hormons ist in seiner rhythmisierenden Bedeutung zu sehen, wobei Dinoflagellata wie *Gonyaulax polyedra* bereits circadiane Melatoninrhythmen mit extrem hohen Werten zwischen 40 nmol/l und 1 µmol/l erreichen und unter besonderen experimentellen Bedingungen sogar Werte bis 4 mmol/l nachweisbar waren (Poeggeler et al., 1991; Fuhrberg und Hardeland, 1995; Fuhrberg et al., 1997). Vergleichsweise niedrig sind Melatoninspiegel bei kleinen Labornagern wie Maus und Ratte oder beim Menschen, die in der Dunkelzeit Werte zwischen 0,2 und 0,3 nmol/l erreichen (Nowak und Zawilska, 1998).

Im Hinblick auf seine rhythmisierende Bedeutung ist die Melatonineinnahme durch Personen mit Anpassungsschwierigkeiten an die Tageszeit infolge *jet lag* oder *shift working* durchaus gerechtfertigt und wird möglicherweise perspektivisch eine erhebliche Rolle spielen können. Therapeutische Ansätze bieten sich weiterhin auf Grund eindeutig antikonvulsiver und sedativer Eigenschaften des Melatonins (Übersicht siehe: Vollrath, 1981). Hinzu kommt eine in jüngerer Zeit, bisher jedoch nur in pharmakologischen Dosen, nachgewiesene protektive Fähigkeit, Sauerstoffradikale, insbesondere Hydroxylradikale, zu fangen und damit zu neutralisieren, was die schon

seit längerem diskutierte onkostatische Bedeutung von Melatonin erklären könnte (siehe in diesem Zusammenhang auch die Beiträge von Brömme und E. Peschke sowie Reiter im selben Band).

Abschließend soll in dieser Einleitung noch einmal zu den am Anfang aufgeworfenen rhythmogenetischen Fragestellungen zurückgekehrt werden, wobei sinnvollerweise wiederum der phylogenetische Aspekt berücksichtigt werden muss. Während bei den Säugetieren das Pinealorgan mit seinem in den vergangenen Jahrzehnten besonders intensiv untersuchten Hormon Melatonin ausschließlich als endokrine Drüse fungiert, hat das Pinealorgan bei Vögeln einen Funktionswandel erfahren, es wurde zum Generator circadianer Rhythmen. Es stellt sich die Frage, wo bei den Mammalia Rhythmen generiert werden. Ist das Pinealorgan der Säugetiere als atavistisches Organ zu verstehen oder ist ihm noch eine Bedeutung im optischen System und darüber hinaus für die Rhythmogenese verblieben?

Die Säugerepiphyse bleibt dem optischen System funktionell verbunden. Photisch gesteuerter nervaler „input“ (insbesondere durch Katecholamine) wird in einen hormonellen „output“ (Melatonin) umgesetzt. Die Epiphyse fungiert als „*photoneuroendokrine transducer*“ und informiert mit nächtlich erhöhter Melatoninausschüttung über das Verhältnis von Licht- und Dunkelzeit im Tagesverlauf (Uhrenfunktion) sowie dessen Veränderungen im Jahresverlauf (Kalenderfunktion) (Reiter, 1993).

Die Generierung circadianer Rhythmen erfolgt bei den Säugetieren nicht in der Epiphyse, sondern in einem hypothalamischen Kerngebiet, dem Nucleus suprachiasmaticus (NSC). Der NSC wurde bereits Ende des 19. Jahrhunderts von Obersteiner (1888) beschrieben, aber erst seit ca. 30 Jahren als primärer „*circadian pacemaker*“ anerkannt. Von besonderer Bedeutung für das Verständnis funktioneller Interaktionen zwischen diesem hypothalamischen Kern und der Epiphyse war der Nachweis von Melatonin-Rezeptoren im NSC, die auf funktionelle Wechselwirkungen beider Strukturen hinweisen (Übersicht siehe: Cassone 1991). Dass die Dichte der Melatonin-Rezeptoren im NSC neben einer Vielzahl anderer Funktionsmerkmale am Tage erhöht ist, während im Gegensatz dazu physiologische, biochemische und morphologische Untersuchungen eine Aktivitätserhöhung der Epiphyse während der Nacht belegen, ist mit einem

inhibitorischen Melatonineinfluss auf den NSC als zeitbezogenes, feinregulatorisches Instrumentarium vereinbar (Weaver et al., 1991; Rietveld, 1992).

Unser heutiger Kenntnisstand über zentrale Strukturen, die bei Mammalia im Dienste der Rhythmogenese stehen, lässt sich wie folgt zusammenfassen: Die rhythmusgenerierende Bedeutung des Nucleus suprachiasmaticus, sein photischer „input“ von der Retina über den retinohypothalamischen Trakt (einer direkten, im Nervus opticus verlaufenden, jedoch individualisierten nervalen Verbindung zwischen Retina und Nucleus suprachiasmaticus), Afferenzen vom „*intergeniculate leaflet*“ des Corpus geniculatum laterale über den geniculohypothalamischen Trakt, Efferenzen zum Nucleus paraventricularis und weiterführende Verbindungen über das Centrum ciliospinale und das Ganglion cervicale superius bis hin zum photoneuroendokrinen „*transducer*“ Epiphysis cerebri stellen im Großen und Ganzen das heute anerkannte morphologische Substrat und Kernstück dessen dar, was sich unter dem Begriff der „inneren Uhr“ subsumieren lässt (Übersicht siehe: Reuss, 1993, 1996 sowie Beitrag von Reuss im selben Band).

Wenn auch die eingangs vorgestellten Befunde nur Gültigkeit für Untersuchungen unter *in vivo*-Bedingungen haben, ist nicht auszuschließen, dass auch isolierte Organe bzw. Zellen oder Zellverbände Rhythmen generieren können. Bisher konnten an verschiedenen Geweben von Evertibraten und Vertebraten circadiane Rhythmen im *in vitro*-System nachgewiesen werden, beispielsweise an Nervengewebe und Speicheldrüsen von Insekten, isolierten Vogel-Epiphysen sowie an isolierten Darmabschnitten, Nebennierenrinden-Zellkulturen, isolierten Herzzellverbänden und Leberzellen

von Säugetieren, um nur einige zu nennen (Bünning, 1958; Rensing, 1970; Kadle und Folk, 1983; Edmunds, 1988).

In vitro-Untersuchungen zur Generierung circadianer Rhythmen in der pankreatischen Insel sucht man in der einschlägigen Literatur vergeblich. Obwohl die Insel auf Grund ihrer neuroinsulären Komplexe über eine gewisse Autonomie verfügt und einige Autoren in den Ganglien der LANGERHANSschen Inseln Integrations- bzw. Koordinationszentren sehen (Übersicht: Stagner und Samols, 1985), ist weder die Frage nach Aktivitätsrhythmen der verschiedenen Inselzelltypen noch die nach Empfindlichkeitsrhythmen und ihrer Synchronisation (*in vitro*) zum Zeitpunkt beantwortet. An diese Stelle treten eigene Untersuchungen mit der Zielstellung, mögliche circadiane Rhythmen der Insulinsekretion isolierter pankreatischer Inseln zu erfassen, wobei der steuernde und möglicherweise synchronisierende Einfluss von Melatonin unter *in vitro*-Bedingungen zu berücksichtigen sein wird (siehe Teil III, 4).

Zunächst soll jedoch der Frage nachgegangen werden, ob Melatonin überhaupt einen Einfluss auf die Insulinsekretion pankreatischer B-Zellen nimmt. Sollte eine solche Beeinflussung durch reproduzierbare Ergebnisse hinlänglich gesichert werden können, ist der Frage nachzugehen, ob die B-Zelle möglicherweise über Melatonin-Rezeptoren verfügt und über welche intrazelluläre(n) Signaltransduktionskaskade(n) die Effekte erklärbar sein könnten. Schließlich ist auf den Ausgangspunkt zurückzukommen und zu untersuchen, ob die Insulinsekretion rhythmisch erfolgt, ob möglicherweise sogar Insulinsekretionsrhythmen im *in vitro*-Experiment erfassbar sind und ob die Rhythmen in den isolierten Inseln selbst generiert werden.

II. Widersprüchliche Befunde zum Einfluss von Melatonin auf den Glucosestoffwechsel

Erste systematische Untersuchungen und Mitteilungen zur Bedeutung des Pinealorgans für den Carbohydratstoffwechsel gehen auf C. I. Parhon und seine rumänische Gruppe zurück, die im Jahre 1939 auf einem Endokrinologenkongress in Bukarest das wissenschaftliche Interesse auf die Bedeutung dieses auch heute noch „mysteriösen Organs“ für den Glucosestoffwechsel lenkten (Parhon, 1939). In den Folgejahren wurden die Ar-

beiten von S. M. Milcu und I. Milcu und bis in jüngere Zeit von E. Damian fortgesetzt. Zusammenfassenden wissenschaftlichen Niederschlag fanden die Untersuchungen in Monographien, die von der rumänischen Akademie der Wissenschaften herausgegeben wurden. 1957 erschien unter der Federführung von S. M. Milcu „The epiphysis, an endocrine gland“ und 1979 der von I. Milcu und L. Nanu herausgegebene Akademieband

„The pineal gland as a metabolic organ“ (zitiert nach Damian, 1989). Mit diesen Arbeiten wurde vergleichsweise früh und in beispielhafter Weise eine bis in unsere Zeit reichende kontrovers geführte Diskussion um die Bedeutung der Epiphysis cerebri für den Glucosestoffwechsel entfacht.

Nachfolgend soll versucht werden, den mühevollen und von Widersprüchen gekennzeichneten Weg der vergangenen 60 Jahre nachzuvollziehen, der das Ziel verfolgte, den Einfluss der Epiphysis cerebri und damit des Melatonins auf die pankreatische Insel, die Insulinsekretion und den Glucosestoffwechsel zu erhellen bis hin zu ehrgeizigen Plänen, dem Melatonin eine mögliche Bedeutung für die Diabetesprävention zuzuerkennen. Von besonderer Bedeutung waren in diesem Zusammenhang zweifellos die Untersuchungen der rumänischen Gruppe, die in zahlreichen Arbeiten zur Frage pinealer Einflüsse auf die pankreatische B-Zelle, deren Insulinsekretion sowie den Zuckerstoffwechsel ganz allgemein, Stellung nahm. Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen. Ein aus Rinderzirbeldrüsen gewonnenes pineales Peptid, das die Autoren „Pinealin“ nannten, wurde von ihnen als Insulin-ähnlich, hypoglykämisierend, anabol, anticholesterinämisch und glomerulotrop charakterisiert (S. M. Milcu und I. Milcu, 1958). Das Pinealin erhöhte die Glucosetoleranz und begünstigte die muskuläre und hepatische Glykogenese nach Glucosebelastung. Pinealektomie hingegen erniedrigte die Insulinsekretion, die Glucosetoleranz sowie die muskuläre und hepatische Glykogenese und erhöhte die Pyruvat-Konzentration des Blutes (Parhon et al., 1952; Alcozer et al., 1956; I. Milcu et al., 1957, 1966; I. Milcu et al., 1961, 1962, 1963, 1964a, b, 1965, 1967; S. M. Milcu et al., 1963; S. M. Milcu, 1968; Nanu et al., 1969; Nanu-Ionescu und Ionescu, 1969).

Auch häufig zitierte Folgearbeiten der spanischen Gruppe um Diaz und Blázquez (1986); Mellado et al. (1986, 1989) sowie Rodriguez et al. (1989) knüpfen an die ursprünglichen Befunde an, die eine pinealoprive Hyperglykämie in Einheit mit weiteren „paradiabetischen“ metabolischen Störungen bei pinealektomierten Tieren konstatierten. Durch Pinealektomie oder bilaterale sympathische Denervation der Epiphyse (Munoz-Barragán et al., 1983, 1984, 1986) wurden signifikant verringerte Insulinspiegel, erhöhte Blutglucose (de Lima et al., 2001) sowie kommittierende

Glucosetoleranzstörungen beobachtet, die durch Melatoninapplikation verhindert oder zumindest stark eingeschränkt werden konnten (Shima et al., 1997). In diesem Zusammenhang sind Beobachtungen bedeutungsvoll, dass Melatonin die Expression des Typ1-Diabetes hemmt, während sie durch Pinealektomie befördert wird (Conti und Maestroni, 1996, 1998), und dass Insulin den Melatoninspiegel (Lynch et al., 1973) und den pinealen Melatoningehalt (Tannenbaum et al., 1987) erhöht.

Durch die aufgeführten Arbeiten wurden ältere und auch zeitgleich erhobene Befunde in Frage gestellt, die belegen, dass gerade in Umkehrung der geschilderten Befunde die Verabreichung von Zirbeldrüsenextrakten von Hyperglykämie gefolgt ist (Jordan und Eyster, 1911; Popescu-Inotesti, 1924; Buttaro und Rottini, 1947). Möglicherweise sind von wegweisender Bedeutung in diesem Zusammenhang ambivalente Ergebnisse der rumänischen Arbeitsgruppe selbst, da S. M. Milcu und Mitarb. 1971 mitteilen konnten, dass Pinealektomie bei Ratten zwar nach 48-stündigem Fasten die Insulinsekretion reduziert, die Glucose-stimulierte Insulinsekretion jedoch erhöht wird. Pineale Hormonfraktionen (E5) sollen zunächst zu einer deutlichen Zunahme, konsekutiv jedoch zu einer Abnahme der Insulinsekretion führen (Neacsu, 1988). Weitere Arbeiten mit vergleichbaren Ergebnissen reihen sich ein und vertreten die Auffassung, dass Melatonin die Glucose-induzierte Freisetzung von Insulin bei Ratte und Maus reduziere (Atkins et al., 1973), nicht aber die basale Insulinsekretion, und dass Melatonin-Dauerinfusionen einen äußerst geringen Insulin-senkenden Effekt und keinen Einfluss auf die Blutglucose habe (Bailey et al., 1974). In anderen Arbeiten wird festgestellt, dass durch Blendung erzielte Erhöhung des Melatoninspiegels (Benson et al., 1971) oder exogene Melatoninapplikation die Blutglucose erhöhen (Burns, 1973; McKeown et al., 1975; John et al., 1990; Sandyk, 1993; Prakash et al., 1998; Hoyos et al., 2000), während Pinealektomie die Blutglucose erniedrigt (Csaba und Baráth, 1971; Csaba und Nagy, 1973) und den Insulinspiegel erhöht (Nanu-Ionescu und Ionescu, 1969; Nanu-Ionescu und Marcean, 1970; Nanu-Ionescu et al., 1970; Gorray und Quay, 1977; Gorray et al., 1979; Quay und Gorray, 1980). Die Autoren kommen zu der Feststellung, dass die Epiphysis cerebri einen suppressiven Effekt auf die Aktivität der

pankreatischen B-Zelle ausüben muss, da Melatonin den Insulinspiegel sowohl beim Menschen (Boden et al., 1996) als auch bei der Ratte (Rasmussen et al., 1999, 2001; Wolden-Hanson et al., 2000) senkt und die Effekte von einer Erniedrigung der Glucose-Toleranz begleitet sind (Dhar et al., 1983; Cagnacci et al., 2001). Auf Grund der aufgeführten Befunde und der Feststellung, dass ein erhöhter Insulinspiegel einen hemmenden Einfluss auf die Epiphyse und ihre Melatoninausschüttung (Champney et al., 1983, 1985) ausübt, ist von einem funktionellen Gegensatz zwischen Melatonin und Insulin auszugehen. Dieser Sachverhalt ist einmal mehr überzeugend vor dem Hintergrund, dass natürlicherweise beim Menschen der Insulinspiegel in der Nacht erniedrigt ist, gerade dann, wenn der Melatoninspiegel erhöht ist (Boden et al., 1996), und dass Diabetiker einen regelrechten circadianen Melatonin-Rhythmus vermissen lassen (Champney et al., 1986; O'Brien et al., 1986).

Wenn auch die oben aufgeführten Arbeiten von Widersprüchlichkeiten geprägt waren, indem Melatonin fördernder oder auch hemmender Einfluss auf die Insulinsekretion zuerkannt wurde, hatten sie doch gemeinsam, dass ein funktioneller Zusammenhang zwischen Melatonin und Merkmalen des Carbohydratstoffwechsels anerkannt wurde. Es gibt jedoch auch einige Arbeiten, in denen jeglicher Einfluss von Melatonin auf die pankreatische B-Zelle und damit auf die Insulinsekretion abgelehnt wird. Dazu gehören frühe Arbeiten wie beispielsweise von Feldman und Lebovitz (1972), die beim Goldhamster keinerlei inhibitorischen Einfluss von Melatonin auf die Glucose-induzierte Insulinsekretion feststellen konnten. Auch in Folgearbeiten von Frankel und Strandberg (1991) an der Maus sowie von Bizot-Espiard et al. (1998a) an der Ratte konnten keinerlei Einflüsse von Melatonin auf die basale oder Glucose-stimulierte Insulinsekretion festgestellt werden. Dass Melatonin keinerlei Einfluss auf die Blutglucose der Ratte nimmt, wurde auch von Nijima et al. (1998) vertreten.

Ambivalent erscheinen Befunde, die an Vögeln erhoben wurden. Während von John et al. in einer Arbeit von 1983 mitgeteilt wird, dass Melatonin weder in der Photo- noch in der Scotophase die Blutglucose beim Truthahn verändert, werden in einer späteren Arbeit aus dem Jahre 1990 an der Taube erhobene Befunde publiziert, die durchaus

statistisch signifikante Erhöhungen der Blutglucose nach Melatoninapplikation bestätigen. Besondere Beachtung sollte weiterhin Arbeiten geschenkt werden, die abhängig vom Alter der Tiere oder der Photophase zu unterschiedlichen Befunden gelangen. Beispielsweise bewirkte Melatonin bei neugeborenen Tauben Hyperglykämie, während bei adulten Tieren Hypoglykämie festgestellt wurde (Mahata et al., 1988), und bei Wellensittichen wurde nach Melatoninapplikation unter natürlichen Lichtverhältnissen ebenso wie unter Langtagbedingungen Hyperglykämie, unter Kurztagbedingungen jedoch Hypoglykämie beobachtet (Maitra et al., 2000a). Aber nicht nur die Länge der Photoperiode, auch unterschiedliche Melatoninmengen oder der Zeitpunkt der Applikation im Tagesgang sollen den Einfluss von Melatonin auf den Glucosestoffwechsel bei Vögeln entscheidend beeinflussen (Maitra et al., 2000b, c).

Im Kontext mit differenten Angaben über die Bedeutung von Melatonin für die Insulinsekretion und Blutglucose sind Angaben zu sehen, die dem Einfluss von Melatonin auf das Wachstumshormon, auf den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor IGF-I und das Körpergewicht nachgehen. Wiederum finden sich Arbeiten, die einen fördernden Einfluss auf das Wachstumshormon und die Körpergewichtsentwicklung bestätigen (John et al., 1990; Vriend et al., 1990; Chen et al., 1999; Meeking et al., 1999; Ostrowska et al., 2001) neben Arbeiten, die einen solchen Einfluss ablehnen (Terzolo et al., 1995). Ganz im Vordergrund stehen hier jedoch diejenigen Arbeiten, in denen festgestellt wird, dass Melatonin einen hemmenden Einfluss auf die Hypoglykämie-induzierte Erhöhung von Wachstumshormon und Körpergewicht ausübt (Smythe und Lazarus, 1974; Chrousos et al., 1982; Bartness et al., 1991; Coiro et al., 1997; Coiro und Vescovi, 1998; Wolden-Hanson et al., 2000). Im Kontext stehen Arbeiten, die feststellen, dass Melatonin dosisabhängig die Futtermittelaufnahme senkt (Bermudez et al., 1983) und dass Pinealektomie oder sympathische Denervation der Epiphyse (herbeigeführt durch bilaterale Exstirpation der oberen Halsganglien des sympathischen Grenzstranges) die Futtermittelaufnahme und das Körpergewicht erhöhen (D. Peschke et al., 1987). Auch hinsichtlich der Bedeutung von Melatonin für den Wachstumsfaktor IGF-I gehen auf Grund divergierender Befunde die Auffassungen auseinander. So finden sich Arbeiten, in denen fest-

gestellt wird, dass Melatonin IGF-I erhöht (Vriend et al., 1988, 1990; Ostrowska et al., 2001) und Pinealektomie IGF-I erniedrigt (Ostrowska et al., 2001) neben Arbeiten, in denen der hemmende Melatonineinfluss auf den IGF-I herausgestellt wird (Suttie et al., 1992; Vaughan et al., 1994; Lissoni et al., 1997; Dahl et al., 2000).

Es steht außer Frage, dass sich die aufgeführten Befunde auf Grund ihrer Widersprüchlichkeiten nicht systematisieren oder gar auf einen Nenner bringen lassen, wenn auch außer Frage steht, dass Melatonin einen maßgeblichen Einfluss auf den Zuckerstoffwechsel haben muss (zum jahreszeitbezogenen Pinealeinfluss auf nutritive und metabolische Verhältnisse der männlichen Wistar-Ratte sowie integrierte endokrine und hypothalamische Regulationsmechanismen siehe auch die Übersichtsarbeit von D. Peschke, 1994). Offenbar sind experimentelle Randbedingungen wie das Alter der Versuchstiere, Spezies- und photoperiodische Unterschiede, Zuchtunterschiede (In- und Auszucht der Versuchstiere), Geschlechtsspezifika oder auch die Konzentration der Melatoninapplikation zu berücksichtigen. Dennoch überzeugen

aus Sicht des Autors einige Arbeiten auf Grund ihrer konsequenten experimentellen Versuchsanordnung und Berücksichtigung chronobiologischer Aspekte in dem Sinne, dass Melatonin und Insulin einander offenbar hemmen. Hohe Insulinspiegel wurden immer dann gefunden, wenn der Melatoninspiegel erniedrigt war (am Tage), und umgekehrt traten niedrige Insulinspiegel begleitet von hohen Glucosewerten (Bizot-Espiard et al., 1998b) bei hohen Melatoninspiegeln (in der Nacht) auf. Die Befunde wurden bei Menschen erhoben, deren Glucosetiter durch Dauerinfusionen konstant gehalten wurde und somit keinen postprandialen Reaktionen unterlag (Boden et al., 1996). Im Einklang stehen an der Ratte erhobene Befunde, die in überzeugender Weise bestätigen konnten, dass mit zunehmendem Alter Melatoninsynthese und Melatoninserumspiegel abnehmen (ein Sachverhalt, der bereits seit längerem bekannt ist), während Insulin und Leptin zunehmen (Rasmussen et al., 1999), und dass durch Melatonin die altersbedingte Insulinsekretions-Erhöhung aufgehalten werden kann (Rasmussen et al., 2001). Komplementär sind Arbeiten von Champney et al. (1983,

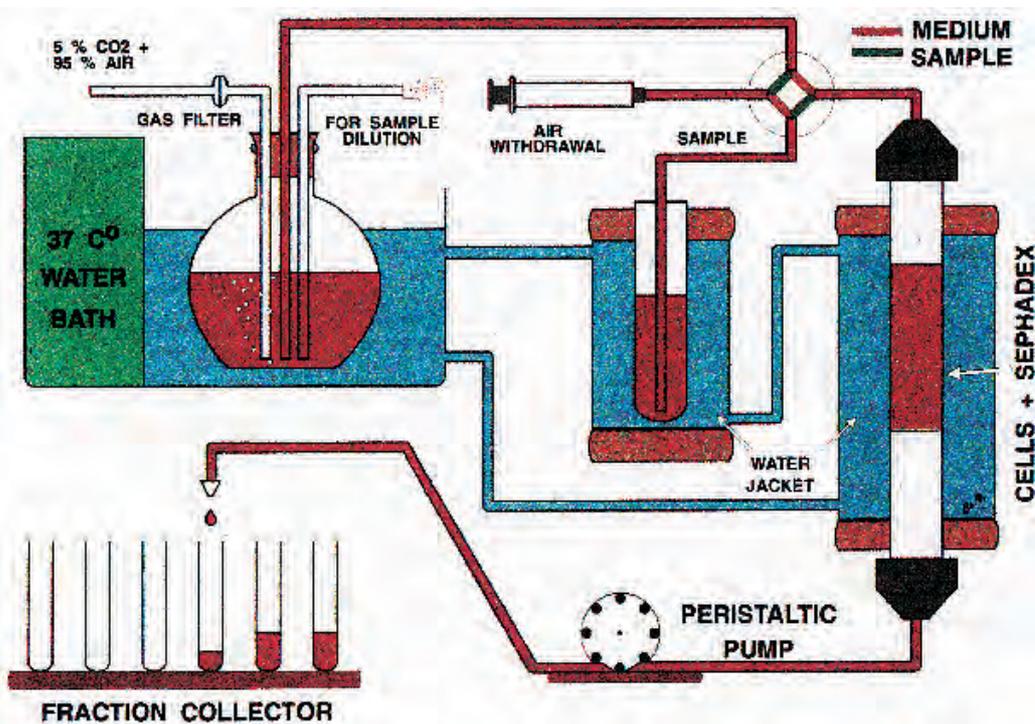


Abb. 1: Schematische Darstellung der Peri- bzw. Superfusionsanlage. Abbildung und nähere Angaben zur Funktionsweise siehe: Csernus et al. (1998).

1985, 1996), in denen festgestellt wird, dass bei diabetischen Hamstern der Melatoninspiegel erniedrigt ist. Hingegen soll Melatonin die Expressi-

on des Diabetes hemmen, während Pinealektomie sie befördert (Conti und Maestroni, 1996, 1998).

III. Eigene Befunde zur Bedeutung von Melatonin für die Insulinsekretion pankreatischer Inseln und INS1-Zellen im *in vitro*-Experiment

1. Zur Phänomenologie des Einflusses von Melatonin auf die Insulinsekretion

Im Ergebnis zahlreicher Untersuchungen der vergangenen Jahre konnte unter exakt reproduzierbaren *in vitro*-Bedingungen mittels Peri- bzw. Superfusion (Abb. 1) zweifelsfrei der Nachweis erbracht werden, dass Melatonin die Glucose-, KCl- und Forskolin-stimulierte Insulinsekretion pankreatischer Inseln neonater Ratten hemmt. Die Aussagen stützen sich auf statistisch signifikante Ergebnisse, die sowohl mit repetitiv pulsatilem als auch Dauerstimulationen erreicht wurden. Melatonin wurde in Konzentrationen zwischen 5 nmol/l

und 5 µmol/l eingesetzt. Geringere Effekte nach 5 nmol/l Melatonin belegen den konzentrationsabhängigen Melatonineinfluss auf das Inselorgan (E. Peschke et al., 1996a, b, 1997a; E. Peschke und D. Peschke, 1997). Durch weiterführende perfusionstechnische Untersuchungen an pankreatischen Inseln konnte schließlich festgestellt werden, dass Melatonin nicht nur in den oben beschriebenen pharmakologischen, sondern auch in physiologischen Konzentrationen (200 pmol/l) die Glucose-, KCl- und Forskolin-stimulierte Insulinsekretion hemmt (Abb. 2 bis 4). Die Spezifik der Reaktion wird durch den Tatbestand unterstrichen, dass das nahe verwandte Indolamin Sero-

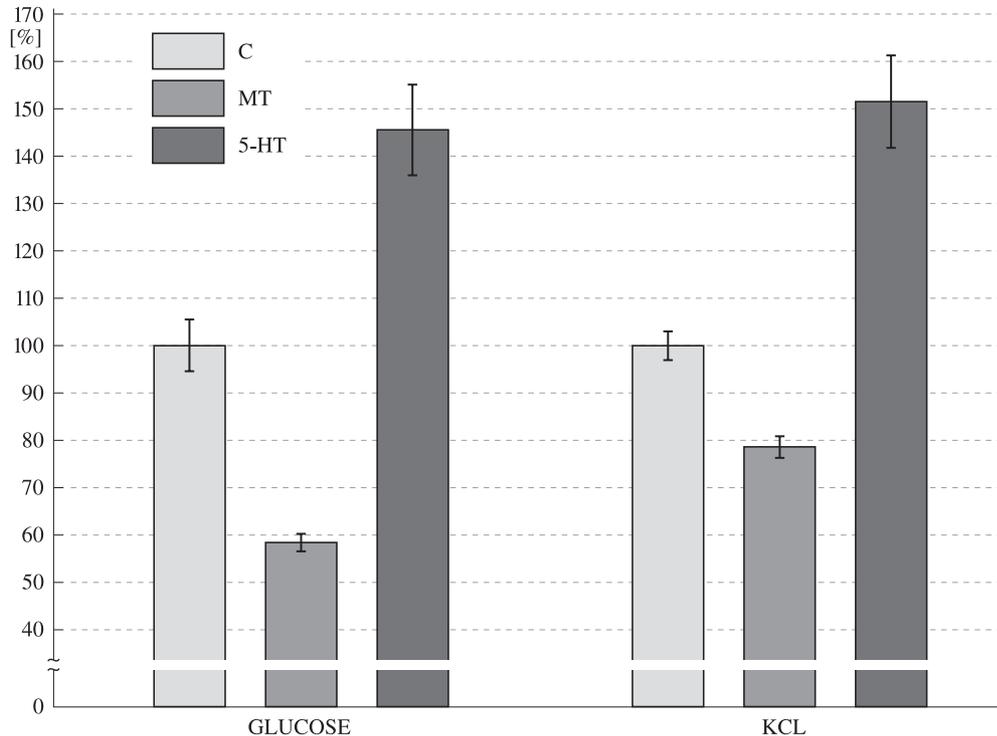


Abb. 2: Zusammenfassung von Ergebnissen pulsativer Stimulationen von pankreatischen Ratten-Inseln mit Glucose oder KCl nach vorheriger Melatonin- (Erniedrigung der Insulinsekretion) oder Serotonin-Stimulation (Erhöhung der Insulinsekretion). Abbildung und nähere Angaben zur Versuchsanordnung siehe: E. Peschke et al. (1997).

tonin (5-Hydroxytryptamin) eine Erhöhung der Insulinsekretion, also gerade umgekehrte Reaktion, bewirkte (Abb. 2).

Von unverzichtbarer Voraussetzung für die hier vorzustellenden Ergebnisse war die Etablierung eines der batch-Technik als auch Perfusion überlegenen Bioassays (Peri- bzw. Superfusion genannt), mit dem die Kinetik der Insulinsekretion in Minuten- oder Stundenintervallen über mehrere Tage hinweg erfasst werden konnte (von Perfusion spricht man, wenn Zellverbände wie Organe oder Gewebe, von Superfusion, wenn Einzelzellen untersucht werden). Ferner bot die Apparatur eine höchstmögliche funktionelle Standardisierung der Versuchsabläufe. Dazu zählten: 1. Erfassung der Insulin-Antwort auf einen exakt bestimmbar und bekanntlich unspezifischen Stimulus (z.B. KCl), um die Menge des freisetzbaren intrazellulären Hormongehaltes quantifizieren zu können (Freisetzungskriterium), 2. Erfassung der Insulin-

Antwort auf einen spezifischen Stimulus (Glucose), um das System hinsichtlich seiner Freisetzung- und Synthese-Mechanismen einschätzen zu können (Synthesekriterium), 3. Erfassung der Basislinie, um eine Möglichkeit zur Beurteilung des Zellstatus zu erlangen und eine Verschlechterung der Zellaktivitäten einschätzen und erkennen zu können (Vitalitätskriterium) und 4. Erfassung des totalen Hormongehaltes der Zellen am Ende eines jeden Experimentes durch Extraktion des Insulins aus den B-Zellen mittels hypotonen Schocks mit 10 mmol/l HCl (Kapazitätskriterium) (Csernus und Schally, 1991; E. Peschke et al., 1995; Csernus et al., 1998).

Die oben aufgeführten Befunde wurden an isolierten Inseln neonater Ratten erhoben, was die Frage aufwarf, ob die beschriebenen Effekte als direkte Melatonineinflüsse auf die pankreatische B-Zelle selbst zu verstehen sind oder ob es sich hier um einen indirekten Effekt handelt. In Kennt-

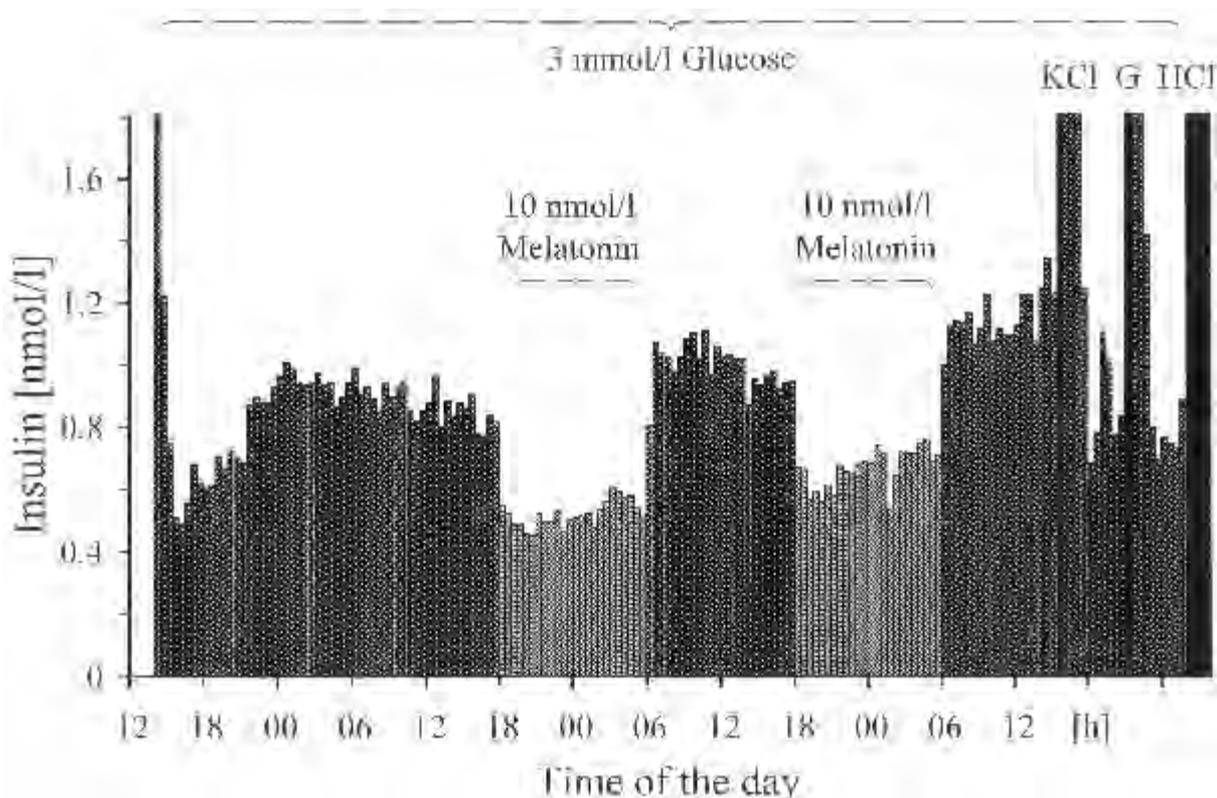


Abb. 3: Langzeitstimulation (> 3 d) pankreatischer Ratten-Inseln mit Glucose (5,6 mmol/l + 3 mmol/l) und zusätzlich zweimaliger Melatoninapplikation (10 nmol/l) über jeweils 12 Stunden. Ebenso wie nach pulsatilen repetitiven Stimulationen wird die Insulinsekretion durch 12-stündige Melatoninapplikation im *in vitro*-System reduziert. Die KCl-, Glucose- und HCl-Stimulationen am Ende des Versuches dienen der Standardisierung sowie Vitalitäts- und Inter-assay-Kontrolle. Abbildung und nähere Erläuterungen zum Versuchsablauf siehe: E. Peschke et al. (1997).

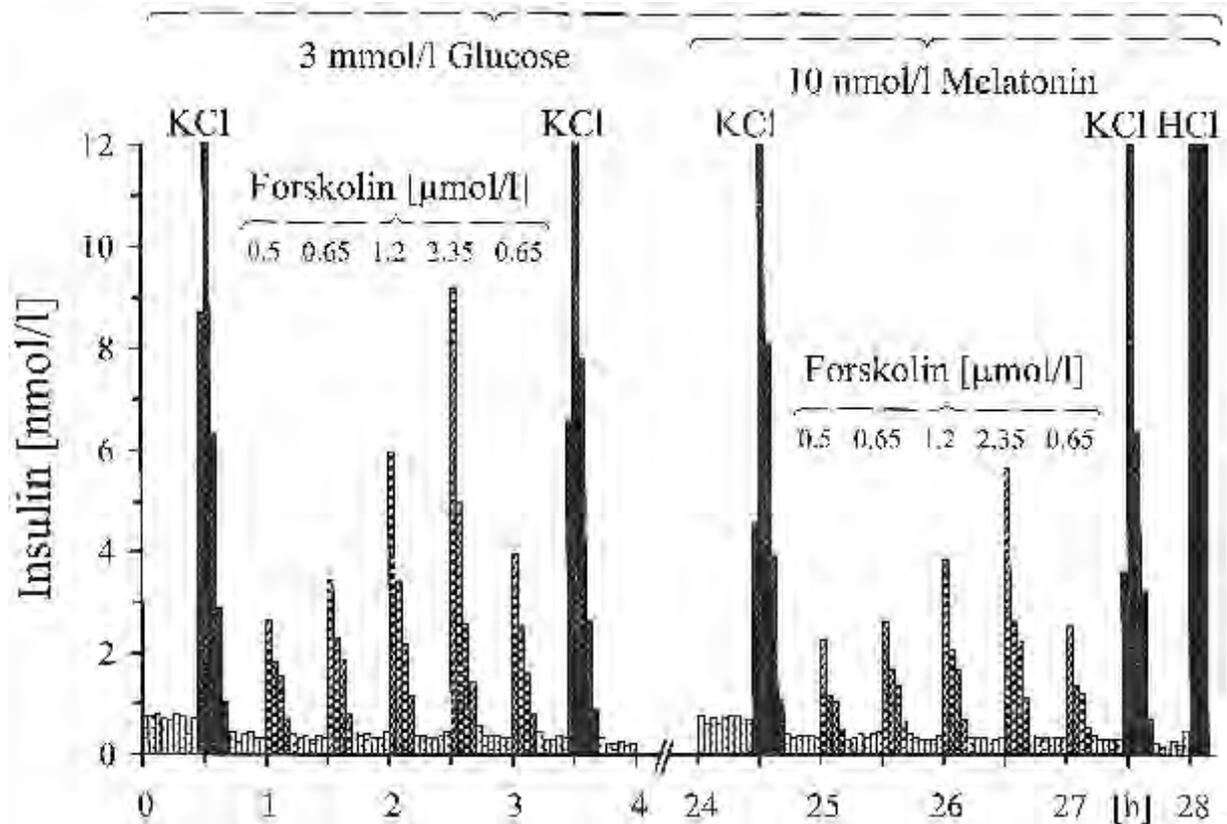


Abb. 4: Beispiel einer repetitiven Stimulation pankreatischer Ratten-Inseln mit unterschiedlichen Forskolinkonzentrationen bei fehlender oder zusätzlicher Melatoninapplikation. Melatonin reduziert die Insulinsekretion statistisch signifikant. Die intermittierend verabreichten dreiminütigen KCl-Applikationen dienten der Vitalitäts- und Kapazitätskontrolle der pankreatischen Inseln.

nis, dass Somatostatin die Insulinsekretion hemmt, war nicht auszuschließen, dass der beobachtete Effekt beispielsweise auf einer Stimulation der Somatostatin-produzierenden D-Zelle hätte beruhen können. Um diese Frage beantworten zu können, wurden vergleichbare Untersuchungen an Glucose-responsiven, Insulin-produzierenden Insulinoma-Zellen der Ratte (INS1) durchgeführt, die von Professor Wollheim (Genf) zur Verfügung gestellt worden waren. Alle an INS1-Zellen durchgeführten Untersuchungen widerspiegeln dieselben Ergebnisse, die zuvor an den Ratteninseln erhoben wurden, wodurch sichergestellt wurde, dass Melatonin einen direkten Einfluss auf die B-Zelle nimmt (D. Peschke et al., 2001; E. Peschke et al., 2001; E. Peschke und D. Peschke, 2001).

2. Funktionelle, autoradiographische und molekularbiologische Untersuchungen zur Charakterisierung von Melatonin-Rezeptoren auf der pankreatischen B-Zelle

Die vorgestellte Phänomenologie implizierte die Frage nach möglichen Melatoninrezeptoren auf der pankreatischen B-Zelle. Mit der Zielstellung, diese Frage zu beantworten, wurden funktionelle, autoradiographische und molekularbiologische Untersuchungen, zunächst wiederum an Inseln neonater Ratten, angeschlossen.

1. Funktionelle Melatonin-Rezeptoruntersuchungen

In Kenntnis der etablierten Überzeugung, dass Melatonin andernorts seine Effekte über spezifische Pertussistoxin-sensitive G_i -Protein-gekopp-

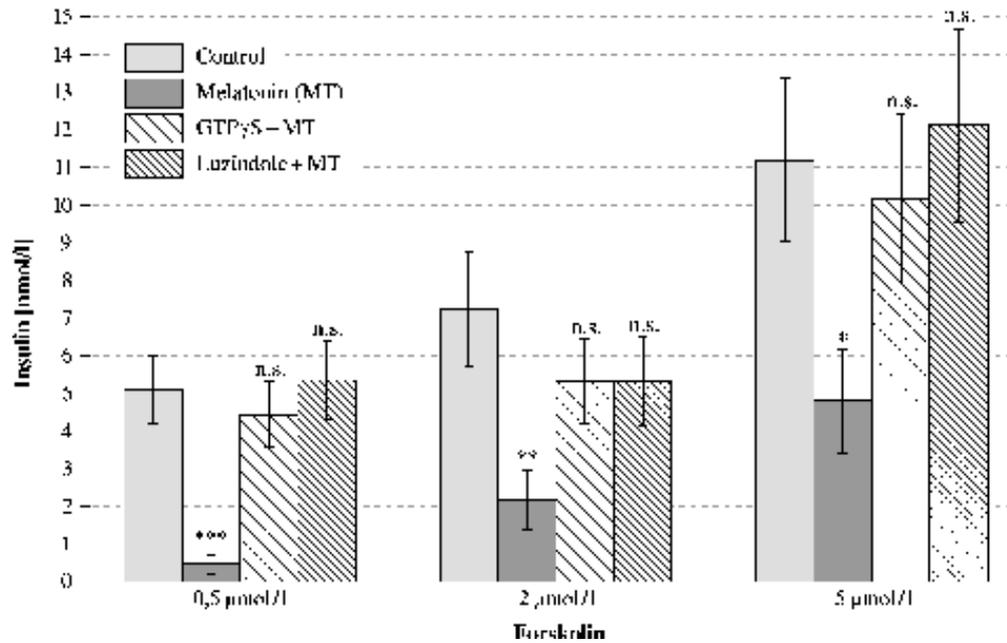


Abb. 5: Zusammenfassung von Perfusionsergebnissen dreiminütiger Stimulationen mit 0,5, 2 und 5 µmol/l Forskolin. Die Säulen zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte ($n = 12$), die Berechnungen basierten auf der Erfassung des Netto-Integrals der radioimmunologisch bestimmbaren Insulinfreisetzung (nähere Angaben siehe Csernus et al., 1998). Melatonin (10 nmol/l) reduzierte die Forskolin-stimulierte Insulinsekretion aller drei Konzentrationen statistisch signifikant ($n = 12$). Zusätzliche Applikation von 30 µmol/l GTPγS (nach vorheriger Gabe von 0,4 U/ml Streptolysin O zur Membranperforation) oder des kompetitiven Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol (10 µmol/l) hoben den Melatonineffekt auf und normalisierten die Insulinsekretion (jeweils $n = 6$). Abbildung und nähere Angaben zum Versuchsablauf siehe: E. Peschke et al. (2000).

pelte Rezeptoren realisiert (Carlson et al., 1989; Fauteck et al., 1994; Morgan et al., 1994, 1995; Reppert et al., 1994, 1995a, b; Mazzucchelli et al., 1996; Shiu et al., 1996; Constantinescu et al., 1997), wurde versucht, mögliche Melatonin-Effekte an der Insel mit dem nicht-hydrolysierbaren Guanosin-S-[gamma-thio]triphosphat [GTPγS, 30 µmol/l] oder dem kompetitiven Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol [10 µmol/l] zu blockieren. Im Ergebnis dieser Maßnahmen wurden die Melatonin-Effekte reduziert oder gänzlich gelöscht (Abb. 5). Die GTPγS-Befunde wurden nur nach vorheriger Membranperforation mit Streptolysin O erreicht. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Rezeptor-medierten Melatoninwirkungen mit hoher Wahrscheinlichkeit an Pertussis-toxin (PTX)-sensitive G-Proteine gekoppelt sind, da von Vergleichsuntersuchungen am Nucleus supra-chiasmaticus oder der Pars tuberalis bekannt ist, dass die Fähigkeit von Melatonin, die Forskolin-stimulierte cAMP-Erhöhung zu hemmen, durch PTX blockiert werden kann (E. Peschke und D. Peschke, 1998a; E. Peschke et al., 1998).

Durch ergänzende superfusionstechnische Untersuchungen an der INS1-Zelle konnten die an der pankreatischen Insel erhobenen Befunde bestätigt werden.

2. Autoradiographische Melatonin-Rezeptoruntersuchungen

Autoradiographische Untersuchungen mit halogeniertem Melatonin bestätigten die Arbeitshypothese, dass das endokrine Pankreas über spezifische Bindungsstellen für Melatonin verfügt (Abb. 6; siehe auch Stankov et al., 1991, 1993). Reproduzierte Befunde ergaben, dass über den Gewebsschnitten den Inseln entsprechende positive „spots“ erkennbar waren, deren Markierung auf Grund der Bindung von 2-¹²⁵Iodmelatonin an Melatonin-Rezeptoren zustande gekommen war. Kontrollversuche, in denen die Bindungsplätze mit nichtjodiertem Melatonin blockiert wurden, ließen keine „spots“ erkennen. Schließlich wurde mittels computergestützter Grauwertanalyse eine

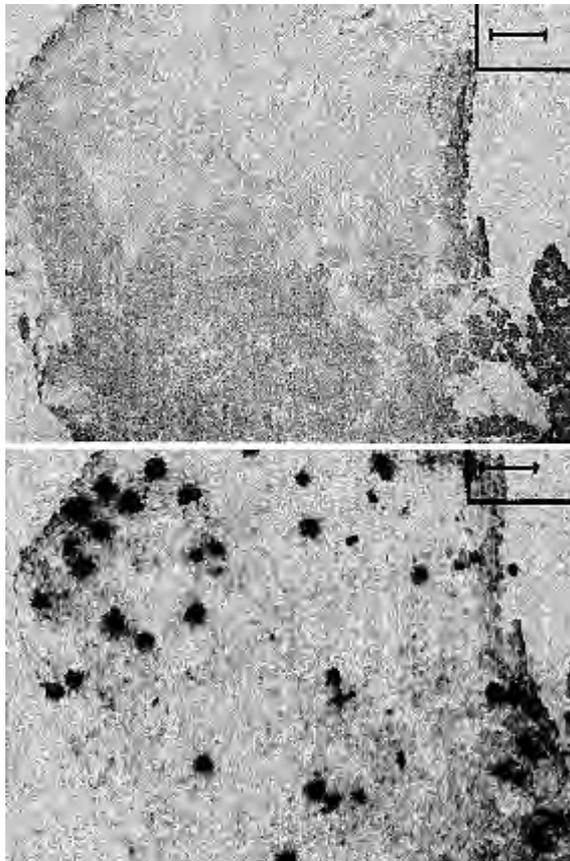


Abb. 6: Beispiel einer autoradiographischen Untersuchung. Es konnte gezeigt werden, dass distinkte kleine Areale, die pankreatischen Inseln entsprechen, spezifische Bindungen für 2-¹²⁵Iodmelatonin aufweisen, so genannte „hot spots“. Das exokrine Pankreas wies entsprechende Markierungen nicht auf. Das Kontrollphoto unterstreicht die Spezifik der Reaktion, da entsprechende Bindungen durch zusätzliche Applikation nichtjodierten Melatonins im Überschuss das jodierte Melatonin aus seinen Bindungen verdrängte (Kryo-Schnitte, Maßstab 400 µm).

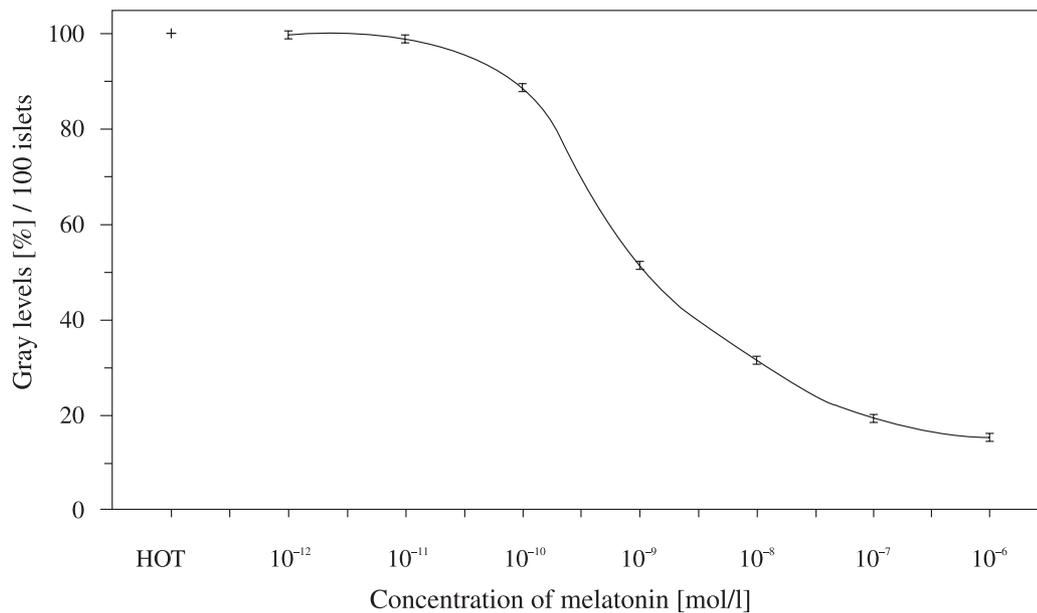


Abb. 7: Verdrängungskurve von 2-¹²⁵Iodmelatonin aus seinen Rezeptorbindungen durch nichtjodiertes Melatonin, durchgeführt an Pankreasgewebe neonater Ratten. Die Untersuchung erfolgte mittels computergestützter Grauwertanalyse. Abbildung und nähere Angaben zur Methodologie siehe: E. Peschke et al. (2000a).

Verdrängungskurve von 2-^[125I]Iodmelatonin aus seinen Rezeptorbindungen durch nichtjodiertes Melatonin erstellt, mit der nachgewiesen werden konnte, dass 2-^[125I]Iodmelatonin durch nichtmarkiertes Melatonin aus seinen Bindungen dosisabhängig verdrängt werden konnte. Die halbmaximale Verdrängung von 2-^[125I]Iodmelatonin aus den Bindungen lag bei 10⁻⁹ mol/l, die totale bei 10⁻⁶ mol/l Melatonin (Abb. 7).

3. Molekularbiologische Untersuchungen zum Nachweis von Melatonin-Rezeptoren auf der pankreatischen Insel sowie Glucose-responsiven, Insulin-produzierenden Ratteninsulinomazelle INS1

Im Anschluss an die funktionellen und autoradiographischen Melatoninrezeptor-Nachweise sowie die Bindungsstudien wurden Untersuchungen zur Expression von mRNA für den MT₁- und MT₂-Rezeptor im Pankreasgewebe mit Hilfe der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) angeschlossen. Der Einsatz von MT₁-spezifischen Oligonukleotid-Primern führte zu einem Amplifikationsprodukt, das der erwarteten Länge von 329 bp entsprach (die Primer für die MT₁-mRNA basieren auf dem partiellen cDNA-Klon der Ratte: U14409; upper-strand primer: Basenfolge 11–33, lower-strand primer:

Basenfolge 319–339). Die Spezifität dieser amplifizierten Sequenz wurde durch zwei Kontrolluntersuchungen gesichert: 1. Restriktionsanalyse: Das Enzym MseI führte zu einer vollständigen Spaltung des PCR-Produktes in die zu erwartenden Fragmente (233 bp + 96 bp) und 2. Verschachtelte „nested“ PCR: Reamplifikation des gereinigten PCR-Produktes mit einem intern gelegenen Primer ergab das zu erwartende PCR-Produkt von 269 bp.

Im Gegensatz dazu führte der Einsatz von MT₂-spezifischen Oligonukleotid-Primern zu keinem Amplifikationsprodukt, was die Existenz von MT₂-Rezeptoren im Pankreasgewebe unwahrscheinlich macht und insofern erstaunlich war, weil mit dem kompetitiven MT₂-Rezeptor-Blocker Luzindol (siehe oben) Melatonin-Effekte aufgehoben oder zumindest minimiert werden konnten (die Primer für die MT₂-mRNA basieren auf dem partiellen cDNA-Klon der Ratte: U28218; upper-strand primer: Basenfolge 60–83, lower-strand primer: Basenfolge 329–352, das PCR-Produkt hat eine Länge von 292 bp).

Nachdem im Pankreasgewebe der Ratte eindeutig mRNA des MT₁-Rezeptors, nicht aber des MT₂-Rezeptors nachgewiesen worden war (Abb. 8), erhob sich die zwingende Frage, ob die im Pankreasgewebe nachgewiesene MT₁-Rezeptor-mRNA in der Insel und möglicherweise der B-Zelle (wie vermutet) lokalisiert ist. Die funktio-

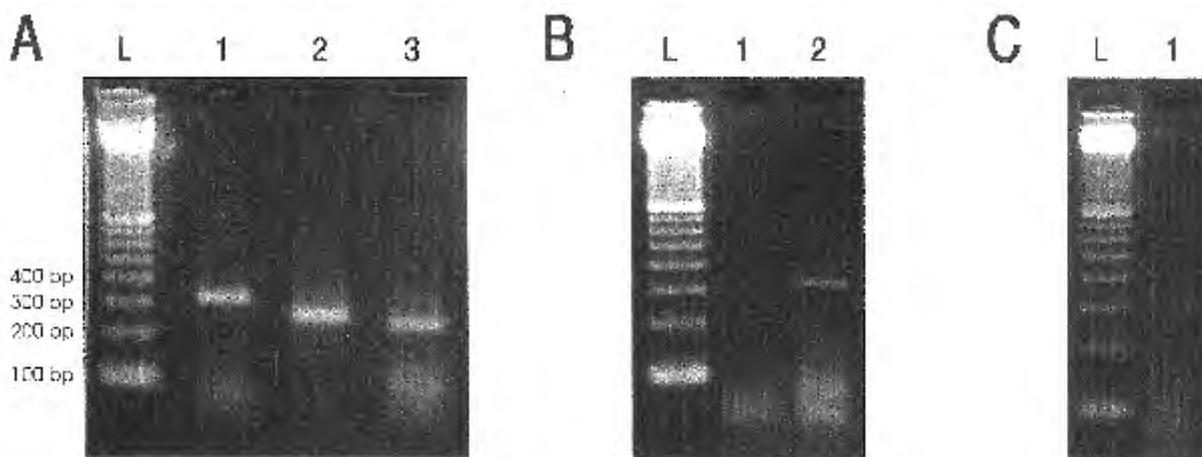


Abb. 8: RT-PCR-Befunde zum Nachweis des MT₁-Rezeptors in pankreatischem Gewebe neonater Ratten. Spur A1: PCR des MT₁-Rezeptors: positiv (329 bp), Spur A2: Reamplifizierung des eluierten MT₁-PCR-Fragmentes: positiv (269 bp), Spur A3: Inkubation des MT₁-PCR-Produktes mit dem Restriktionsenzym MseI: positiv (233 bp + 96 bp), Spur B2: MT₁-spezifisches PCR-Fragment: positiv (329 bp), Spur B1: RNase A-Behandlung mit anschließender RT und PCR-Amplifikation mit MT₁-Primern: negativ, Spur C1: PCR-Amplifikation mit MT₂-Primern: negativ. L = 100 bp-Leiter. Abbildung und nähere Angaben zur Methodologie siehe: E. Peschke et al. (2000a).

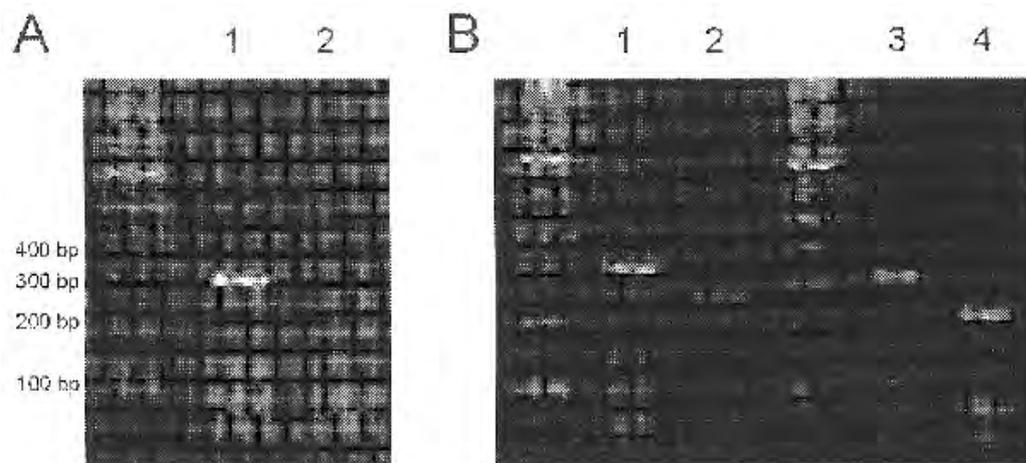


Abb. 9: RT-PCR-Befunde zum Nachweis des MT_1 -Rezeptors in Ratten-Insulinoma-Zellen INS1. Spur A1: PCR-Produkt mit Primer für MT_1 : positiv (329 bp), Spur A2: PCR-Produkt mit Primer für MT_2 : negativ (292 bp), Spuren B1 und B3: PCR-Produkt mit Primer für MT_1 : positiv (329 bp), Spur B2: *nested* PCR: positiv (269 bp), Spur B4: Restriktionskontrolle: positiv (233 bp + 96 bp). L = 100 bp-Leiter.

nellen Befunde (siehe oben) hatten zwar eine solche Annahme nahe gelegt, allein der Nachweis fehlte. Die bislang ausstehende Sicherheit wurde erreicht, als mit großer Eindeutigkeit und mehrmals reproduziert der Nachweis von mRNA des MT_1 -Rezeptors in der INS1-Zelle gelang (Abb. 9) und mit ebenso großer Sicherheit der Einsatz von MT_2 -spezifischen Oligonukleotid-Primern zu keinem Amplifikationsprodukt führte, was die Existenz von MT_2 -Rezeptoren in der Insulin-produzierenden B-Zelle unwahrscheinlich macht (E. Peschke et al., 1998, 1999, 2000a, b, 2001).

3. Erste Befunde zur Melatoninrezeptor-medierten intrazellulären Signaltransduktion der pankreatischen B-Zelle. Untersuchungen an der Ratteninsulinomazelle INS1

Nachdem in den ersten beiden Abschnitten dieses Kapitels zur Phänomenologie sowie zum Rezeptor-medierten Einfluss von Melatonin auf die Insulin-produzierende B-Zelle Stellung genommen wurde, soll in diesem dritten Abschnitt auf erste Befunde zur intrazellulären Signaltransduktion eingegangen werden. In Kenntnis zahlreicher Vergleichsuntersuchungen, vorgenommen am Nucleus suprachiasmaticus und dem infundibulären Hypophysenstiel (Übersicht: Vanecek, 1998), lag es nahe, dem *second messenger* cAMP besondere

Aufmerksamkeit zu schenken, zumal aus den oben aufgeführten Abbildungen eindeutig hervorgeht, dass die durch Forskolin stimulierte Adenylatzyklase und konsekutive Steigerung der Insulinsekretion durch Melatonin nachhaltig gehemmt wird. Voraussetzung für eine quantitative cAMP-Bestimmung war die Entwicklung und Anpassung eines cAMP-RIA an die besonderen superfusions-technischen Bedingungen unserer funktionellen Untersuchungen. Erste, bereits reproduzierte Untersuchungen liegen inzwischen vor und belegen, dass in der pankreatischen B-Zelle (INS1-Zelle) der Rezeptor-medierte MT_1 -Einfluss über heterotrimere G-Proteine (wahrscheinlich G_i) einen hemmenden Einfluss auf das Adenylatzyklase-System ausübt und konsekutiv das cAMP in der B-Zelle (INS1-Zelle) verringert. Dabei war zunächst nicht eindeutig klar, wie das cAMP aus der Zelle in das Superfusat gelangt, passiv durch einen Konzentrationsgradienten (was auf Grund der Hydrophilie des cAMP eher unwahrscheinlich wäre) oder durch einen aktiven Zellmembrantransportmechanismus und ob die extrazellulär gemessenen cAMP-Konzentrationen tatsächlich Ausdruck der intrazellulären Situation sind. Inzwischen kann auf Grund von Literaturangaben und eigenen Befunden davon ausgegangen werden, dass cAMP durch einen aktiven Zelltransport aus dem intrazellulären in den extrazellulären Raum gelangt (Rosenberg et al., 1994; Brundage et al., 1997; Finnegan und Caray, 1998; Kondrashin et

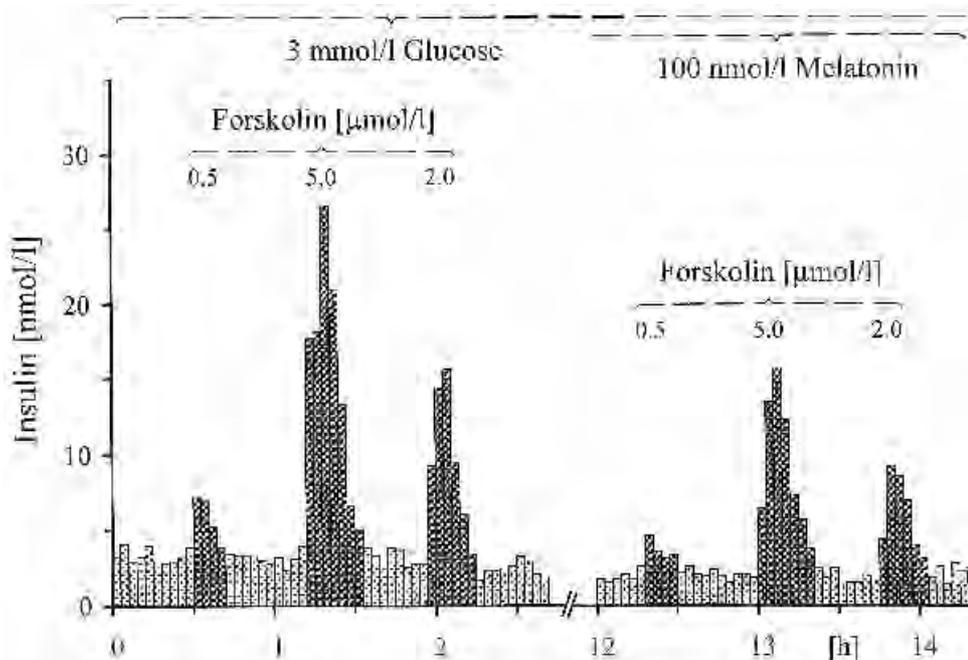


Abb. 10: Insulin-Spiegel von INS1-Zellen nach Applikation von 0,5, 2 und 5 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin für jeweils 3 min allein sowie nach zusätzlicher Applikation von 100 nmol/l Melatonin. Melatonin senkt die Forskolin-stimulierte Insulinsekretion deutlich. Abbildung und nähere Angaben zur Versuchsanordnung siehe E. Peschke et al. (2002b).

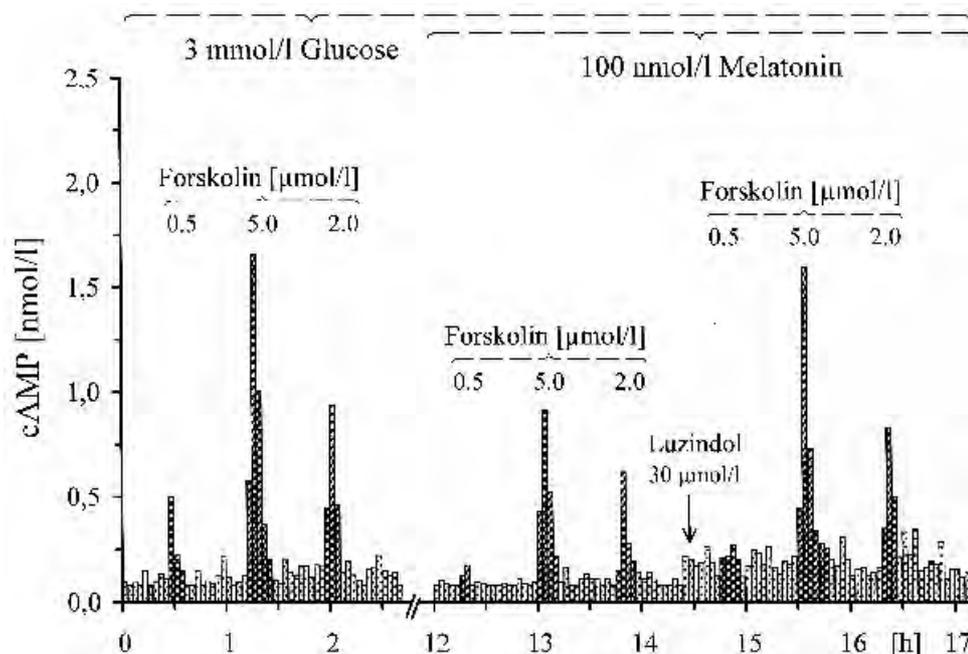


Abb. 11: cAMP-Spiegel von INS1-Zellen nach Applikation von 0,5, 2 und 5 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin für jeweils 3 min allein, nach zusätzlicher Applikation von Melatonin (100 nmol/l) sowie von Melatonin plus kompetitivem Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol (30 $\mu\text{mol/l}$). Melatonin reduziert den cAMP-Gehalt, zusätzliche Gabe von Luzindol hebt den Melatonin-Effekt weitgehend auf. Abbildung und nähere Angaben zur Versuchsanordnung siehe E. Peschke et al. (2002b).

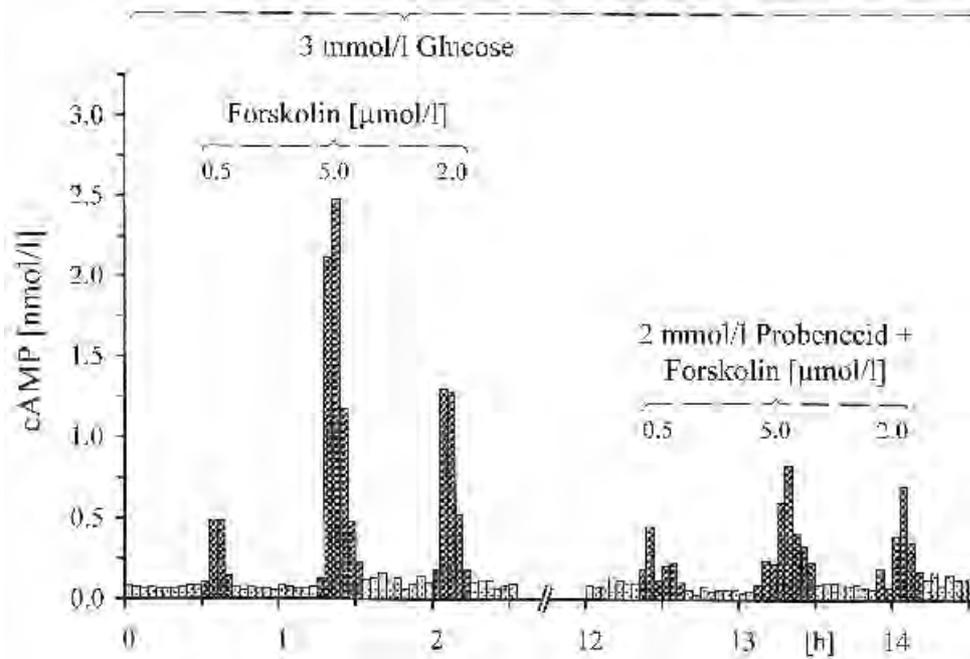


Abb. 12: cAMP-Spiegel von INS1-Zellen nach Applikation von 0,5, 2 und 5 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin für jeweils 3 min allein sowie nach zusätzlicher Applikation von 2 mmol/l Probencid. Der extrazellulär messbare cAMP-Gehalt wird durch Hemmung des transmembranösen Transports von cAMP in das Superfusat durch Probencid gehemmt. Abbildung und nähere Angaben zur Versuchsanordnung siehe E. Peschke et al. (2002b).

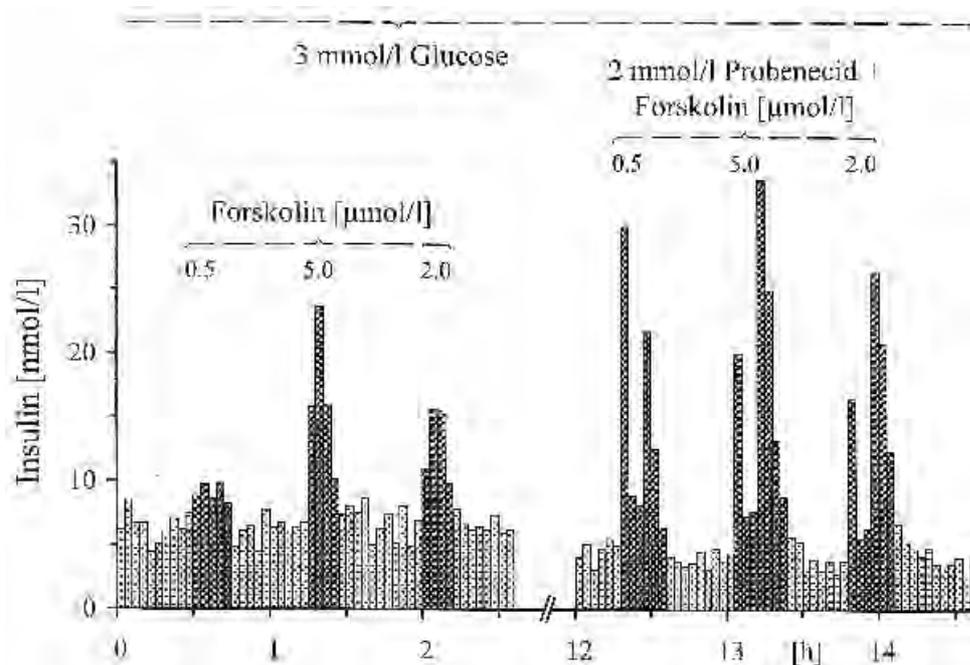


Abb. 13: Insulin-Spiegel von INS1-Zellen nach Applikation von 0,5, 2 und 5 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin für jeweils 3 min allein sowie nach zusätzlicher Applikation von 2 mmol/l Probencid. Durch Hemmung des transmembranösen Transports von cAMP in das Superfusat durch Probencid steigt der intrazelluläre cAMP-Gehalt und folglich die Insulinsekretion. Abbildung und nähere Angaben zur Versuchsanordnung siehe E. Peschke et al. (2002b).

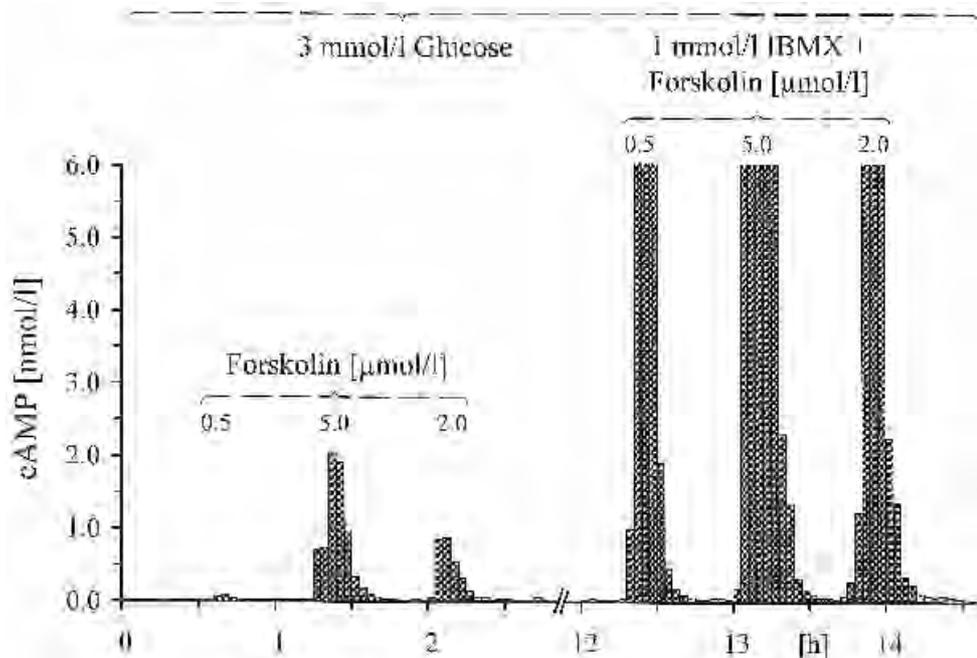


Abb. 14: cAMP-Spiegel von INS1-Zellen nach Applikation von 0,5, 2 und 5 μmol/l Forskolin für jeweils 3 min allein sowie nach zusätzlicher Applikation von 1 mmol/l IBMX. Durch Einsatz des Phosphodiesterasehemmers IBMX wird der messbare cAMP-Gehalt im Superfusat excessiv erhöht. Abbildung und nähere Angaben zur Versuchsanordnung siehe E. Peschke et al. (2002b).

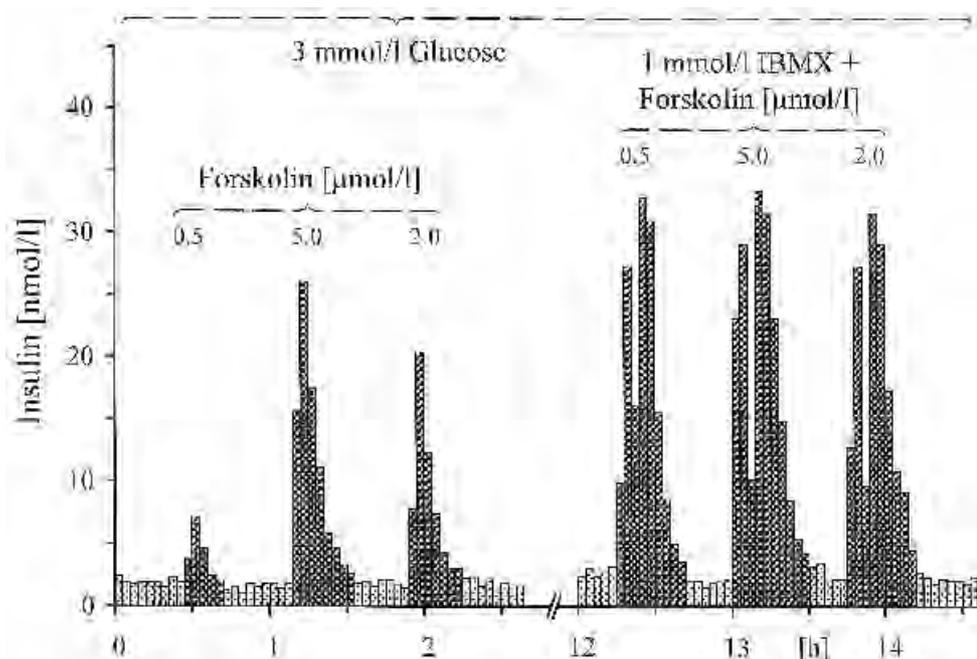


Abb. 15: Insulin-Spiegel von INS1-Zellen nach Applikation von 0,5, 2 und 5 μmol/l Forskolin für jeweils 3 min allein sowie nach zusätzlicher Applikation von 1 mmol/l IBMX. Durch Einsatz des Phosphodiesterasehemmers IBMX werden der intrazelluläre cAMP-Spiegel (nicht gezeigt) und folglich die Insulin-Sekretion deutlich erhöht. Abbildung und nähere Angaben zur Versuchsanordnung siehe E. Peschke et al. (2002b).

al., 1999; Orlov und Maksimova, 1999; Steffgen et al., 1999) und dass cAMP nicht nur wie bekannt intrazellulär, sondern mit großer Wahrscheinlichkeit auch extrazellulär eine *messenger*-Funktion zukommt (Fehr et al., 1990). Der Efflux soll energieabhängig, unidirektional und durch Substanzen, die die cytoskeletale Mikrotubulus-Assemblierung verhindern, hemmbar sein (Rindler et al., 1978; Brunton und Mayer, 1979; Brunton und Buss, 1980). Jüngste Untersuchungen machen amphipathische Anionen, so genannte *multidrug resistance proteins* wie MRP4 und MRP5, für den transmembranösen Pump-Mechanismus verantwortlich (Jedlitschky et al., 2000; Chen et al., 2001). Auf Grund der eigenen Befunde (D. Peschke et al., 2001; E. Peschke et al., 2001, 2002a, b) liegt die Vermutung nahe, dass in relativ kurzer Zeit cAMP aus dem intrazellulären in den extrazellulären Raum gelangt. Die Abbildungen 10 und 11 zeigen den Einfluss unterschiedlicher Forskolinkonzentrationen auf die Insulinsekretion der INS1-Zelle (Abb. 10) sowie den extrazellulären cAMP-Spiegel (Abb. 11) mit und ohne zusätzliche Melatoninapplikation (hier 100 nmol/l). Die cAMP-Befunde wurden an INS1-Zellen erhoben, sind inzwischen jedoch durch Untersuchungen an pankreatischen Inseln neonater Ratten reproduziert worden. Ebenso wie auf der bereits oben vorgestellten Abbildung 5 gezeigt werden konnte, dass Luzindol den durch Melatoninapplikation bedingten Insulin-senkenden Einfluss aufheben kann, wird aus der Abbildung 11 deutlich, dass Luzindol den Melatonineffekt am cAMP-System minimiert (was sich in einer Erhöhung und Normalisierung der cAMP-Spiegel ausdrückt). Schließlich kann gezeigt werden, dass nach Hemmung des transmembranösen cAMP-Transporters durch Probenecid (p-[Dipropylsulfamoyl]Benzoessäure) erwartungsgemäß das Forskolin-stimulierte, extrazellulär messbare cAMP absinkt (Abb. 12). Das hat zur Folge, dass auf der Grundlage vermehrt zurückgehaltenen cAMPs in der Zelle und folglich erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegeln die Sekretionsmaschinerie aktiviert und konsekutiv die Insulinsekretion erhöht wird (Abb. 13). Der Einsatz des Phosphodiesterase-Hemmers IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) erhöht erwartungsgemäß sowohl den extrazellulären cAMP-Spiegel (Abb. 14) als auch die Insulinsekretion extrem stark (Abb. 15). In stark vereinfachender Weise wird mit dem die Arbeit abschließenden

Zellschema (Abb. 19) der Versuch unternommen, die Signaltransduktionsmaschinerie der B-Zelle ohne (linke Seite) und mit Melatoninapplikation (rechte Seite) darzustellen. Die Abbildung lehnt sich an Darstellungen an, in denen Mechanismen der Insulinsekretion von B-Zellen, nicht aber der Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion Gegenstand des Interesses war (Berggren und Larsson, 1994; Berggren et al., 1994; McDermott und Sharp, 1994; Persaud et al., 1994; Lang, 1999). Abschließend kann auf Grund der an INS1-Zellen durchgeführten funktionellen Untersuchungen als gesichert gelten, dass Melatonin einen direkten Einfluss auf die pankreatische B-Zelle ausübt und dass die Effekte über MT₁-Rezeptoren sowie G_i-Proteine vermittelt zu einer Hemmung des Adenylatcyclase-cAMP-Systems und konsekutiven Senkung der Insulinsekretion führen.

4. Untersuchungen zur circadian-periodischen Insulinsekretion sowie zum synchronisierenden Melatonin-Einfluss im *in vitro*-Experiment

Im Einleitungsteil war bezugnehmend und in Vorbereitung auf diesen letzten Teil der vorliegenden Darstellung auf die Generierung biologischer Rhythmen im Tierreich eingegangen und herausgestellt worden, dass bei den Vögeln biologische Rhythmen im Pinealorgan, bei den Säugetieren in einem hypothalamischen Kerngebiet, dem Nucleus suprachiasmaticus, generiert werden. Diese im biologischen Organismus selbst generierten Rhythmen, die in aller Regel von dem uns bekannten 24-h-Tag abweichen und deshalb „circa“-diane Rhythmen genannt werden (als circadian gelten Rhythmen mit Periodenlängen zwischen 20 und 28 Stunden), werden durch externe Zeitgeber, insbesondere durch das Licht, das als stärkster Zeitgeber gilt, synchronisiert. Darüber hinaus konnten an verschiedenen Geweben von Evertibraten und Vertebraten circadiane Rhythmen im *in vitro*-System nachgewiesen werden (Bünning, 1958; Rensing, 1970; Kadle und Folk, 1983; Edmunds, 1988). *In vitro*-Untersuchungen zur Generierung circadianer Rhythmen in der pankreatischen Insel sind nicht bekannt, obwohl die Insel auf Grund ihrer neuroinsulären Komplexe über eine gewisse Autonomie verfügt und einige Autoren, wie oben bereits hervorgehoben, in den Ganglien der Inseln

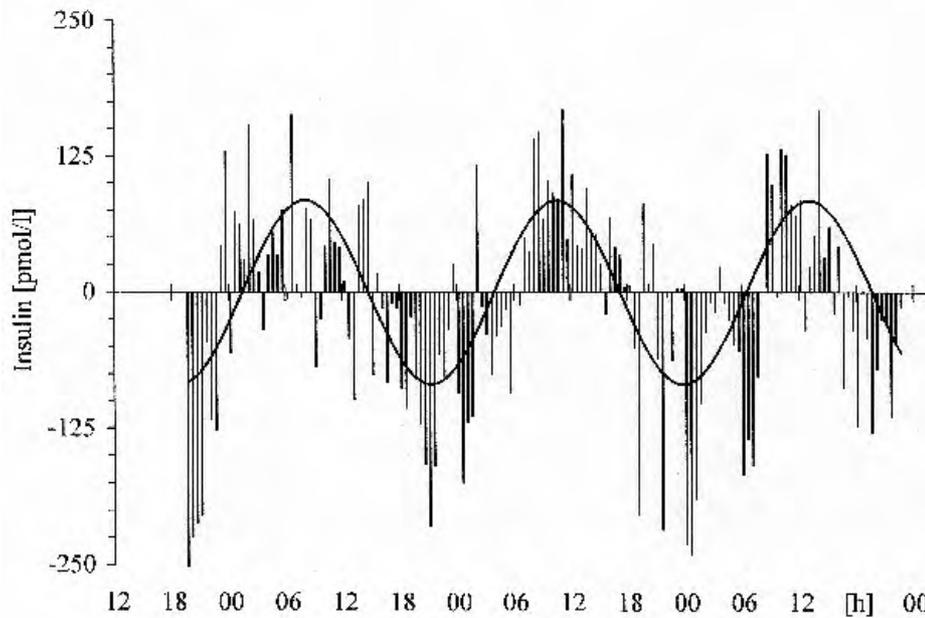


Abb. 16: Beispiel für das Insulinsekretionsmuster Glucose-stimulierter Inseln (8,6 mmol/l Glucose) nach Trendbereinigung und Abtragung der positiven und negativen Abweichungen vom Mesor, der hier „0“ gesetzt wurde. Die Periodenlänge (τ) beträgt in diesem Falle 26,2 Stunden. Beobachtungszeitraum: 76 h, Probenumfang: 152, Mittelwert \pm SEM: (4,57 \pm 0,051) ng/ml, Amplitude \pm SEM: (0,56 \pm 0,046) ng/ml. Abbildung und nähere Angaben zum experimentellen Vorgehen siehe: E. Peschke und D. Peschke (1998b).

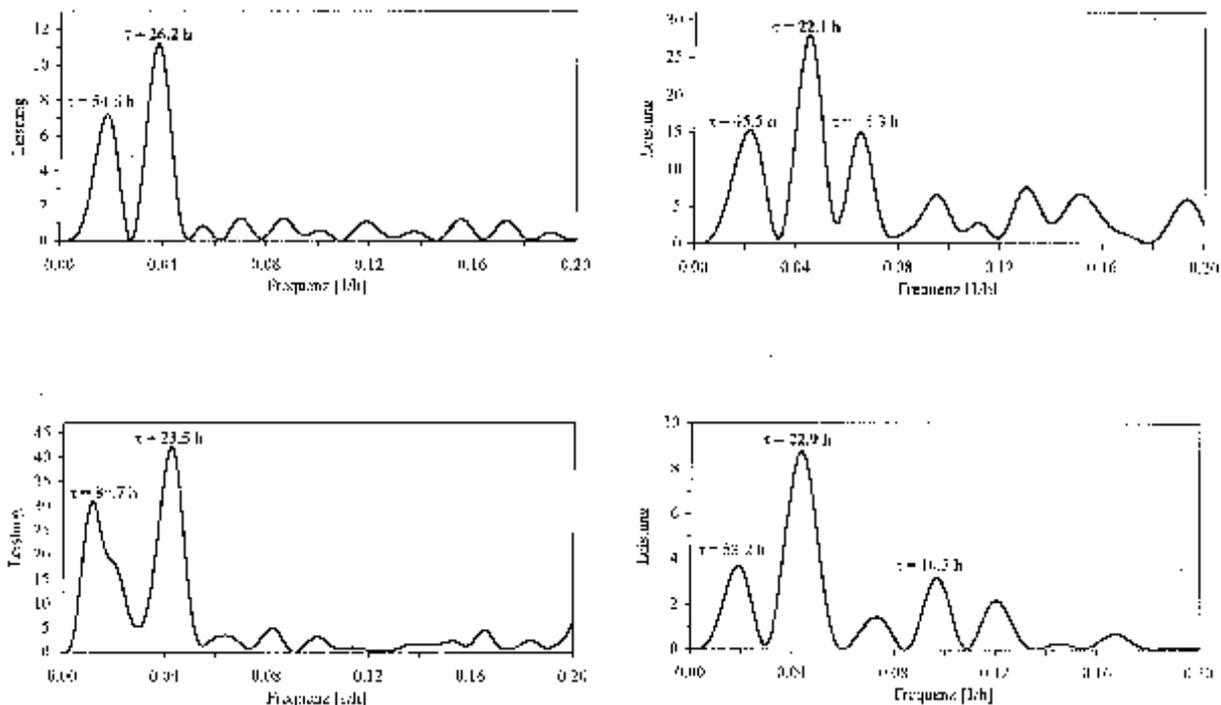


Abb. 17: Beispiele biomathematischer Evaluierung von Kraftspektren mittels MacAnova-Programm. Die Spektren zeigen neben stets signifikanten circadianen Perioden der Insulin-Sekretion (zwischen $\tau = 22,1$ h und $\tau = 26,2$ h) auch infra- und ultradiane Oszillationen, deren Leistungsspektren jedoch stets schwächer ausfielen. Abbildung und nähere Angaben zum experimentellen und mathematischen Vorgehen siehe: E. Peschke und D. Peschke (1998b).

Integrations- bzw. Koordinationszentren sehen (Übersicht: Stagner und Samols, 1985). An diesem Punkt setzen nun eigene Untersuchungen mit der Zielstellung an, festzustellen, ob isolierte pankreatische Inseln neben den bekannten hochfrequenten Pulsationen mit Periodenlängen im Sekunden- oder Minutenbereich (Weigle, 1987; Hellman et al., 1994; Cunningham et al., 1996) auch circadiane Rhythmen der Insulinsekretion generieren können und ob möglicherweise Melatonin als hormoneller Zeitgeber synchronisierenden Einfluss auf die pankreatische Insel unter *in vitro*-Bedingungen nehmen kann. Oben zitierte Untersuchungen wie beispielsweise von Boden et al. (1996) legen die Vermutung nahe, dass beim Menschen vorgenommene Untersuchungen zur Rhythmik der Insulinsekretion einen engen Zusammenhang zwischen Melatonin und Insulin in dem Sinne aufweisen, dass nächtlich hohe Melatoninspiegel von niedrigen Insulinspiegeln und um-

gekehrt niedrige Melatoninspiegel am Tage von hohen Insulinspiegeln begleitet sind.

Wie bereits betont, ist auch hier wiederum hervorzuheben, dass allein die Etablierung der oben beschriebenen Perifusionstechnik die im Folgenden zu beschreibenden Untersuchungen ermöglicht hat, weil mit dieser *in vitro*-Technik Beobachtungszeiträume von bis zu 7 Tagen möglich wurden, ohne dass die Inseln messbare Schäden erkennen ließen. Insgesamt wurden der Insulingehalt halbstündig gewonnener Proben von 10 Experimenten radioimmunologisch bestimmt und die Daten mit statistischen Tests analysiert. Im Einzelnen wurden die Periodenlänge (τ) mit dem MacAnova-Programm und die Testung auf Signifikanz mit dem χ^2 -Periodogramm vorgenommen. Im Ergebnis konnte festgestellt werden, dass circadiane Rhythmen mit Periodenlängen (τ) zwischen 21,8 und 26,2 Stunden auftraten (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes:

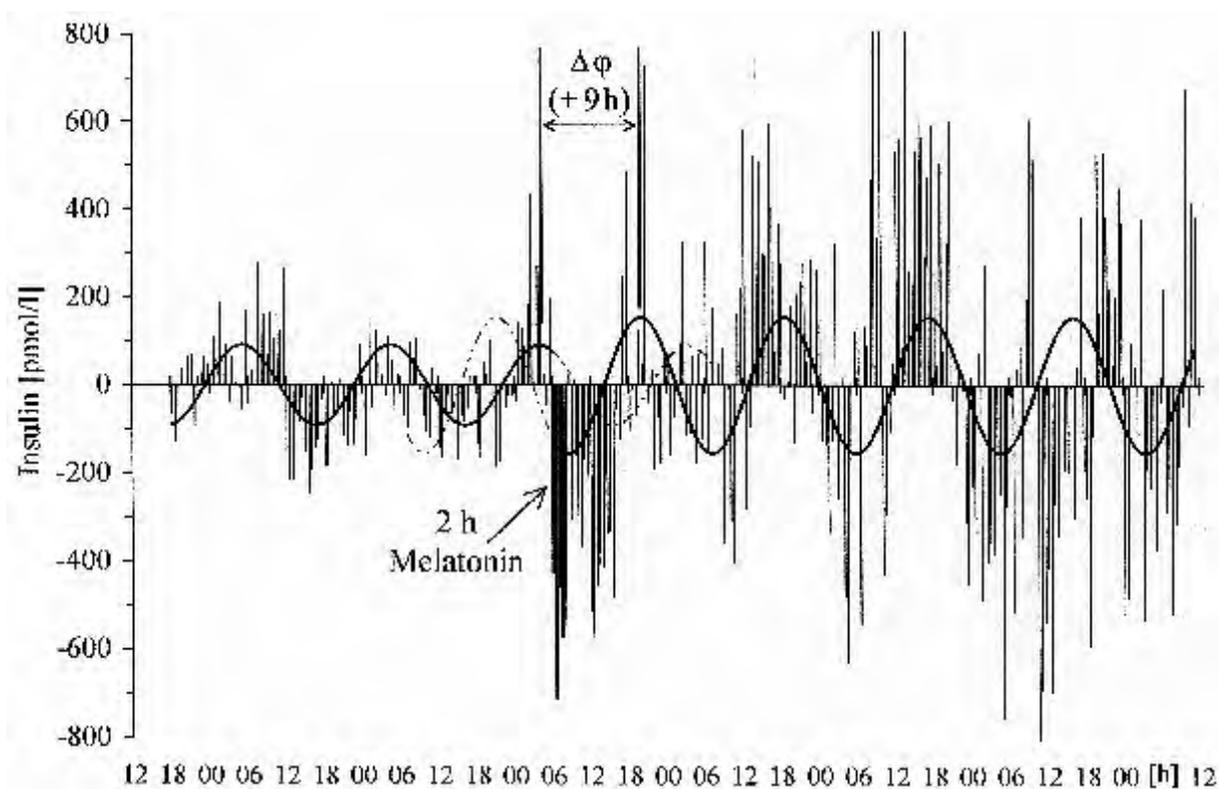


Abb. 18: Beispiel für Phasen-Response Untersuchungen Glucose-stimulierter Inseln (8,6 mmol/l Glucose) nach Trendbereinigung und Abtragung der positiven und negativen Abweichungen vom Mesor, der hier gleich „0“ gesetzt wurde. Der Versuchszeitraum betrug ca. 7 Tage. Nach 2,5 Tagen wurden für 2 Stunden 10 nmol/l Melatonin als hormoneller Zeitgeber verabreicht (schwarze Säulen). Es zeigt sich, dass nach Melatoningabe die Periodenlänge (τ) von 22,9 h nahezu beibehalten, die Phase jedoch um ca. 9 Stunden vorverlagert wurde. Abbildung und nähere methodologische Angaben siehe: E. Peschke und D. Peschke (1998b).

23,59 h \pm 0,503 h), wobei der Mittelwert der Insulinfreisetzung (1038 \pm 13) pmol/l und der Mittelwert der Amplitude (88 \pm 17) pmol/l betragen. Insgesamt konnte bei 7 der 10 Experimente statistische Signifikanz gesichert werden (Abb. 16). Auf Grund der biomathematischen Evaluierung mittels des MacAnova-Programms konnten zusätzlich infra- und ultradiane Oscillationen ermittelt werden, deren Kraftspektren jedoch im Vergleich zu den circadianen Mustern generell geringer waren und hier nicht weiter berücksichtigt werden sollen (Abb. 17).

Nachdem eine statistisch signifikante circadian-rhythmische Insulinsekretion pankreatischer Ratten-Inseln *in vitro* als gesichert angesehen werden konnte, war von besonderem Interesse, ob die rhythmische Insulinfreisetzung als konservierte Rhythmik des Spenderorganismus zu verstehen war oder ob die circadian-periodische Insulinsekretion in den isolierten Inseln selbst generiert wird. Um dieser Frage näher zu kommen, wurden *phase-response*-Kurven mit Melatonin als hormo-

nellem Zeitgeber erstellt. Würde Melatonin (in unserem Falle in einer Konzentration von 10 nmol/l für 2 Stunden dem Medium beigesetzt) zu einer Phasenverschiebung unter Erhalt der Periodenlänge führen, wäre mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass die beschriebenen Rhythmen in der Insel selbst generiert wurden. Bisher wurden 2 dieser äußerst aufwendigen und kostspieligen Untersuchungen mit dem Ergebnis durchgeführt, dass nach Melatoninapplikation die Periodenlänge beibehalten, die Phase jedoch um 9 Stunden vorverlagert wurde (Abb. 18). Dieser Phasenshift berechtigt, davon auszugehen, dass die Insulinsekretion einer circadianen Rhythmik unterliegt, die in der Insel selbst generiert wird. Dieser Befund, der unter *in vitro*-Bedingungen erstmals erhoben wurde, ist weiterhin ein Beleg dafür, dass die pankreatische B-Zelle unter dem Einfluss von Melatonin steht (nähere Angaben siehe D. Peschke et al., 1997; E. Peschke et al., 1997b; E. Peschke und D. Peschke, 1998b).

IV. Zusammenfassung

Untersuchungen zum Einfluss von Pinealextrakten und später von Melatonin auf den Glucosestoffwechsel gehen bis auf den Anfang des vergangenen Jahrhunderts zurück. Die Ergebnisse, die nach Applikation von Melatonin bzw. Pinealextrakten oder nach Pinealektomie an der pankreatischen Insel, der Insulinsekretion, am Glucosestoffwechsel sowie am Carbohydratstoffwechsel ganz allgemein erhoben wurden, sind bis in unsere Zeit hinein von großer Widersprüchlichkeit gekennzeichnet, was in hohem Maße dem unterschiedlichen experimentellen Design und der Nichtbeachtung chronobiologischer Aspekte anzulasten ist.

Durch eigene Untersuchungen konnte in den vergangenen Jahren mit Hilfe eines besonders leistungsfähigen Peri- bzw. Superfusionssystems, das einen hohen Grad an Standardisierung ermöglicht, sichergestellt werden, dass Melatonin die Insulinsekretion der pankreatischen B-Zelle hemmt und dass diese Hemmung durch einen direkten Einfluss von Melatonin auf die B-Zelle zustande kommt. Dafür spricht, dass der genannte Effekt sowohl an der pankreatischen Insel als auch an Glucose-responsiven Insulin-produzierenden Insulinomazellen (INS1) nachweisbar ist und dass na-

he verwandte Substanzen, wie beispielsweise Serotonin, andersartige Befunde, in diesem Falle eine Steigerung der Insulinsekretion, bewirkten. Besondere Bedeutung und Neuigkeitswert hat der in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesene Tatbestand, dass die Melatonineffekte über Membranrezeptoren vermittelt werden. Sowohl funktionelle als auch autoradiographische sowie molekularbiologische Untersuchungen, einschließlich Bindungsstudien, haben den eindeutigen Nachweis erbracht, dass der Melatonin-Einfluss Rezeptor-mediert ist und dass es sich zweifelsfrei um den MT₁-Rezeptor handelt. Nicht unwesentlich war in diesem Zusammenhang der Ausschluss anderer Melatonin-Rezeptoren, wie beispielsweise des MT₂-Rezeptors. Durch weiterführende Untersuchungen zur intrazellulären Signaltransduktion konnte ferner der Nachweis erbracht werden, dass Melatonin – ebenso wie auch von cerebralen Strukturen bekannt – nach seiner Membranrezeptor-Bindung über Vermittlung von G_i-Proteinen einen hemmenden Einfluss auf die Adenylatcyklase hat und konsekutiv die Hemmung der Insulinsekretion über eine Senkung des cAMP-Spiegels zustande kommt (Abb. 19). Schließlich konnte nach-

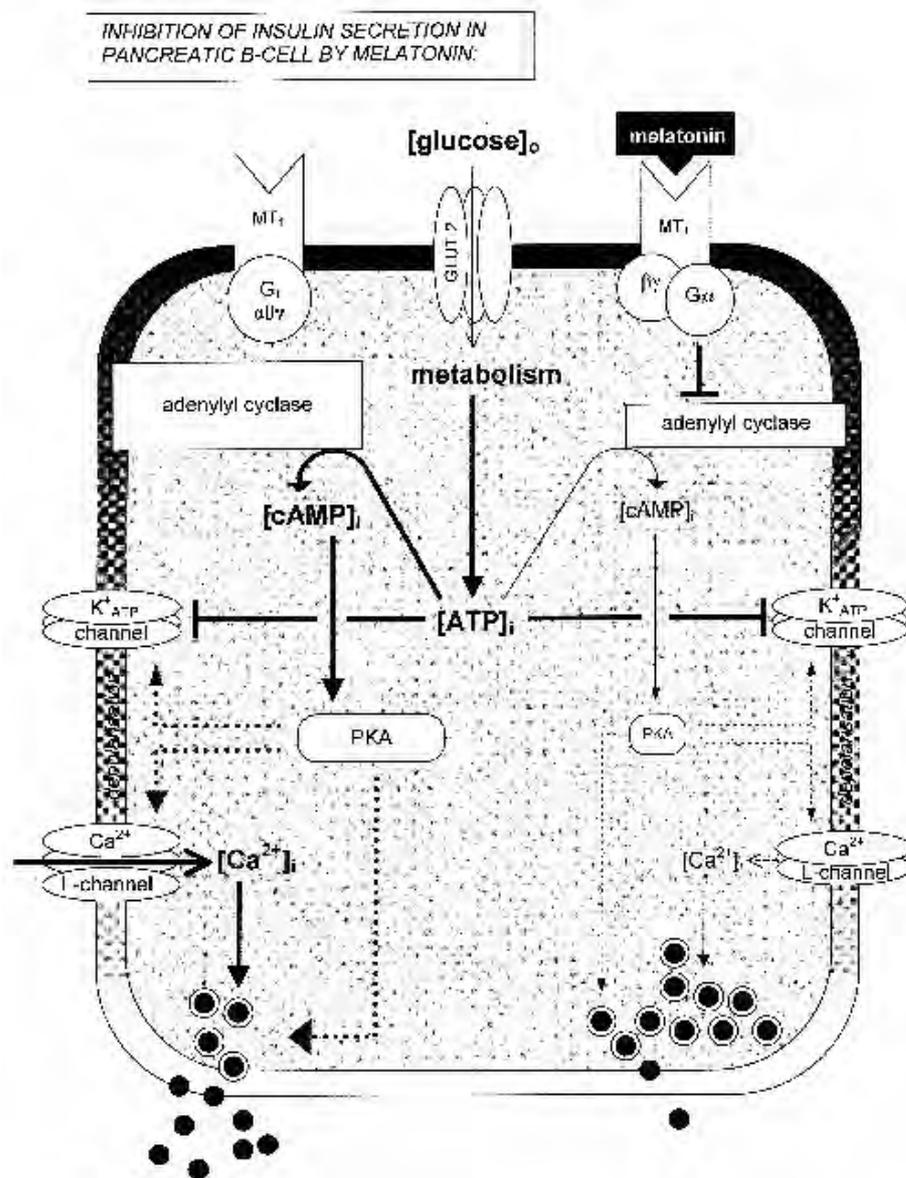


Abb. 19: Zusammenfassung der Ergebnisse in einem Zellschema, das die möglichen intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen der B-Zelle ohne (linke Seite) und mit Melatoninapplikation (rechte Seite) widerspiegeln soll. Die Abbildung berücksichtigt die eigenen Ergebnisse und lehnt sich an bekannte Mechanismen an, in denen jedoch der Einfluss von Melatonin keine Berücksichtigung findet. Abbildung und nähere Angaben siehe E. Peschke et al. (2002b).

gewiesen werden, dass die Insulinsekretion einer circadianen Rhythmik unterliegt, die in den Inseln selbst generiert wird. *Phase-response*-Untersuchungen machen darüber hinaus deutlich, dass die pankreatische B-Zelle unter dem Einfluss von Melatonin steht, das einen rhythmisierenden Einfluss auf die Insulinsekretion ausübt. Diese Aussagen gründen sich auf die Beobachtung, dass Melatoningabe unter Erhalt der Periodenlänge die Phasenlage der Insulinsekretion beeinflussen kann (in unserem Falle erfolgte eine Vorverlagerung um

9 Stunden). Jüngste Veröffentlichungen anderer Autoren, die während der Drucklegung des Bandes erschienen sind, bestätigen grundsätzlich die im vorliegenden Beitrag mitgeteilten eigenen Befunde sowohl hinsichtlich des Einflusses von Melatonin auf Insulinsekretion und intrazelluläre Sekretionsmechanismen (Kemp et al., 2002; Picinato et al., 2002b) als auch einer circadian-rhythmischen Insulinsekretion isolierter pankreatischer Inseln (Picinato et al., 2002a). Weiterführenden Untersuchungen wird die Klärung der biologi-

schen Bedeutung der vorgestellten Ergebnisse, ihrer Übertragbarkeit auf das Tierexperiment bis hin zur klinischen Relevanz vorbehalten sein.

Danksagung: Die Ergebnisse wurden unter Mitarbeit von Valér Csernus, Jan-Dirk Fauteck, Thomas Hammer, Eckhard Mühlbauer, Ulrich Mußhoff und Dorothee Peschke gewonnen. Der Autor

dankt ferner Dr. Parlow vom National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease (Torrance, CA, USA) für die freundliche Überlassung des anti-cAMP-Antikörpers sowie Prof. Dr. Wollheim vom Department of Medicine der Universität Genf (Schweiz) für zahlreiche Ratschläge und die Überlassung der Zell-Linie INS1.

Schrifttum

- Alcozer, G., G. Giordano, D. Masciocco (1956) Studi sull'epifisi: influenza dell'estratto acquoso di pineale su alcuni aspetti del metabolismo glicidico in soggetti sani ed eucrinici. Arch. E. Maragliano Pat. Clin. 12: 1105–1113.
- Arendt, J. (1986) Role of the pineal gland in seasonal reproduction function in mammals. Oxford Rev. Reprod. Biol. 8: 266–320.
- Armstrong, S. M. (1989) Melatonin and circadian control in mammals. Experientia 45: 932–938.
- Atkins, T. W., C. J. Bailey, A. J. Matty (1973) The effect of melatonin on insulin secretion in rat and mouse. J. Endocr. 58: XVII–XVIII.
- Bailey, C. J., T. W. Atkins, A. J. Matty (1974) Melatonin inhibition of insulin secretion in the rat and mouse. Horm. Res. 5: 21–28.
- Balzer, I., B. Fuhrberg (1996) Presence of melatonin in the unicell *Euglena gracilis*. 5th Meet. Soc. Res. Biol. Rhythms, Amelia Island. Society for Research on Biological Rhythms, Charlottesville, p. 82.
- Balzer, I., B. Fuhrberg, R. Hardeland (1996) The neurohormone melatonin oscillates in a circadian fashion already in unicells. In: Brain and evolution, N. Elsner, H. U. Schnitzler, eds. Thieme, Stuttgart, Abstract 38, p. 228.
- Balzer, I., R. Hardeland (1995) Melatonin in green plants. In: Cellular rhythms and indolamines, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 152–161.
- Balzer, I., R. Hardeland (1996) Melatonin in algae and higher plants – possible new roles as a phytohormone and antioxidant. Bot. Acta 109: 180–183.
- Bartness, T. J., W. R. McGriff, M. P. Maharaj (1991) Effects of diabetes and insulin on photoperiodic responses in Siberian hamsters. Physiol. Behav. 49: 613–620.
- Benson, B., C. W. Miller, S. Sorrentino (1971) Effects of blinding on blood glucose and serum insulin-like activity in rats. Texas Rep. Biol. Med. 29: 513–525.
- Berggren, P. O., P. Arkhammar, M. D. S. Islam, L. Juntti-Berggren, H. Kindmark, M. Köhler, O. Larsson, T. Nilsson, J. Szecowka, Q. Zhang (1994) Molecular mechanisms involved in regulating cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in pancreatic B-cells. In: Insulin secretion and pancreatic B-cell research, P. R. Flatt, S. Lenzen, eds. Smith-Gordon, London, pp. 201–211.
- Berggren, P. O., O. Larsson (1994) Ca^{2+} and pancreatic B-cell function. Biochem. Soc. Trans. 22: 12–18.
- Bermudez, F. F., J. M. Forbes, M. H. Injidi (1983) Involvement of melatonin and thyroid hormones in the control of sleep, food intake and energy metabolism in the domestic fowl. J. Physiol. 337: 19–27.
- Binkley, S. (1990) The clockwork sparrow. Time, clocks and calendars in biological organisms. Prentice Hall, Englewood Cliffs.
- Binkley, S. (1993) Structures and molecules involved in generation and regulation of biological rhythms in vertebrates and invertebrates. Experientia 49: 648–653.
- Bizot-Espiard, J. G., A. Double, B. Cousin, D. Lesieur, B. Guardiola-Lemaitre, P. Delagrangé, A. Ktorza, L. Penicaud (1998a) Lack of melatonin effects on insulin action in normal rats. Horm. Metab. Res. 30: 711–716.
- Bizot-Espiard, J. G., A. Double, B. Guardiola-Lemaitre, P. Delagrangé, A. Ktorza, L. Penicaud (1998b) Diurnal rhythms in plasma glucose, insulin, growth hormone and melatonin levels in fasted and hyperglycaemic rats. Diabetes Metab. 24: 235–240.
- Boden, G., J. Ruiz, J. L. Urbain, X. Chen (1996) Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. Am. J. Physiol. 271: E246–E252.
- Brundage, J. M., L. Diao, W. R. Proctor, T. V. Dunwiddie (1997) The role of cyclic AMP as a precursor of extracellular adenosine in the rat hippocampus. Neuropharmacology 36: 1201–1210.
- Brunton, L. L., J. E. Buss (1980) Export of cyclic AMP by mammalian reticulocytes. J. Cyclic Nucleotide Res. 6: 369–377.
- Brunton, L. L., S. E. Mayer (1979) Extrusion of cyclic AMP from pigeon erythrocytes. J. Biol. Chem. 254: 9714–9720.
- Bünning, E. (1958) Das Weiterlaufen der „physiologischen Uhr“ im Säugerdarm ohne zentrale Steuerung. Naturwissenschaften 45: 68.

- Burns, J. K. (1973) Serum sodium and potassium and blood glucose levels in *cynomolgus* monkeys after administration of melatonin. *J. Physiol. (Lond.)* 232: 84P–85P.
- Buttaro, C. H., E. Rottini (1947) Ormoni e tasso aminoacidemico; azione dell'estratto epifisario sul tasso amino-acidemico. *Minerva Med.* 38: 54–56.
- Cagnacci, A., S. Arangino, A. Renzi, A. M. Paoletti, G. B. Melis, P. Cagnacci, A. Volpe (2001) Influence of melatonin administration on glucose tolerance and insulin sensitivity of postmenopausal women. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 54: 339–346.
- Carlson, L. L., D. R. Weaver, S. M. Reppert (1989) Melatonin signal transduction in hamster brain: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *Endocrinology* 125: 2670–2676.
- Cassone, V. M. (1991) Melatonin and suprachiasmatic nucleus. In: *Suprachiasmatic nucleus. The mind's clock*, D. C. Klein, R. Y. Moore, S. M. Reppert, eds. Oxford University Press, New York/Oxford, pp. 309–323.
- Champney, T. H., G. C. Brainard, B. A. Richardson, R. J. Reiter (1983) Experimentally-induced diabetes reduces nocturnal pineal melatonin content in the Syrian hamster. *Comp. Biochem. Physiol.* 76A: 199–201.
- Champney, T. H., A. P. Holtorf, C. M. Craft, R. J. Reiter (1986) Hormonal modulation of pineal melatonin synthesis in rats and Syrian hamsters: effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin injections. *Comp. Biochem. Physiol.* 83A: 391–395.
- Champney, T. H., R. W. Steger, D. S. Christie, R. J. Reiter (1985) Alterations in components of the pineal melatonin synthetic pathway by acute insulin stress in the rat and Syrian hamster. *Brain Res.* 338: 25–32.
- Chen, M. D., P. Y. Lin, W. H. Sheu (1999) Zinc coadministration attenuates melatonin's effect on nitric oxide production in mice. *Biol. Trace Elem. Res.* 69: 261–268.
- Chen, Z. S., K. Lee, G. D. Kruh (2001) Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17- β -D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. *J. Biol. Chem.* 276: 33747–33754.
- Chrousos, G. P., T. Brown, B. B. Bercu (1982) Pharmacologic effects of melatonin on hypothalamic-adenohypophyseal function in the nonhuman primate. *Neuroendocrinology* 34: 343–346.
- Coiro, V., P. P. Vescovi (1998) Alcoholism abolishes the effects of melatonin on growth hormone secretion in humans. *Neuropeptides* 32: 211–214.
- Coiro, V., R. Volpi, G. Caffarri, L. Capretti, C. Marchesi, G. Giacalone, P. Chiodera (1997) Effect of melatonin on hypoglycemia and metoclopramide-stimulated arginine vasopressin secretion in normal men. *Neuropeptides* 31: 323–326.
- Constantinescu, C. S., B. Hilliard, E. Ventura, A. Rostami (1997) Lucindole, a melatonin receptor antagonist, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Pathobiology* 65: 190–194.
- Conti, A., G. J. Maestroni (1996) Role of the pineal gland and melatonin in the development of autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *J. Pineal Res.* 20: 164–172.
- Conti, A., G. J. Maestroni (1998) Melatonin rhythms in mice: role in autoimmune and lymphoproliferative diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840: 395–410.
- Csaba, G., P. Barath (1971) Are Langerhans's islets influenced by the pineal body? *Experientia* 27: 962.
- Csaba, G., S. U. Nagy (1973) The regulatory role of the pineal gland on the thyroid gland, adrenal medulla and the islets of Langerhans. *Acta Biol. Med. Germ.* 31: 617–619.
- Csernus, V. J., T. Hammer, D. Peschke, E. Peschke (1998) Dynamic insulin secretion from perfused rat pancreatic islets. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 733–743.
- Csernus, V. J., A. V. Schally (1991) The dispersed cell superfusion system. In: *Neuroendocrine Research Methods*, B. D. Greenstein, ed. Harwood Acad. Publ., London, pp. 71–109.
- Cunningham, B. A., J. T. Deeney, C. R. Bliss, B. E. Corkey, K. Tornheim (1996) Glucose-induced oscillatory insulin secretion in perfused rat pancreatic islets and clonal β -cells (HIT). *Am. J. Physiol.* 271: E702–E710.
- Dahl, G. E., B. A. Buchanan, H. A. Tucker (2000) Photoperiodic effects on dairy cattle: a review. *J. Dairy Sci.* 83: 885–893.
- Damian, E. (1989) The antisteroid, antigonadotropic and metabolism-regulation activity of the pineal gland. *Rev. Roum. Med. Endocrinol.* 27: 57–64.
- de Lima, L. M., L. C. dos Reis, M. A. de Lima (2001) Influence of the pineal gland on the physiology, morphology and morphology of pancreatic islets in rats. *Rev. Bras. Biol.* 61: 333–340.
- Dhar, M., S. S. Dayal, C. S. Ramesh Babu, S. R. Arora (1983) Effect of melatonin on glucose tolerance and blood glucose circadian rhythm in rabbits. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 27: 109–117.
- Diaz, B., E. Blázquez (1986) Effect of pinealectomy on plasma glucose, insulin and glucagon levels in the rat. *Horm. Metab. Res.* 18: 225–229.
- Dodt, E. (1966) Vergleichende Physiologie der lichtempfindlichen Wirbeltier-Epiphyse. *Nova Acta Leopoldina* 31: 219–235.
- Dubbels, R., R. J. Reiter, E. Klenke, A. Goebel, E. Schnakenberg, C. Ehlers, H. W. Schiwar, W. Schloot (1995) Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pineal Res.* 18: 28–31.
- Ebadi, M., P. Govitrapong (1986) Neural pathways and neurotransmitters affecting melatonin synthesis. *J. Neur. Transmiss.* 21 (Suppl.): 125–155.

- Edmunds, L. N. (1988) Cellular and molecular bases of biological clocks. Models and mechanisms for circadian timekeeping. Springer, New York/Berlin/Heidelberg/London/Paris/Tokyo, pp. 166–297.
- Erlich, S. S., M. L. J. Apuzzo (1985) The pineal gland: anatomy, physiology, and clinical significance. *J. Neurosurg.* 63: 321–341.
- Falcon, J., J.-P. Collin (1989) Photoreceptors in the pineal of lower vertebrates: functional aspects. *Experientia* 45: 909–913.
- Fauteck, J. D., A. Lerchl, M. Bergmann, M. Møller, F. Fraschini, W. Wittkowski, B. Stankov (1994) The adult human cerebellum is a target of the neuroendocrine system involved in the circadian timing. *Neurosci. Lett.* 179: 60–64.
- Fehr, T. F., E. S. Dickinson, S. J. Goldman, L. L. Slakey (1990) Cyclic AMP efflux is regulated by occupancy of the adenosine receptor in pig aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 265: 10974–10980.
- Feldman, J. M., H. E. Lebovitz (1972) Structural determinants of indole amine action on *in vitro* insulin release. *Endocrinology* 91: 809–816.
- Finnegan, R. B., G. B. Carey (1998) Characterization of cyclic AMP efflux from swine adipocytes *in vitro*. *Obes. Res.* 6: 292–298.
- Frankel, B. J., M. J. Strandberg (1991) Insulin release from isolated mouse islets *in vitro*: no effect of physiological levels of melatonin or arginine vasotocin. *J. Pineal Res.* 11: 145–148.
- Fuhrberg, B., R. Hardeland (1995) In the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*, exposure to decreased temperature can elicit accumulation of melatonin by several orders of magnitude. In: Cellular rhythms and indolamines, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 20–24.
- Fuhrberg, B., R. Hardeland, B. Poeggeler, G. Behrmann (1997) Dramatic rises of melatonin and 5-methoxytryptamine in *Gonyaulax* exposed to decreased temperature. *Biol. Rhythm Res.* 28: 144–150.
- Gorray, K. C., W. B. Quay (1977) Evidence for a pineal contribution in mechanisms governing glucose homeostasis during darkness. In: 59th Annual Meeting, Endocrine Soc., Program and Abstracts, p. 306.
- Gorray, K. C., W. B. Quay, R. B. L. Ewart (1979) Effects of pinealectomy and pineal incubation medium and sonicates on insulin release by isolated pancreatic islets *in vitro*. *Horm. Metab. Res.* 11: 432–436.
- Gusek, W. (1968) Neue Befunde zur Morphologie und Funktion der Epiphysis cerebri. In: Ergebnisse der Allgemeinen Pathologie und Pathologischen Anatomie, P. Cohrs, W. Giese, H. Meessen, H. C. Stoerk, eds. Springer, Berlin/Heidelberg/New York, Bd. 50, S. 104–148.
- Gusek, W. (1981). Epiphyse. In: Pathologie der endokrinen Organe, W. Doerr, G. Seifert, E. Uehlinger, eds. Springer, Berlin/Heidelberg/New York.
- Gutzeit, R. (1896) Ein Teratom der Zirbeldrüse. Med. Diss., Königsberg.
- Hardeland, R., I. Balzer, B. Fuhrberg, I. Antolín (1996a) Melatonin and other methoxyindoles in non-vertebrates. In: Metabolism and cellular dynamics of indoles, R. Hardeland, ed. University of Göttingen, Göttingen, pp. 162–172.
- Hardeland, R., I. Balzer, B. Fuhrberg, G. Behrmann (1996b) Melatonin in unicellular organisms and plants. In: Frontiers of hormone research. Melatonin: a photoperiodic signal with diverse actions, P. L. Tang, S. F. Pang, R. J. Reiter, eds. Karger, Basel, pp. 1–6.
- Hardeland, R., B. Fuhrberg (1996) Ubiquitous melatonin – presence and effects in unicells, plants and animals. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 7: 25–45.
- Hattori, A., H. Migitaka, M. Iigo, M. Itoh, K. Yamamoto, R. Ohtani-Kaneko, M. Hara, T. Suzuki, R. J. Reiter (1995) Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 35: 627–634.
- Hellman, B., E. Gylfe, P. Bergsten, E. Grapengiesser, P. E. Lund, A. Berts, A. Tengholm, D. G. Pipeleers, Z. Ling (1994) Glucose induces oscillatory Ca²⁺ signalling and insulin release in human pancreatic beta cells. *Diabetologia* 37 (Suppl. 2): 11–20.
- Hoffman, R. A., L. B. Johnson, R. J. Reiter (1989) Regulation of melatonin in the Harderian glands of golden hamsters. *J. Pineal Res.* 6: 63–71.
- Hoyos, M., J. M. Guerrero, R. Perez-Cano, J. Olivan, F. Fabiani, A. Garcia-Perganeda, C. Osuna (2000) Serum cholesterol and lipid peroxidation are decreased by melatonin in diet-induced hypercholesterolemic rats. *J. Pineal Res.* 28: 150–155.
- Illnerová, H. (1988) Entrainment of mammalian circadian rhythms in melatonin production by light. *Pineal Res. Rev.* 6: 173–217.
- Illnerová, H., J. Vanecek (1980) Pineal rhythm in N-acetyltransferase activity in rats under different artificial photoperiods and in natural daylight in the course of a year. *Neuroendocrinology* 31: 321–326.
- Jedlitschky, G., B. Burchell, D. Keppler (2000) The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.* 275: 30069–30074.
- John, T. M., F. W. Beamish, J. C. George (1983) Diurnal impact of locomotory activity and melatonin and N-acetylserotonin treatment on blood metabolite levels in the rainbow trout. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 91: 115–120.
- John, T. M., M. Viswanathan, J. C. George, C. G. Scanes (1990) Influence of chronic melatonin implantation on circulating levels of catecholamines, growth hormone, thyroid hormones, glucose, and free fatty acids in the pigeon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79: 226–232.

- Jordan, H. E., J. A. E. Eyster (1911) The physiological action of extracts of the pineal body. *Am. J. Physiol.* 29: 115–123.
- Kadle, R., G. E. Folk (1983) Importance of circadian rhythms in animal cell cultures. *Comp. Biochem. Physiol.* 76A: 773–776.
- Kemp, D. M., M. Ubeda, J. F. Habener (2002) Identification and functional characterization of melatonin Mel 1a receptors in pancreatic β cells: potential role in incretin-mediated cell function by sensitization of cAMP signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191: 157–166.
- Kolár, J., I. Machácková, H. Illnerová, E. Prinsen, W. Van Dongen, H. A. Van Onckelen (1995) Melatonin in higher plant determined by radioimmunoassay and liquid chromatography-mass spectrometry. *Biol. Rhythm Res.* 26: 406.
- Kondrashin, A., M. Nesterova, Y. S. Cho-Chung (1999) Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase on the external surface of LS-174T human colon carcinoma cells. *Biochemistry* 38: 172–179.
- Korf, H. W. (1986) Zur Frage photoneuroendokriner Zellen und Systeme: Vergleichende Untersuchungen am Pinealkomplex. *Habil.-Schrift, Univ. Gießen*, 1986.
- Lang, J. (1999) Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur. J. Biochem.* 259: 3–17.
- Lerner, A. B., J. D. Case, R. V. Heinzelman (1959) Structure of melatonin. *J. Am. Chem. Soc.* 81: 6084–6092.
- Lerner, A. B., J. D. Case, Y. Takahashi, T. H. Lee, W. Mori (1958) Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 2587.
- Lissoni, P., M. Cazzaniga, G. Tancini, E. Scardino, R. Musci, S. Barni, M. Maffezzini, T. Meroni, F. Rocco, A. Conti, G. Maestroni (1997) Reversal of clinical resistance to LHRH analogue in metastatic prostate cancer by the pineal hormone melatonin: efficacy of LHRH analogue plus melatonin in patients progressing on LHRH analogue alone. *Eur. Urol.* 31: 178–181.
- Lynch, H. J., J. P. Eng, R. J. Wurtman (1973) Control of pineal indole biosynthesis by changes in sympathetic tone caused by factors other than environmental lighting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 1704–1707.
- Mahata, S. K., A. Mandal, A. Ghosh (1988) Influence of age and splanchnic nerve on the action of melatonin in the adrenomedullary catecholamine content and blood glucose level in the avian group. *J. Comp. Physiol. [B]* 158: 601–607.
- Maitra, S. K., M. Dey, R. Dey, S. Bhattacharya, A. Sengupta (2000a) Influence of photoperiods on glycemic and adrenal catecholaminergic responses to melatonin administrations in adult male roseringed parakeets, *Psittacula krameri* Neumann. *Indian J. Exp. Biol.* 38: 1111–1116.
- Maitra, S. K., M. Dey, S. Dutta, S. Bhattacharya, R. Dey, A. Sengupta (2000b) Influences of graded dose of melatonin on the levels of blood glucose and adrenal catecholamines in male roseringed parakeets (*Psittacula krameri*) under different photoperiods. *Arch. Physiol. Biochem.* 108: 444–450.
- Maitra, S. K., M. Dey, A. Panja, S. Bhattacharya, R. Dey, A. Sengupta (2000c) Diurnal profiles of blood glucose in relation to time of administration of melatonin in male spotted munia (*Lonchura punctulata*). *Biol. Rhythm Res.* 31: 220–229.
- Manchester, L. C., B. Poeggeler, F. L. Alvarez, G. B. Ogden, R. J. Reiter (1995) Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic prokaryote, *Rhodospirillum rubrum*: implications for an ancient antioxidant system. *Cell. Mol. Biol. Res.* 41: 391–395.
- Mazzucchelli, C., M. Pannacci, R. Nonno, V. Lucini, F. Fraschini, B. M. Stankov (1996). The melatonin receptor in the human brain: cloning experiments and distribution studies. *Mol. Brain Res.* 39: 117–126.
- McDermott, A. M., G. W. G. Sharp (1994) Multiple roles of cyclic AMP in the pancreatic B-cell. In: *Insulin secretion and pancreatic B-cell research*, P. R. Flatt, S. Lenzen, eds. Smith-Gordon, London, pp. 243–249.
- McKeown, B. A., T. M. John, J. C. George (1975) Diurnal variation in effects of melatonin on plasma growth hormone and glucose in the pigeon. *Endocr. Exp.* 9: 263–268.
- Meeking, D. R., J. D. Wallace, R. C. Cuneo, M. Forsling, D. L. Russell-Jones (1999) Exercise-induced GH secretion is enhanced by the oral ingestion of melatonin in healthy adult male subjects. *Eur. J. Endocrinol.* 141: 22–26.
- Mellado, C., V. Rodriguez, J. G. de Diego, E. Alvarez, E. Blázquez (1989) Effect of pinealectomy and of diabetes on liver insulin and glucagon receptor concentrations in the rat. *J. Pineal Res.* 6: 295–306.
- Mellado, M. C., M. V. Rodriguez, B. Diaz, J. G. de Diego, E. Alvarez, E. Blázquez (1986) Role of the pineal gland in the normal maintenance of circulating levels and of liver receptor concentrations of insulin and glucagon in the rat. In: *Proceedings of the workshop on the pineal gland*, R. J. Reiter, E. Blázquez, eds. Salamanca, pp. 52–56.
- Menendez-Pelaez, A. (1990) Melatonin and other indoles in the rodent Harderian glands: regulation and physiological significance. In: *Advances in pineal research*, R. J. Reiter, A. Lukaszyk, eds. Libbey, London, vol. 4, pp. 75–80.
- Menendez-Pelaez, A., G. R. Buzzell (1992) Harderian gland indoles. In: *Harderian glands, porphyrin metabolism, behavioral and endocrine effects*, S. M. Webb, R. A. Hoffman, M. L. Puig-Domingo, R. J.

- Reiter, eds. Springer, Berlin/Heidelberg/New York, pp. 219–234.
- Milcou, I., L. Nanu, R. Marcean (1957) De l'existence d'une hormone hypoglycémiant épiphysaire synergique de l'insuline. *Ann. Endocr. (Paris)* 18: 612–620.
- Milcou, I., L. Nanu, R. Marcean, V. Ionesco (1966) L'action de l'insuline sur le métabolisme glucidique chez l'animal épiphysectomisé. *Rev. Roum. Endocr.* 3: 127–131.
- Milcou, S. M., I. Milcou, L. Nanu (1963) Le rôle de la glande pinéale dans le métabolisme des glucides. *Ann. Endocr. (Paris)* 24: 233–254.
- Milcu, I., R. Marcean, V. Ionescu (1967) Controlul actiunii melatoninei asupra glicemiei. *Stud. Cercet. Endocr.* 18: 405–409.
- Milcu, I., L. Nanu (1979) Glanda pineala ca organ metabolic, Ed. Academiei R. S. R., Bucuresti.
- Milcu, I., L. Nanu, R. Marcean (1964a) Toleranta la iepure in sindriamele epifizare experimentale. *Stud. Cerc. Endocr.* 15: 307–312.
- Milcu, I., L. Nanu, R. Marcean, V. Ionescu (1965) Efectul epifizectomiei asupra metabolismului glucidici. *Studii pe sobolan. Stud. Cerc. Endoc.* 16: 17–24.
- Milcu, I., L. Nanu, R. Marcean, S. Sitaru (1961) Probleme in legatura cu testarea biologica a functiei hipoglicemianta a epifizei. *Stud. Cerc. Endocr.* 2: 719–729.
- Milcu, I., L. Nanu, R. Marcean, S. Sitaru (1963) L'action de l'extrait pinéal et de la pinéalectomie sur le glycogène hépatique et musculaire après infusion prolongée de glucose. *Stud. Cerc. Endocr.* 14: 651–655.
- Milcu, I., L. Nanu, R. Marcean, S. Sitaru (1964b) Cercetari asupra valorii diabetogene a epifizectomiei la miel. *Stud. Cerc. Endocr.* 15: 507–513.
- Milcu, I., L. Nanu, S. Sitaru, V. Teodoru (1962) Studiu comparativ al continutului in hormon hipoglicemiant al epifizei de bovine. *Stud. Cerc. Endocr.* 13: 365–372.
- Milcu, S. M. (1957) Epifiza, glanda endocrina, Ed. Academiei, Bucuresti.
- Milcu, S. M. (1968) Role de l'épiphyse dans le métabolisme glucidique. *J. Annu. Diabetol. Hotel. Dieu.* 9: 163–180.
- Milcu, S. M., I. Milcu (1958) Über ein hypoglykämisch wirkendes Hormon in der Zirbeldrüse. *Medizinische* 17: 711–715.
- Milcu, S. M., L. Nanu-Ionescu, I. Milcu (1971) The effect of pinealectomy on plasma insulin in rats. In: *The pineal gland*, G. E. W. Wolstenholme, J. Knight, eds. Churchill Livingstone, Edinburgh/London, pp. 345–357.
- Morgan, P. J., P. Barrett, D. G. Hazlerigg, G. Milligan, W. Lawson, A. MacLean, G. Davidson (1995) Melatonin receptors couple through a cholera toxin-sensitive mechanism to inhibit cyclic AMP in the ovine pituitary. *J. Neuroendocrinol.* 7: 361–369.
- Morgan, P. J., P. Barrett, H. E. Howell, R. Helliwell (1994) Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem. Int.* 24: 101–146.
- Munoz Barragán, L., J. A. López Gil, D. Toranzo, J. L. Blázquez, M. D. L. Pizarro, F. E. Pastor, M. I. Mosqueira (1986) The pineal gland: a neuroendocrine „crossroad“. In: *Proceedings of the workshop on the pineal gland*, R. J. Reiter, E. Blázquez, eds. Salamanca, pp. 57–61.
- Munoz Barragán, L., D. Toranzo, E. Blázquez, M. Ghigliione, F. E. Pastor (1983) Role of the pineal gland on insulin and glucagon release of control and diabetic rats. *Diabetes* 32 (Suppl. 1): 141A.
- Munoz Barragán, L., D. Toranzo, E. Blázquez, F. E. Pastor, M. I. Mosqueira, J. A. López, J. L. Blázquez (1984) A radio-immunoanalytical and immunocytochemical study on A and B insular cells in response to pinealectomy or pineal denervation. *Diabetologia* 27: 313A.
- Nanu, L., R. Marcean, V. Ionescu, I. Milcou (1969) Correlations between pineal body and pyruvemia levels. *Rev. Roum. Endocrinol.* 6: 141–147.
- Nanu-Ionescu, L., V. Ionescu (1969) Le glande pinéale et le métabolisme de l'insuline. I. Le niveau sanguin de l'activité insulinaire totale et de l'insuline „libre“ et „liée“ dans l'apinéalisme expérimental. *Stud. Cerc. Endocr.* 20: 237–243.
- Nanu-Ionescu, L., R. Marcean (1970) La glande pinéale et le métabolisme de l'insuline. II. Les facteurs plasmatique anti-insuliniques dans l'apinéalisme expérimental. *Rev. Roum. Endocr.* 2: 55–61.
- Nanu-Ionescu, L., R. Marcean, V. Ionescu, I. Milcu (1970) La glande pinéale et le métabolisme de l'insuline. Niveau plasmatique de l'activité insulinaire „suppressible“ et „non-suppressible“ dans l'apinéalisme expérimental. *Rev. Roum. Endocr.* 7: 135–143.
- Neacșu, C. (1988) Pineal – pancreas interactions: pineal hormone E5 action on insulin activity. *Rev. Roum. Morphol. Embryol. Physiol., Physiologie (Bucuresti)*, 25: 119–127.
- Nijima, A., S. J. Chun, T. Shima, J. G. Bizot-Espiard, B. Guardiola-Lemaitre, K. Nagai (1998) Effect of intravenous administration of melatonin on the efferent activity of the adrenal nerve. *J. Auton. Nerv. Syst.* 71: 134–138.
- Nowak, J. Z., J. B. Zawilska (1998) Melatonin and its physiological and therapeutic properties. *Pharm. World Sci.* 20: 18–27.
- Obersteiner, H. (1888) *Anleitung zum Studium des Baues der nervösen Centralorgane im gesunden und kranken Zustande*. Deuticke, Leipzig.
- O'Brien, I. A., I. G. Lewin, J. P. O'Hare, J. Arendt, R. J. Corral (1986) Abnormal circadian rhythm of melatonin in the rat. *J. Neuroendocrinol.* 8: 361–369.

- tonin in diabetic autonomic neuropathy. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 24: 359–364.
- Oksche, A. (1987) Pinealocytes as photoneuroendocrine units of neuronal origin: concepts and evidence. *Adv. Pineal Res.* 2: 1–18.
- Oksche, A. (1988). Sensory and secretory potencies and differentiations of the central nervous system. *Acta anat.* 132: 216–224.
- Orlov, S. N., N. V. Maksimova (1999) Efflux of cyclic adenosine monophosphate from cells: mechanisms and physiological implications. *Biochemistry (Mosc.)* 64: 127–135.
- Ostrowska, Z., B. Kos-Kudła, E. Swietochowska, B. Marek, D. Kajdaniuk, N. Ciesielska-Kopacz (2001) Influence of pinealectomy and long-term melatonin administration on GH-IGF-I axis function in male rats. *Neuroendocrinol. Lett.* 22: 255–262.
- Pang, S. F., G. M. Brown, L. J. Grota, J. W. Chambers, R. L. Rodman (1977) Determination of N-acetylserotonin and melatonin activities in the pineal gland, retina, Harderian gland, brain and serum of rats and chickens. *Neuroendocrinology* 23: 1–13.
- Parhon, C. I. (1939) *Congrès d'Endocrinologie de Bucarest*, vol. I, p. 187.
- Parhon, C. I., I. Potop, E. Felix, V. Boeru (1952) Influenta epifisectomiei si a administrarii de extract epifisar asupra unor data metabolice privind mineralele (Ca, K, P, Si, Mg), lipidele, protidele si glucidele, la sobolanul alb adult. *Stud. Cerc. Endocr.* 3: 321–329.
- Payne, A. P. (1994) The harderian gland: a tercentennial review. *J. Anat.* 185: 1–49.
- Persaud, S. J., P. M. Jones, S. L. Howell (1994) Involvement of protein kinases in the regulation of insulin secretion. In: *Insulin secretion and pancreatic B-cell research*, P. R. Flatt, S. Lenzen, eds. Smith-Gordon, London, pp. 251–256.
- Peschke, D. (1994) Zum jahreszeitbezogenen Pinealeinfluß auf nutritive und metabolische Verhältnisse der männlichen Wistar-Ratte sowie integrierte endokrine und hypothalamische Regulationsmechanismen. *Habil.-Schrift, Univ. Halle*, 1994.
- Peschke, D., A. Beckmann, E. Peschke (1997) Erste Befunde zur circadian-rhythmischen Insulinfreisetzung isolierter pankreatischer Ratteninseln unter dynamischen perfusionstechnischen *in vitro*-Bedingungen. *Verh. Anat. Ges.* 179 (Suppl.): 284.
- Peschke, D., E. Peschke, B. Mess (1987) Circannual rhythm and increase of body weight and food intake in the young Wistar-rat following pinealectomy and ganglionectomy. *Neuroendocrinol. Lett.* 9: 321–327.
- Peschke, D., F. Schmidt, E. Peschke (2001) Perfusionstechnische Untersuchungen zum Einfluß von Melatonin und Serotonin auf Insulinsekretion und Signaltransduktionswege der B-Zelle pankreatischer Inseln neonater Ratten. *Verh. Anat. Ges.* 183 (Suppl.): 271.
- Peschke, E., J. D. Fauteck, U. Musshoff, F. Schmidt, A. Beckmann, D. Peschke (2000a) Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J. Pineal Res.* 28: 156–164.
- Peschke, E., J. D. Fauteck, U. Musshoff, F. Schmidt, D. Peschke (1999) Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of rats: functional, autoradiographic and molecular investigations. *Verh. Anat. Ges.* 181 (Suppl.): 295–296.
- Peschke, E., J. D. Fauteck, D. Peschke (1998) Gibt es funktionelle Melatonin-Rezeptoren in der pankreatischen Insel neonater Ratten? *Verh. Anat. Ges.* 180 (Suppl.): 326–327.
- Peschke, E., T. Hammer, D. Peschke, V. Csernus (1995) *In vitro*-Untersuchungen zur dynamischen Insulinfreisetzung aus LANGERHANSschen Inseln der Ratte. I. Methodologie und Basisbefunde. *Verh. Anat. Ges.* 177 (Suppl.): 156.
- Peschke, E., U. Musshoff, V. Csernus, E. Mühlbauer, E. Chankiewitz, D. Peschke (2002a) Rezeptor(MT₁)-mediierter Einfluss von Melatonin auf cAMP-Spiegel und Insulinsekretion von Glucose-responsiven, Insulin-produzierenden Ratten-Insulinoma-Zellen (INS1). *Verh. Anat. Ges.* 184 (Suppl.):
- Peschke, E., U. Musshoff, V. J. Csernus, E. Mühlbauer, E. Chankiewitz, D. Peschke (2002b). Receptor(MT₁) mediated influence of melatonin on cAMP content and insulin secretion of insulinoma cells INS-1. *J. Pineal Res.* 33: 1–9.
- Peschke, E., U. Musshoff, J. D. Fauteck, F. Schmidt, T. Hammer, D. Peschke (2001) The pancreatic insulin producing β -cell presents the melatonin_{1a} receptor: functional, autoradiographic and molecular investigations of pancreatic islets and INS1-cells. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 109 (Suppl.1): 11.
- Peschke, E., D. Peschke (1997) *In vitro* investigations of the melatonin effect on the insulin release from perfused rat pancreatic islets stimulated by glucose, potassium chloride, forskolin and Bay K 8644. *Verh. Anat. Ges.* 179 (Suppl.): 155–156.
- Peschke, E., D. Peschke (1998a) Phänomene und Interpretationsansätze zum Melatonineinfluß auf die Insulinsekretion *in vitro*. *Verh. Anat. Ges.* 180 (Suppl.): 67–68.
- Peschke, E., D. Peschke (1998b) Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia* 41: 1085–1092.
- Peschke, E., D. Peschke (2001) Einflüsse von Melatonin auf die Insulinsekretion – eine Übersicht. *Verh. Anat. Ges.* 183 (Suppl.): 19–20.
- Peschke, E., D. Peschke, A. Beckmann (1997b) Circadian rhythm of insulin secretion in isolated rat pancreatic islets *in vitro*. *J. Biol. Rhythm Res.* 28 (Suppl.): 127–128.
- Peschke, E., D. Peschke, J. D. Fauteck, F. Schmidt, U. Musshoff (2000b) Untersuchungen zum Nachweis

- von Melatonin_{1a}-Rezeptoren in der pankreatischen Insel neonater Ratten. *Verh. Anat. Ges.* 182 (Suppl.): 201–202.
- Peschke, E., D. Peschke, T. Hammer, V. Csernus (1996a) Zum Einfluß von Melatonin und Serotonin auf die Insulin-Freisetzung der pankreatischen Insel unter dynamischen perfusionstechnischen *in vitro*-Bedingungen. *Verh. Anat. Ges.* 178 (Suppl.): 312–313.
- Peschke, E., D. Peschke, T. Hammer, V. Csernus (1996b) Opposite effects of melatonin and serotonin on glucose-stimulated insulin release from perfused rat pancreatic islets *in vitro*. 7th European Pineal Society Colloquium, Sitges, Spain, March 28–31, p. 56.
- Peschke, E., D. Peschke, T. Hammer, V. Csernus (1997a) Influence of melatonin and serotonin on glucose-stimulated insulin release from perfused rat pancreatic islets *in vitro*. *J. Pineal Res.* 23: 156–163.
- Pévet, P. (1988) The role of the pineal gland in the photoperiodic control of reproduction in different hamster species. *Reprod. Nutr. Dev.* 28: 443–458.
- Pévet, P., M. G. M. Balemans, W. C. Legerstee, B. Vivien-Roels (1980) Circadian rhythmicity of the activity of hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) in the formation of melatonin and 5-methoxytryptophol in the pineal, retina and Harderian gland of the golden hamster. *J. Neural. Transm.* 49: 229–245.
- Pévet, P., B. Vivien-Roels, M. Masson-Pévet, S. Steinlechner, D. Skene, B. Canguilhem (1989) Melatonin, serotonin, 5-hydroxyindole-3-acetic acid and N-acetyltransferase in the pineal gland of the European hamster (*Cricetus cricetus*) kept under natural environmental conditions: Lack of a day/night rhythm in melatonin formation in spring and early summer. *J. Pineal Res.* 6: 233–242.
- Picinato, M. C., E. P. Haber, A. R. Carpinelli, J. Cipolla-Neto (2002a) Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *J. Pineal Res.* 33: 172–177.
- Picinato, M. C., E. P. Haber, J. Cipolla-Neto, R. Curi, C. R. de Oliveira Carvalho, A. R. Carpinelli (2002b) Melatonin inhibits insulin secretion and decreases PKA levels without interfering with glucose metabolism in rat pancreatic islets. *J. Pineal Res.* 33: 156–160.
- Poeggeler, B., I. Balzer, J. Fischer, G. Behrmann, R. Hardeland (1989) A role of melatonin in dinoflagellates? *Acta Endocrinol.* 120 (Suppl.1): 97.
- Poeggeler, B., I. Balzer, R. Hardeland, A. Lerchl (1991) Pineal hormone melatonin oscillates also in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Naturwissenschaften* 78: 268–269.
- Popescu-Inotesti, C. (1924) L'insuline par voie rachidienne insuline et épiglandol. *Rev. Francaise d'Endocr.* 2: 346–348.
- Prakash, P., M. Laloraya, P. Kumar (1998) Influence of a melatonin implant on the free radical load in avian thyroid and its relation with thyroid hormonogenesis. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46: 1249–1258.
- Quay, W. B., K. C. Gorray (1980) Pineal effects on metabolism and glucose homeostasis: evidence for lines of humoral mediation of pineal influences on tumor growth. *J. Neural Transm.* 47: 107–120.
- Rasmussen, D. D., B. M. Boldt, C. W. Wilkinson, S. M. Yellon, A. M. Matsumoto (1999) Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology* 140: 1009–1012.
- Rasmussen, D. D., D. R. Mitton, S. A. Larsen, S. M. Yellon (2001) Aging-dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses. *J. Pineal Res.* 31: 89–94.
- Reiter, R. J. (1974) Circannual reproductive rhythms in mammals related to photoperiod and pineal functions. A review. *Chronobiologia* 1: 365–395.
- Reiter, R. J. (1980) The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr. Rev.* 1: 109–131.
- Reiter, R. J. (1987) The mammalian pineal gland: its adaptive significance for reproductive responses to environmental changes. *South Afr. Sci.* 83: 651–656.
- Reiter, R. J. (1991a) Pineal gland: interface between the photoperiodic environment and the endocrine system. *Trends Endocrinol. Metab.* 2: 13–19.
- Reiter, R. J. (1991b) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* 12: 151–180.
- Reiter, R. J. (1991c) Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol. Cell. Endocrinol.* 79: C153–C159.
- Reiter, R. J. (1993) The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49: 654–664.
- Reiter, R. J., J. H. Britt, J. D. Armstrong (1987) Absence of a nocturnal rise in either norepinephrine, N-acetyltransferase, hydroxyindole-O-methyltransferase, or melatonin in the pineal gland of the domestic pig kept under natural environment. *Neurosci. Lett.* 81: 171–176.
- Rensing, L. (1970) Die circadiane Rhythmik von Zellen *in vitro*. *Zool. Anz. (Suppl.)* 33: 166–171.
- Reppert, S. M., C. Godson, C. D. Mahle, D. R. Weaver, S. A. Slaugenhaupt, J. F. Gusella (1995a) Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel_{1b} melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8734–8738.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver, V. M. Cassone, C. Godson, L. F. Kolakowski, Jr. (1995b) Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron* 15: 1003–1015.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver, T. Ebisawa (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13: 1177–1185.

- Reuss, S. (1993) Das Werk der inneren Uhr. Zur Neuroanatomie des circadianen Systems der Säuger. *Naturwissenschaften* 80: 501–510.
- Reuss, S. (1996) Components and connections of the circadian timing system in mammals. *Cell Tiss. Res.* 285: 353–378.
- Rietveld, W. J. (1992) The suprachiasmatic nucleus and other pacemakers. In: *Biologic rhythms in clinical and laboratory medicine*, Y. Touitou, E. Haus, eds. Springer, Berlin/Heidelberg, pp. 55–64.
- Rindler, M. J., M. M. Bashor, N. Spitzer, M. H. Saier, Jr. (1978) Regulation of adenosine 3':5'-monophosphate efflux from animal cells. *J. Biol. Chem.* 253: 5431–5436.
- Rodriguez, V., C. Mellado, E. Alvarez, J. G. de Diego, E. Blázquez (1989) Effect of pinealectomy on liver insulin and glucagon receptor concentrations in the rat. *J. Pineal Res.* 6: 77–88.
- Rosenberg, P. A., R. Knowles, K. P. Knowles, Y. Li (1994) Beta-adrenergic receptor-mediated regulation of extracellular adenosine in cerebral cortex in culture. *J. Neurosci.* 14: 2953–2965.
- Rotschuh, K. E. (1969) René Descartes: „Über den Menschen“ (1632) sowie „Beschreibung des menschlichen Körpers“ (1648). Nach der ersten französischen Ausgabe von 1664 übersetzt und mit einer historischen Einleitung und Anmerkungen versehen. Verlag Lambert Schneider, Heidelberg.
- Sandyk, R. (1993) Weak magnetic fields antagonize the effects of melatonin on blood glucose levels in Parkinson's disease. *Int. J. Neurosci.* 68: 85–91.
- Shima, T., S. J. Chun, A. Nijima, J. G. Bizot-Espiard, B. Guardiola-Lemaitre, M. Hosokawa, K. Nagai (1997) Melatonin suppresses hyperglycemia caused by intracerebroventricular injection of 2-deoxy-D-glucose in rats. *Neurosci. Lett.* 226: 119–122.
- Shiu, S. Y. W., N. Ng, S. F. Pang (1996) A molecular perspective of the genetic relationships of G-protein coupled melatonin receptor subtypes. *J. Pineal Res.* 20: 198–204.
- Smythe, G. A., L. Lazarus (1974) Suppression of human growth hormone secretion by melatonin and cyproheptadine. *J. Clin. Invest.* 54: 116–121.
- Stagner, J. I., E. Samols (1985) Role of intrapancreatic ganglia in regulation of periodic insular secretion. *Am. J. Physiol.* 248: E522–E530.
- Stankov, B., S. Capsoni, V. Lucini, J. Fauteck, S. Gatti, B. Gridelli, G. Biella, B. Cozzi, F. Fraschini (1993) Autoradiographic localisation of putative melatonin receptors in the brain of two old world primates: *Cercopithecus aethiops* and *Papio ursinus*. *Neuroscience* 52: 459–468.
- Stankov, B., F. Fraschini, R. J. Reiter (1991) Melatonin binding sites in the central nervous system. *Brain Res. Rev.* 16: 245–256.
- Steffgen, J., S. Rohrbach, E. Beery, D. Ersoy, H. Jarry, M. Metten, S. R. Bornstein, G. A. Müller, G. Burckhardt (1999) Demonstration of a probenecid-inhibitable anion exchanger involved in the release of cortisol and cAMP and in the uptake of p-aminohippurate in bovine adrenocortical cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 9: 72–80.
- Sugden, D. (1989) Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia* 45: 922–931.
- Suttie, J. M., B. H. Breier, P. D. Gluckman, R. P. Littlejohn, J. R. Webster (1992) Effects of melatonin implants on insulin-like growth factor 1 in male red deer (*Cervus elaphus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 87: 111–119.
- Tannenbaum, M. G., R. J. Reiter, M. K. Vaughan, M. E. Troiani, A. Gonzalez-Brito (1987). Adrenalectomy prevents changes in rat pineal melatonin content and N-acetyltransferase activity induced by acute insulin stress. *J. Pineal Res.* 4: 395–402.
- Terzolo, M., A. Piovesan, A. Ali, A. Codegone, A. Pia, G. Reimondo, M. Torta, P. Paccotti, G. Borretta, A. Angeli (1995) Circadian profile of serum melatonin in patients with Cushing's syndrome or acromegaly. *J. Endocrinol. Invest.* 18: 17–24.
- Tilden, A. R., M. A. Becker, L. L. Amma, J. Arciniega, A. K. McGraw (1997) Melatonin production in an aerobic photosynthetic bacterium: an evolutionarily early association with darkness. *J. Pineal Res.* 22: 102–106.
- Ueck, M. (1982) Morphologie und Physiologie des Pinealorgans in der Evolution der Wirbeltiere. *Verh. Dtsch. Zool. Ges., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart*, S. 61–80.
- Vanecek, J. (1998) Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol. Rev.* 78: 687–721.
- Van Tassel, D. L., J. Li, S. D. O'Neill (1993) Melatonin: identification of a potential dark signal in plants. *Plant Physiol.* 102 (Suppl.1): 659.
- Vaughan, M. K., G. R. Buzzell, R. A. Hoffman, A. Mendez-Pelaez, R. J. Reiter (1994) Insulin-like growth factor-1 in Syrian hamsters: interactions of photoperiod, gonadal steroids, pinealectomy, and continuous melatonin treatment. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 205: 327–331.
- Vollrath, L. (1981) The Pineal Organ. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, A. Okesche, L. Vollrath, eds. VI/7. Springer, Berlin/Heidelberg/New York, pp. 311–314.
- Vriend, J., M. S. Sheppard, R. M. Bala (1988) Melatonin increases serum insulin-like growth factor-I in male Syrian hamsters. *Endocrinology* 122: 2558–2561.
- Vriend, J., M. S. Sheppard, K. T. Borer (1990) Melatonin increases serum growth hormone and insulin-like growth factor I (IGF-I) levels in male Syrian hamsters via hypothalamic neurotransmitters. *Growth Dev. Aging* 54: 165–171.
- Weaver, D. R., S. A. Rivkees, L. L. Carlson, S. M. Reppert (1991) Localization of melatonin receptors in mammalian brain. In: *Suprachiasmatic nucleus. The mind's clock*, D. C. Klein, R. Y. Moore, S. M. Rep-

- pert, eds. Oxford University Press, New York/Oxford, pp. 289–308.
- Weigle, D. S. (1987) Pulsatile secretion on fuel-regulatory hormones. *Diabetes* 36: 764–775.
- Wolden-Hanson, T., D. R. Mitton, R. L. McCants, S. M. Yellon, C. W. Wilkinson, A. M. Matsumoto, D. D. Rasmussen (2000) Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinology* 141: 487–497.
- Zimmerman, N., M. Menaker (1979) The pineal gland: a pacemaker within the circadian system of the house sparrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1167–1169.

