

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Aneta Kubištová

Vliv stálého světla v rané ontogenezi na cirkadiánní systém v dospělosti

**The effect of constant light in early development on the circadian system in
the adulthood**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.8.2020

Podpis

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce doc. RNDr. Zdeňce Bendové Ph.D. za odbornou pomoc a nezměrnou trpělivost při vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat celému týmu laboratoře biorytmů PřF UK za cenné rady týkající se práce v laboratoři. Obzvláště bych ráda poděkovala Mgr. Veronice Spišské za pomoc při behaviorálních testech a v organizaci pokusů a Mgr. Simoně Moravcové za zaškolení do izolačních a PCR metod prováděných v této diplomové práci.

Abstrakt

Dlouhodobé vystavování stálému světlu má u dospělého jedince za následek desynchronizaci cirkadiálního systému, spojenou se sníženou efektivitou řady fyziologických funkcí načasovaných na přesnou denní dobu, případně s rozvojem některé z tzv. civilizačních nemocí. U dospělých jedinců na stálém světle dochází také ke zhoršení kognitivních schopností či změně struktury spánku. Vliv nočního světla na zdraví dospělého organismu se studuje zejména v souvislosti s prací ve směnných provozech či se světelným znečištěním. Méně je studována otázka, jaký vliv má zvýšená hladina nočního světla na vývoj organismu, zejména na vývoj nervového systému a samotného cirkadiálního systému.

Tato diplomová práce se zaměřila na identifikaci rozsahu změn exprese genů *Per2*, *Nr1dl*, *Stat3*, *BDNF*, dále genů kódující podjednotky NMDA receptoru a některých tkáňově-specifických genů v sítnici. Naše experimenty byly prováděny na dospělých potkanech kmene Long-Evans, kteří strávili prvních 20 dní svého postnatálního vývoje na stálém světle o nízké intenzitě. Změny v expresi byly determinovány kvantifikací mRNA pomocí RT-qPCR ve strukturách frontálního a parietálního kortexu, čichového laloku, hipokampu, suprachiasmatického jádra a sítnice. Behaviorálními testy byla u těchto zvířat posouzena míra úzkostného chování. Naše výsledky potvrdily rozvoj úzkostného chování a změny v expresi několika testovaných genů u zvířat vyrůstajících na stálém světle.

Klíčová slova: cirkadiální hodiny, světelná synchronizace, vývoj, suprachiasmatické jádro

Abstract

Long-term exposure to constant light results in desynchronization of the circadian system in an adult and is associated with reduced efficiency of many physiological functions timed to the exact time of day, or with the development of some of the so-called civilization diseases. Constant light in adults also results in deterioration of the cognitive abilities or changes in the sleep structure. The effect of night light on the health of an adult organism is studied mainly in connection with shift work or with light pollution. The question of what effect the increased level of night light has on the development of the organism, especially on the development of the nervous system and the circadian system itself, is less studied.

This diploma thesis focused on the identification of the extent of changes in the expression of *Per2*, *Nr1d1*, *Stat3*, *BDNF* genes, as well as genes encoding NMDA receptor subunits and some tissue-specific genes in the retina. Our experiments were performed on adult Long-Evans rats, that spent the first 20 days of their postnatal development in low-intensity constant light. Changes in expression were determined by quantification of mRNA by RT-qPCR in the structures of the frontal and parietal cortex, olfactory bulb, hippocampus, suprachiasmatic nucleus and retina. Behavioral tests were used to assess the degree of anxiety in these animals. Our results confirmed the development of anxiety behavior and changes in the expression of several tested genes in animals, that grown up in a constant light.

Keywords: circadian clock, synchronization to light, development, suprachiasmatic nucleus

OBSAH

Seznam použitých zkratk

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled	2
2.1. Cirkadiánní systém	2
2.1.1. Transkripčně translační zpětnovazebné smyčky	2
2.1.2. Suprachiasmatické jádro	4
2.1.3. Fotosenzitivní gangliové buňky	6
2.1.4. Světelná synchronizace	7
2.1.5. Fázový posun.....	8
2.1.6. Periferní oscilátory v tkáních a jejich závislost na SCN.....	9
2.2. Stálé světlo	12
2.2.1. Současná úroveň světelného znečištění	12
2.2.2. Dopad večerního sledování displeje a obrazovky na fyziologii člověka	13
2.2.3. SCN na stálém světle.....	14
2.2.4. Vliv stálého světla na dospělý organismus	15
2.3. Vývoj cirkadiánního systému.....	16
2.3.1. Efekt stálého světla během kritické periody vývoje cirkadiánního systému potkana.....	17
2.3.2. Rozvoj úzkostného chování mláďat na stálém světle	18
2.4. NMDA receptor a jeho podjednotky.....	19
3. Cíle práce.....	21
4. Metody a vybavení.....	22
4.1. Laboratorní zvířata.....	22
4.2. Behaviorální testy	23
4.3. Statistické zpracování dat z behaviorálních testů	24

4.4. Odběr tkání a izolace tkání.....	24
4.5. Kvantitativní RT-qPCR.....	25
4.6. Statistické zpracování dat cirkadiánní genové exprese	26
5. Výsledky.....	28
5.1. Behaviorální testy	28
5.1.1. Výsledky testu otevřeného pole.....	28
5.1.2. Výsledky testu vyvýšeného kruhového bludiště	29
5.1.3. Výsledky testu light/dark box.....	31
5.2. Výsledky měření cirkadiánních rytmů exprese	32
5.2.1. Prokázání rytmicity genové exprese a parametry kosinorové analýzy	32
5.2.2. Exprese genu <i>Per2</i>	33
5.2.3. Exprese genu <i>Nr1d1</i>	35
5.2.4. Exprese genu <i>Stat3</i>	37
5.2.5. Exprese genu <i>BDNF</i>	39
5.2.6. Exprese genu <i>Grin1</i>	41
5.2.7. Exprese genu <i>Grin2a</i>	43
5.2.8. Exprese genu <i>Grin2b</i>	44
5.2.9. Exprese tkáňově specifických genů v sítnici.....	46
6. Diskuze.....	49
6.1. Vliv stálého světla v raném postnatálním období na rozvoj úzkostného chování v dospělosti	49
6.2. Vliv stálého světla v raném postnatálním vývoji na přetrvávající změny v cirkadiánních rytmech exprese zkoumaných genů.....	52
7. Závěr	60
Seznam literatury	61

Seznam použitých zkratk

ANOVA	Analýza variance/rozptylu
AVP	Arginin vasopresin
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BMAL1	Brain and muscle ARNT-likeprotein 1
BOLD-fMRI	Blood oxygen level dependent funkční magnetické rezonance
BORIS	Behavioral Observation Research Interactive Software
CA1	Cornu Ammonis 1 (oblast hipokampu)
CCGs	Clock controlled genes (hodinami kontrolované geny)
cDNA	Komplementární DNA
CKI	Kasein kináza I
CLOCK	Circadianlocomotor output cycles kaput
CNS	Centrální nervová soustava
CREB	cAMP-response element binding
CRY	Cryptochrome
CT	Cirkadiánní čas
Ct	Cycle treshold
DD	Dark/dark světelné podmínky (24h tmy)
DM SCN	Dorzomediální část suprachiasmatického jádra
E-box	Enhancer box
EPSC	Excitační postsynaptický proud
fMRI	Funkční magnetická rezonance
GABA	Kyselina gama-aminomáselná
GABAA	Receptor A kyseliny gama-aminomáselné
Gapdh	Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza
GluN	Podjednotka NMDA receptoru
<i>Grin</i>	Gen pro podjednotku NMDA receptoru
GRP	Gastrin releasing peptide
HPA osa	Osa hypothalamus-hypofýza-nadledviny
ipRGCs	Fotosenzitivní gangliové buňky sítnice
LC	Locus Coeruleus

LD.....	Light/dark světelné podmínky (12 hodin světla + 12 hodin tmy)
LH.....	Laterální hypotalamus
LHb.....	Laterální habenula
LL skupina	Námi testovaná zvířata, která strávila dny P0 až P20 na stálém světle
LL	Light/light světelné podmínky (24h stálé světlo)
LTP	Dlouhodobá potenciace
MA.....	Mediální amygdala
MAPK.....	Mitogenem aktivované proteinkinázy
NMDAR.....	N-metyl-D-aspartát receptor (glutamátový ionotropní receptor)
Nr1d1	Gen pro jaderný receptor rodiny 1, skupina D, člen 1, (produktem genu je REV-ERB α)
Opn	Opsin
Opn1sw	Opsin 1, citlivý na krátké vlnové délky
P.....	Hodnota, udávající míru významnosti rozdílu mezi zkoumanými daty
P20.....	20. den postnatálního vývoje
Per.....	Period
PVN	Paraventriculární jádro hypotalamu
Rho.....	Rodopsin
RHT	Retino-hypotalamický trakt
ROR.....	Retinoic acid-related orphan receptor
RORE.....	Retinoic acid-related orphan receptor response element
RT-qPCR.....	Real-time kvantitativní polymerázová řetězová reakce
SCN.....	Suprachiasmatické jádro
SEM.....	Střední chyba průměru
SPZ	Subparaventriculární zóna
Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
TTFL.....	Transkripčně translační zpětnovazebná smyčka
VIP.....	Vasoaktivní intestinální polypeptid
VL SCN	Ventrolaterální část suprachiasmatického jádra
VLPO.....	Ventrolaterální preoptická oblast
VTA.....	Ventrální tegmentální oblast

1. ÚVOD

Biochemické a molekulární procesy většiny tkání a orgánů se v průběhu 24 hodin rytmicky mění. Díky funkci cirkadiálního systému může tělo předvídat, kdy nastane den nebo noc a podle toho regulovat činnosti jako jsou například konzumace potravy, zvýšená tělesná i mentální aktivita či spánek, a navýšit metabolickou aktivitu potřebných orgánů ještě před začátkem očekávané akce. Většina tkání v těle odměřuje přibližnou 24hodinovou periodu díky zpětnovazebným molekulárním smyčkám hodinových genů. Tato perioda je ale nepřesná a k přesnému chodu cirkadiálních hodin je nezbytná synchronizace se solárním cyklem. Synchronizace probíhá především registrací střídání světelné a temnostní fáze dne centrálními hodinami v suprachiasmatickém jádře (SCN). V neperiodickém prostředí stálé tmy mohou funkci synchronizátoru převzít např. periodické změny v sociální interakci či jiné, periodicky se opakující děje. Metabolicky aktivní periferní oscilátory mohou být synchronizované také pravidelným příjmem potravy. Dobře synchronizovaný cirkadiální systém umožňuje načasování fyziologických funkcí na přesnou denní dobu. Desynchronizovaný systém ať už mutací některého z komponentů transkripčně translační zpětnovazebné smyčky (TTFL), častou prací ve směnném provozu či častým vystavením světlu v noci, má za následek množství zdravotních problémů, jako jsou např. zvýšené riziko rozvoje cukrovky, příbytky na váze a rozvoj leptinové rezistence či dokonce urychlení tumorogeneze. Světlo v noci tedy představuje vážný environmentální stresor, jehož intenzita se v posledních letech neustále zvyšuje ať už v domácím nebo venkovním prostředí, a představuje zdravotní riziko pro člověka i ostatní organismy.

Přestože existuje již docela dobré povědomí o vlivu světla v noci na dospělé jedince, poměrně málo je známo o tom, jak světelný stres působí na vyvíjející se organismus a jaké důsledky to má v dospělosti. Život ve stálém světle může mít u dospělých a mláďat rozdílný efekt. Víme například, že rozvoj insulinové rezistence je typický pouze v dospělosti, ale nevyskytuje u mláďat vystavených stálému světlu. Naopak zvýšené úzkostné chování u jedinců odchovaných na stálém světle se u dospělých nevyskytuje. Tato diplomová práce se zaměřila na sledování vlivu života ve stálém světle v časném postnatálním vývoji na změny v rytmické genové expresi v mozku a rozvoj úzkostného chování v dospělosti. V dnešní době zvyšujícího se světelného znečištění přírody a trendům usínat se zdrojem světla v místnosti, mohou mít naše výsledky význam jak pro člověka, tak pro zdravý vývoj mnoha živočišných druhů ve volné přírodě.

2. LITERÁLNÍ PŘEHLED

2.1. CIRKADIÁNNÍ SYSTÉM

Většina organismů na planetě se vyvinula v prostředí se střídajícím se dnem a nocí, a stejně jako na řadu dalších proměnných v prostředí si i na změny intenzity a spektra světla během 24hodinového dne vytvořila adaptaci - cirkadiánní systém. Díky tomuto systému tělo měří a předvídá čas a může tak přizpůsobit svou aktivní periodu denní či noční časové nice. V souvislosti s tím se také přizpůsobuje fáze rytmů v produkci hormonů či aktivitě autonomního nervového systému (Balsalobre et al., 2000; Cailotto et al., 2009; Vujović et al., 2008). Cirkadiánní systém sám však nedokáže odměřovat 24 hodin přesně a bez synchronizace s vnějším, solárním cyklem by se začátek vnitřní periody každý den více a více odchyloval od solárního začátku dne.

Převážná většina buněk v těle je schopna měřit čas pomocí TTFL hodinových genů. Ta tvoří podstatu cirkadiánního systému, avšak bez seřizovacích, synchronizačních signálů z prostředí (zvané jako „udavače času“ nebo „zeitgebery“) odměřuje 24 hodin pouze přibližně. Hlavním synchronizátorem z prostředí je střídání světla a tmy, které je vnímáno centrálními hodinami v SCN. Světločivné SCN synchronizuje periferní oscilátory v orgánech a tkáních, ale některé oscilátory je možné synchronizovat například také příjmem potravy v neobvyklou dobu či změnami v hormonální signalizaci (Balsalobre et al., 2000; Brown et al., 2002; Damiola et al., 2000; Fonken et al., 2013).

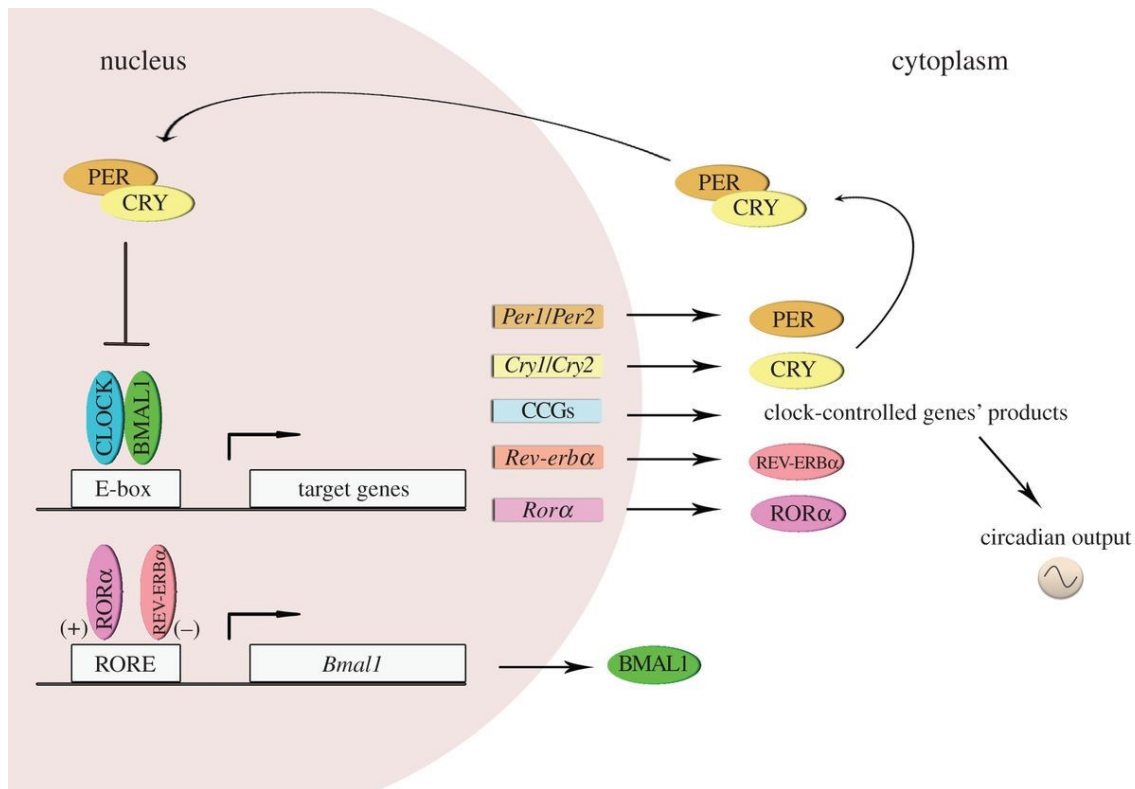
2.1.1. Transkripčně translační zpětnovazebné smyčky

Přibližné odměřování 24hodinových cyklů na buněčné úrovni je možné díky aktivitě TTFL (obr. č. 1). Kritickou roli v TTFL zaujímá tzv. primární smyčka, skládající se z pozitivních (*Clock* a *Bmall*) a negativních transkripčních faktorů (*Per* a *Cry*). Proteiny genů *Clock* a *Bmall* po své translaci heterodimerizují a vstupují do jádra (Gekakis et al., 1998). Přibližně ve střední části dne tento komplex nasedá na E-box v promotorech řady jiných genů a aktivuje jejich transkripci (Menet et al., 2012). Tato každodenní aktivace transkripce komplexem CLOCK:BMAL1 je nezbytná, a v principu dostačující k rytmické expresi hodinových genů v buňce (Chiou et al., 2016). Mezi geny aktivované prostřednictvím E-boxu patří například *Per1,2,3* a *Cry1,2*, což jsou negativní, represorové faktory primární smyčky. Jejich proteiny se v průběhu dne akumulují v cytoplazmě (Horst et al., 1999; Zheng et al., 2001), jsou zde fosforylovány mj. kinázami CKI ϵ a CKI δ (Camacho et al., 2001; Eide et al., 2002) a následně odbourávány pomocí ubiquitin ligázového komplexu nebo transportovány do jádra (Akashi et al., 2002; Busino et al., 2007). Proteiny PER a CRY v cytoplazmě tvoří heterodimery, které se vrací zpět do jádra, kde vyvazují komplex

CLOCK:BMAL1 od DNA a zabraňují tak své vlastní transkripci (Ye et al., 2014). Hladiny PER a CRY proteinů se postupně v buňce snižují až do té doby, kdy jejich nízká hladina nebrání opětovnému nasednutí CLOCK:BMAL1 komplexu na E-boxy a celý proces, trvající přibližně 24 hodin, začíná znovu.

Komplex CLOCK:BMAL1 iniciuje také transkripci jaderných receptorů REV-ERB α (kódovaných genem *Nr1d1*), které se váží na promotor genu *Bmall* a potlačují jeho expresi, tj. prodlužují periodu. Navzdory svým regulačním vlastnostem není REV-ERB α nezbytný pro generování cirkadiálního rytmu. Při jeho genetické delecii u myši dochází k akumulaci mRNA *Bmall*, ale rytmicita v hladinách této mRNA zůstává zachována i když s výrazně nižší amplitudou (Preitner et al., 2002). Komplexem CLOCK:BMAL1 je zároveň také aktivována transkripce genu pro ROR α , který je vůči REV-ERB α antagonistický. ROR α má při navázání na promotor *Bmall* aktivační účinek, zkracující tak cirkadiální periodu. Při knockoutu genu pro ROR α dochází k potlačení exprese *Bmall* (Sato et al., 2004). U všech objevených zástupců rodin REV-ERB (α , β) a ROR (α , β , γ) byla prokázána schopnost vázat se na RORE element v promotoru *Bmall* a regulovat jeho expresi (Guillaumond et al., 2005). Studie potvrzují, že sekundární smyčka zvyšuje amplitudu cirkadiálních oscilací a stabilizuje celý mechanismu TTFL (Preitner et al., 2002).

V neposlední řadě CLOCK:BMAL1 nasedá na E-boxy tzv. hodinami kontrolovaných genů (CCGs; z angl. clock-controlled genes) a umožňuje tak regulovat cirkadiální rytmus velké řady fyziologických funkcí (Panda et al., 2002A). Této aktivaci exprese podléhá přibližně 10-20% kódujících genů v těle, ale procento zastoupení CCGs se mezi jednotlivými orgány liší (Deery et al., 2009; Reddy et al., 2006). Valná většina těchto genů je orgánově a funkčně specifická a umožňuje tak časovou regulaci orgánové fyziologie. Další velké procento tkáňově specifických molekul je regulováno na úrovni translace či posttranskripčních a posttranslačních modifikací a cirkadiální systém tak reguluje až 43% tkáňově specifických proteinů (Zhang et al., 2014).



Obrázek č. 1: Schéma molekulárních hodin TTFL u savců. Komplex CLOCK:BMAL1 se váže na E-box v promotorech genů *Per1,2* a *Cry1,2*. Proteiny PER a CRY se vracejí do jádra a inhibují komplex CLOCK:BMAL1 a tím i svou vlastní transkripci (primární smyčka). Komplex CLOCK:BMAL1 se zároveň navazuje na E-box genů jaderných receptorů *Rev-Erba* a *Rora*, které inhibují či podporují expresi *Bmal1* a stabilizují tak hodiny (sekundární smyčka). CLOCK:BMAL1 rovněž aktivuje rytmickou transkripci řady CCGs, podílejících se na rytmicitě fyziologických funkcí těla. Převzato z (Golombek et al., 2014).

2.1.2. Suprachiasmatické jádro

Cirkadiánní pacemaker v SCN je každodenně synchronizovaný světlem do přesně 24hodinového oscilačního cyklu a slouží organismu jako centrální hodiny (v angličtině: „the master clock“), které poskytují informace o čase hodinám v periferních tkáních a časově tak seřizují celý organismus (Nishino et al., 1976; Ralph et al., 1990). Jádra jsou složena ze dvou částí s odlišnou funkcí a různými neuromediátory: ventrolaterálního jádra (VL), do kterého přicházejí signály z retiny oka, a dorzomediálního pláště (DM) (de la Iglesia et al., 2004).

Cirkadiánní oscilace v neuronech a glíích SCN jsou vytvářeny na principu TTFL, ale jednotlivé buňky musí být spolu synchronizovány, aby vytvářely koherentní signál. Neurotransmitter VIP (vasoaktivní intestinální peptid) uvolňovaný VLSCN depolarizuje neurony ve

zbytku SCN a indukuje expresi *Per1* a *Per2* (Nielsen et al., 2002; Pakhotin et al., 2006; Shinohara et al., 2000). VIP je produkován až v 23% neuronů SCN a přibližně 50% nervových buněk SCN exprimuje jeho receptory (Reed et al., 2002; Welsh et al., 1995). Při absenci tohoto neurotransmiteru nejsou nervové buňky SCN schopné synchronizované aktivity (Aton et al., 2005). Neuromediátor GRP (gastrin releasing peptide) produkováný VLSCN rovněž vyvolává indukci exprese *Per1* a *Per2* a to v DMSCN (Aida et al., 2002). V celém SCN je nejzastoupenějším neuropřenašečem GABA a na většině synapsích se vyskytuje jako koaktivátor společně s dalšími neuropeptidy (Moore & Speh, 1993; Strecker et al., 1997). GABA má excitační účinky v DMSCN, ale inhibiční ve VLSCN (Albus et al., 2005). Podobně jako VIP, i GABA přispívá k synchronizaci neuronů SCN (Liu & Reppert, 2000) a její absence znemožňuje synchronizaci VLSCN a DMSCN a světlem indukovaný fázový posun exprese hodinových genů v SCN (Albus et al., 2005; McNeill 4th et al., 2018). Společně vytváří tento soubor neurotransmiterů SCN plastický systém schopný synchronizace rytmu mezi svými částmi a je důležitý také pro fázový posun exprese hodinových genů v SCN indukovaný změnou fotoperiody.

Jedním z hlavních výstupů z SCN a také vlastností samotného pacemakeru je rytmus ve spontánní elektrické aktivitě. Její frekvence dosahuje svého maxima zhruba v polovině světelné fáze dne a přes noc klesá bez ohledu na to, zda se jedná a denního či nočního živočicha (Inouye & Kawamura, 1979). Výstup z SCN do periferních tkání a oscilátorů je zprostředkován také cyklickými změnami hladin hormonů či aktivitou autonomního nervového systému. To je nezbytné pro vnitřní synchronizaci organismu a také re-synchronizaci po případném časovém posunu (Balsalobre et al., 2000; Cailotto et al., 2009; Vujović et al., 2008).

Jedna ze základních výstupních cest z SCN vede do paraventriculárního jádra hypotalamu (PVN). GABAergní inervace z SCN tlumí během dne glutamátergní neurotransmisi z PVN do celé řady struktur a tím ovlivňuje jak autonomní nervový systém, tak např. produkci kortikosteronu. Nejlépe prostudovaným, a možná nejvýznamnějším výstupem této regulační dráhy je však rytmická produkce hormonu melatoninu. Melatonin je produkován pineální žlázou neboli epifýzou na základě signálů z SCN a PVN tak, aby jeho hladina byla vysoká v noci. Hormon se vylévá do krevního oběhu a aktivuje melatoninové receptory, které jsou exprimovány ve velké většině orgánů a tkání. Tím napomáhá šířit synchronizační časový signál z SCN do celého organismu (Klein et al., 1997; Pandi-Perumal et al., 2008; Perreau-Lenz et al., 2003; Roseboom et al., 1996). Syntetizační proces melatoninu je také velice citlivý na světlo v noci, a již velmi malá intenzita světla vede k jeho potlačení, či zpomalení (Lewy et al., 1980).

2.1.3. Fotosenzitivní gangliové buňky

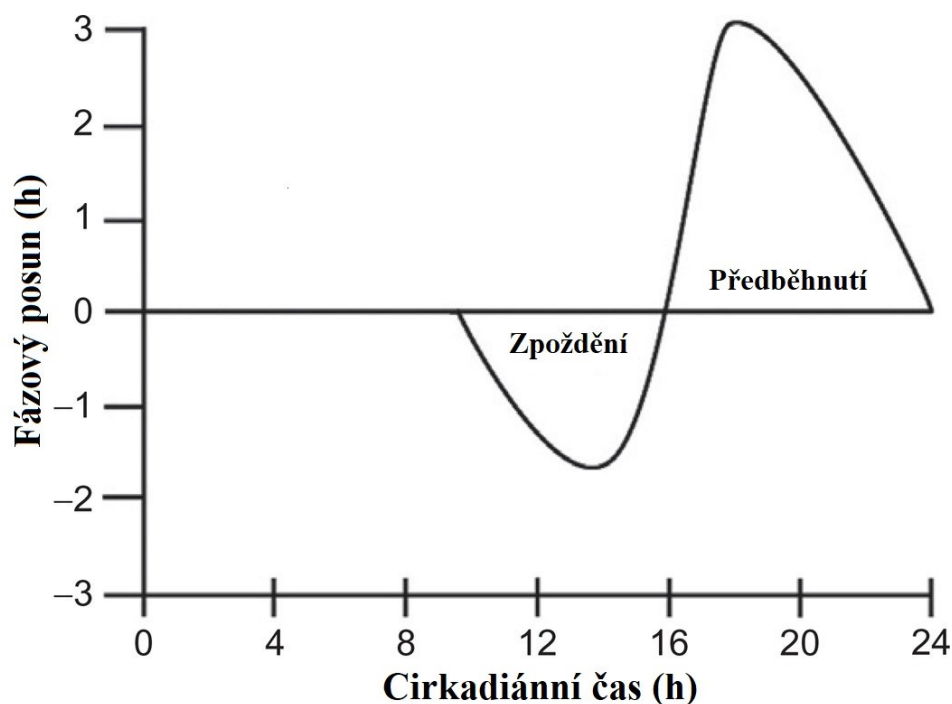
Pro optimální funkci cirkadiálního systému je nezbytný stabilní synchronizátor, který působí zejména na hlavní cirkadiální pacemaker v SCN hypotalamu (Ralph et al., 1990). Nejspolehlivějším a nejsilnějším synchronizátorem je pro většinu druhů světlo, které je u savců registrováno pouze sítnicí (Foster et al., 1991). Vedle fotosenzitivních tyčinek a čípků umožňující obrazové vidění, se v sítnici nacházejí ještě další fotosenzitivní buňky označované jako ipRGCs (z angl. intrinsically photosensitive retinal ganglion cells, vnitřně fotosenzitivní gangliové buňky sítnice) s fotopigmentem melanopsinem, které jsou zodpovědné za tzv. neobrazové vidění (Berson et al., 2002; Provencio et al., 2000). Melanopsin není v ipRGCs koncentrován ve specializovaných strukturách, ale je rovnoměrně zastoupen ve většině částí gangliové buňky (Provencio et al., 2002). Tento strukturální rozdíl přispívá k nižší citlivosti ipRGCs na světlo, než je u světločivných buněk tyčinek a čípků obrazového vidění. Melanopsin je nejcitlivější na záření o vlnové délce 480 nm, což je modré světlo typické pro střední část dne (Berson et al., 2002). Vystavení například vlnovým délkám pro oranžovou barvu (přibližně 600 nm), vyskytující se v době východu či západu slunce, vyvolává v ipRGCs při stejné energii, značně nižší aktivitu (Berson et al., 2002).

Citlivost L-, M- a S- čípků ke svým příslušným vlnovým délkám (v maximech: L: 560 nm, M: 530 nm a S: 440 nm) se mezi sebou signifikantně neliší. Průměr hodnot poloviční saturace aktivace čípku při intenzitě je mezi 1600 – 1900 fotonů na μm^{-2} (Schnapf et al., 1987, 1990). Člověk je schopen barevného vidění již při intenzitách světla přibližně 1 mcd/m² (Kelber & Lind, 2010). Citlivost čípků na světlo u hlodavců je 10x nižší než u primátů (Nikonov et al., 2006). Tyčinky a čípky jsou zapojené do neuronální sítě ipRGC a významně přispívají k synchronizaci cirkadiálního systému u zdravých jedinců, avšak jejich vyřazení je téměř dokonale nahrazeno funkcí melanopsinu, pokud je přítomno tzv. melanopické, modré světlo (Brown et al., 2011; Freedman et al., 1999). Vedle přenosu informace o světle do centrálních cirkadiálních hodin v SCN, projikují ipRGCs do center v mozku regulující náladu, kognitivní myšlení, spánek či bdělost, jak shrnuje review (LeGates et al., 2014; obr. 2). Světlo tedy přímo přes ipRGCs a zároveň i nepřímo přes SCN ovlivňuje řadu oblastí centrální nervové soustavy (Krout et al., 2002). Dá se tedy předpokládat, že stres v podobě stálého světla bude mít do určité míry efekt na tyto části mozku.

tak optimalizační časový posun cirkadiánní exprese hodinových genů, která bez možnosti světelné korekce osciluje v pouze přibližných 24hodinových cyklech.

2.1.5. Fázový posun

Při zasažení světla do subjektivní noci reaguje cirkadiánní systém posunem vnitřní fáze tak, aby se chod hodin srovnal s vnějším cyklem. Fázově responzní křivka (obr. č. 3) popisuje závislost velikosti a směru posunu (zpoždění nebo předběhnutí fáze) na době vystavení zeitgeberu. Světlo o dostatečné intenzitě nebo trvání, působící během večera a první poloviny noci způsobuje fázové zpoždění. Oproti tomu světlo v druhé polovině noci a nad ránem vede k fázovému předběhnutí. Přibližně uprostřed noci se nachází kritický časový bod, během kterého světlo nezpůsobuje fázový posun. U člověka platí, že doba, při níž dochází se kritickému bodu, přibližně koresponduje s minimální hodnotou cirkadiánního rytmu tělesné teploty (Czeisler et al., 1989; Khalsa et al., 2003). Stejná intenzita světla, která během nočních hodin způsobuje fázové posuny, vyvolává během dne zmatelně nižší fázový posun, který se signifikantně neliší od kontrol, které nejsou světelným pulzům vystaveny. Velikost fázového posunu stoupá se zvyšující se intenzitou světla a dobou trvání vystavení světla (Boivin et al., 1996; Dewan et al., 2011). Maximální hodnota fázového posunu činí však přibližně 3 hodiny bez rozdílu mezi pohlavími (Kripke et al., 2007). Systém je rovněž nejcitlivější na modré světlo o vlnové délce 480 nm (Rüger et al., 2013).



Obrázek č. 3: Fázově responzní křivka. Graf popisuje směr a velikost fázového posunu při aplikaci světla v různou denní dobu (vyobrazeno na ose X v hodinách cirkadiánního času). Úsek

CT0 až CT12 představuje světelnou část dne, CT12 až CT24 temnostní část. Převzato a upraveno z (Lefta et al., 2011).

2.1.6. Periferní oscilátory v tkáních a jejich závislost na SCN

Cirkadiánní rytmus hodinových a hodinami kontrolovaných genů je v periferních tkáních a orgánech závislý primárně na rytmu výstupních signálů z SCN. Pouze v metabolicky aktivních orgánech jako jsou játra, střeva nebo slezina je možné odpojení od synchronizačních signálů z SCN a to v případě, že potrava je dostupná pouze v době mimo aktivní fázi živočicha (Damiola et al., 2000; Waddington Lamont et al., 2007; Wang et al., 2017A). Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na změny rytmické genové exprese v několika částech mozku u zvířat odchovaných na stálém světle. Proto je tato kapitola zaměřená na oscilátory v částech mozku, které jsou periferní ve vztahu k hlavnímu cirkadiánnímu pacemakeru v SCN, nikoliv na periferní orgány.

Za běžných podmínek jsou v mozkových strukturách měřitelné rytmické exprese hodinových genů (Shearman et al., 1997; Yamamoto et al., 2001). SCN je synapticky propojeno s množstvím mozkových struktur, například s čichovými laloky, areou postremou v prodloužené míše, s ventrálním hipokampem, paraventriculárním talamickým jádrem nebo s ostatními strukturami hypotalamu včetně laterální preoptické oblasti a PVN důležitého pro regulaci neuroendokrinního a autonomního systému (Krout et al., 2002). Tato četná spojení umožňují přenos rytmického cirkadiánního signálu do ostatních částí mozku.

Hipokampus exprimuje všechny hodinové geny potřebné pro autonomní generování cirkadiánního rytmu (Jilg et al., 2010). Struktury hipokampu jsou neuronálně propojeny s SCN nepřímo, multisynapticky (Krout et al., 2002), synchronizují se ale působením kortikosteronů, jejichž produkce je závislá na signálech z SCN. Při snížení hladiny kortikosteronů dochází k vymizení hipokampálního rytmu v expresi *Per1* (Gilhooley et al., 2011). Potlačení cirkadiánní rytmicity exprese genů *TTFL* v SCN způsobuje deficit prostorové pracovní paměti a dlouhodobé paměti v testu „long-term object recognition“, které jsou závislé na hipokampu (Ruby et al., 2013). Lokální aplikace antagonisty GABAA receptoru obnovuje u zkoumaných zvířat oba typy paměti do hodnot pozorovaných v jedincích s rytmickým SCN, indikující GABAergní regulaci mezi těmito strukturami (Ruby et al., 2013). Rytmus SCN se zdá být nezbytný pro správnou funkci této struktury a narušení funkce SCN stálým světlem během raného postnatálního vývoje by mohlo mít následky pro behaviorální procesy závislé na hipokampu.

Neokortex rovněž exprimuje všechny potřebné hodinové geny pro generování cirkadiánního rytmu (Rath et al., 2013, 2014). Amplituda rytmu hodinových genů v neokortexu je

ale významně potlačena při lézi SCN, indikující závislost cirkadiálního rytmu exprese v neokortexu na tomto jádře (Rath et al., 2013). Při potlačení exprese hodinového genu *Bmall* pouze v kortexu dochází u těchto zvířat ke zvýšenému výskytu depresivního chování, ale například ke změně rytmu tělesné teploty či pohybové aktivity nikoliv (Bering et al., 2017). Potlačení či posuny rytmické exprese v kortikálních strukturách jsou typické například u pacientů s těžkou depresivní poruchou (Li et al., 2013) a schizofrenií (Seney et al., 2019). Pokud by tedy vlivem stálého světla během raného postnatálního vývoje docházelo ke změnám v rytmu expresí hodinových genů, mohlo by těchto zvířat dojít například ke změnám v regulaci nálad či chování.

Čichové laloky potkanů jsou považovány za tzv. semiautonomní cirkadiální oscilátory, které mohou fungovat i bez signálů z SCN. Exprese hodinových genů v čichových lalocích přetrvávaly rytmické i při ablaci SCN, na rozdíl od ostatních zkoumaných struktur koncového mozku například primárního motorického a somatosenzorického kortexu, či nukleu accumbens, caudate putamen a hipokampu (Abe et al., 2002). Čichové laloky vykazují synchronizovanou expresi hodinových genů již v embryonálním dni E19 (Granados-Fuentes et al., 2004), a jsou schopné přizpůsobit fázi rytmické exprese genů TTFL času příjmu potravy (Pavlovski et al., 2018). Význam čichových laloků v cirkadiální regulaci se zdá být druhově specifický. Po odstranění obou čichových laloků během raného postnatálního vývoje králíka vykazovala mláďata abnormálně nestabilní rytmy tělesné teploty a pohybové aktivity indikující roli čichových laloků v regulaci cirkadiálních rytmů v raném vývoji (Navarrete et al., 2016). Podobně u myší (Possidente et al., 1990) a osmáků (Goel et al., 1998) odstranění čichových laloků způsobilo prodloužení vnitřní periody tau a zmenšení fázových posunů po změně světelných podmínek. Naopak u potkanů, odstranění laloků nezpůsobovalo změny v rytmu denní aktivity ani nesnižovalo míru fázového posunu po světelném pulsu (Granados-Fuentes et al., 2004). Mechanické nebo funkční narušení čichových laloků je u hlodavců často asociováno s rozvojem depresivního a úzkostného chování (Glinka et al., 2012; Taalman et al., 2017). Zajímalo nás tedy, jestli vývoj ve stálém světle, který vede k podobným změnám v chování, ovlivňuje genovou expresi a cirkadiální rytmicitu také v čichových lalocích.

Sítnice oka je, podobně jako čichové laloky, považovaná za další semiautonomní oscilátor. Při lézi SCN si zachovává původní fázi cirkadiálních rytmů, která je synchronizovatelná světlem nezávisle na SCN (Tosini & Menaker, 1996). Při selektivní genetické delecí genu *Bmall* výhradně v sítnici, dochází ke stejným změnám ve fyziologii sítnice, jako při celoorganismové delecí *Bmall* (Storch et al., 2007). Sítnice také produkuje melatonin a kultury sítnice *in vitro* si v podmínkách stálé tmy zachovávají rytmickou syntézu melatoninu po minimálně 5 dní (Binkley et al., 1979; Tosini & Menaker, 1996). Výsledky měření elektrické aktivity sítnice elektroretinogramem však

naznačují, že cirkadiánní regulace sítnice je alespoň částečně pod vlivem ostatních mozkových struktur (Miranda-Anaya et al., 2002). Hlavní funkcí sítnice je zajišťovat transdukcii informace o světle do zrakových struktur mozku včetně SCN. Světlo v noci vyvolává fázový posun a potlačuje syntézu melatoninu (Czeisler et al., 1989; Lewy et al., 1980). Úroveň potlačení melatoninu se liší druhově i mezi jednotlivci, a koreluje se změnami aktivity SCN pozorovanými metodou BOLD-fMRI (McGlashan et al., 2018). Jestli se tedy za vývoje při stálém světle mění vstupní signály do SCN na úrovni sítnice je důležité pro posouzení ať již synchronizačního nebo patologického působení světla v dospělosti.

Náhlá několikahodinová změna ve fotoperiodě způsobuje desynchronizaci exprese hodinových genů mezi VL a DM oblastmi SCN. Geny *Per1,2* a *Cry1* ve VLSCN se rychle fázově přizpůsobují změně fotoperiody, o několik dní pomalejší je jejich změna v DMSCN. Po dobu desynchronizace mezi VL a DM oblastmi SCN bylo u jedinců pozorováno signifikantní prodloužení délky spánku, což je rovněž jeden ze symptomů pozorovaných u lidí po přeletu přes několik časových pásem (tzv. jet lag) (Nagano et al., 2003).

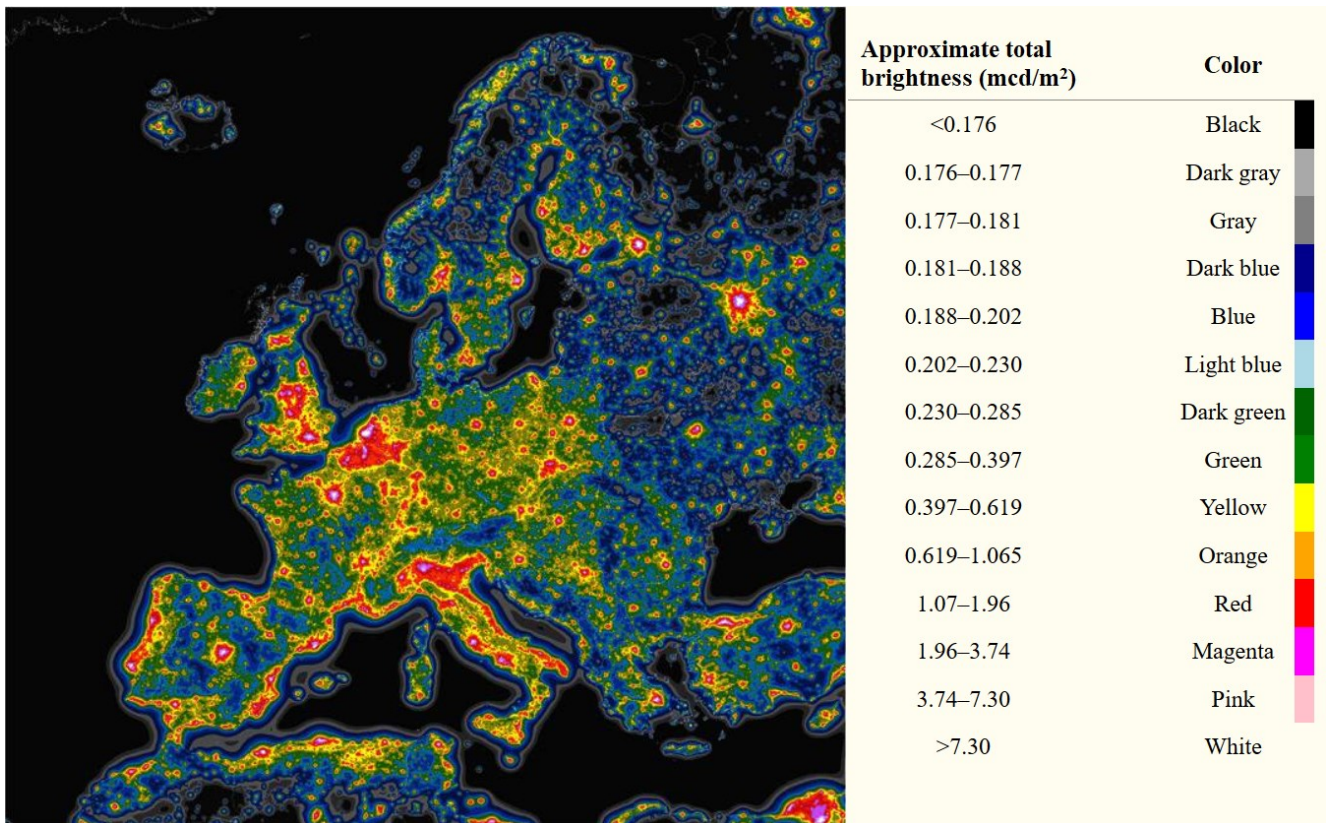
V periferních oscilátorech, které svůj cirkadiánní rytmus synchronizují primárně s rytmem SCN, byly nalezeny trvalé změny amplitudy nebo fázové posuny hodinových genů po vystavení stálému světle během kritické periody vývoje cirkadiánního systému (Brooks et al., 2014). Významné snížení amplitudy rytmu exprese *Per2* bylo zaznamenáno například v plicích, které jsou cirkadiánně synchronizovány pouze SCN a nikoliv např. příjmem potravy (Stokkan et al., 2001). Autoři studie se domnívají, že dlouhodobé alternace cirkadiánní exprese v perifériích jsou zapříčiněny změnami v SCN vlivem stálého světla, v podobě strukturálních změn a snížení amplitudy výstupů z SCN během vývoje systému (Brooks et al., 2014). U orgánů trávicí soustavy, které jsou cirkadiánně synchronizovány primárně dobou příjmu potravy, tyto trvalé změny v expresi hodinových genů pozorovány nebyly (Brooks et al., 2014; Damiola et al., 2000). Je tedy možné, že i v mozkových tkáních primárně závislých na cirkadiánním rytmu SCN budeme pozorovat podobné dlouhodobé změny exprese hodinových genů. Tato diplomová práce se zaměřila na změny exprese hodinových a dalších vybraných genů ve strukturách frontálního a parietálního kortexu, čichových laloků, hipokampu, sítnice a SCN, které vznikají vlivem světla v noci během raného postnatálního vývoje.

2.2. STÁLÉ SVĚTLO

Pro správnou funkci cirkadiánního systému je nezbytný vysoký kontrast mezi dnem a nocí, který umožňuje synchronizaci cirkadiánních oscilací se solárním cyklem, ale také adaptaci ke změně fotoperiody během roku. V moderní společnosti je však tento kontrast stále výrazněji smazáván. Člověk se pohybuje velkou část dne v zastřešených prostorách, které snižují intenzitu denního světla, kterému je vystaven, naopak zvečera a v noci je exponován silnému umělému osvětlení. Organismy ve volné přírodě jsou ohroženy trvale se zvyšujícím světelným znečištěním, které snižuje synchronizační sílu zeitgeberu a narušuje adaptaci ke změnám fotoperiody důležitou například pro sezónní rozmnožování.

2.2.1. Současná úroveň světelného znečištění

Úroveň světelného znečištění nad kontinenty dokumentuje studie (Falchi et al., 2016). Na obrázku č. 4 jsou znázorněny intenzity jasu noční oblohy naměřené nad Evropou. Studie popisuje znepokojivé výsledky měření satelitní technikou a uvádí, že více než třetina obyvatel planety žije ve světelně znečištěném prostředí, které znemožňuje pozorovat Mléčnou dráhu. U měřeních provedených nad Evropou je možné pozorovat světelné znečištění rozprostírající se na 88% plochy kontinentu a v hustě obydlených oblastech dosahuje noční obloha hodnot svítivosti 1 mcd/m^2 (na obr. č. 4 znázorněno červeně), kdy u člověka dochází k aktivaci čípků v oku a přechodu mezi skotopickým a mezopickým viděním (Kelber & Lind, 2010). V současnosti dosahuje intenzita nočního světla ve městech i násobků této hodnoty.



Obrázek č. 4: Mapa jasu nočního nebe Evropy způsobená světelným znečištěním. Mapa byla sestavena ze satelitních snímků zenitu, pořízených v době přibližně 1:00 v noci pro každou časovou oblast. Přirozený jas noční oblohy (ustanoven na 174 $\mu\text{cd}/\text{m}^2$) byl z naměřených hodnot odečten. Výsledné hodnoty tak odpovídají pouze světlu v noci způsobeným umělým osvětlením. Pro lepší představu: hodnota intenzity jasu na mapě znázorněná červeně, je srovnatelná s intenzitou během svítání se sluncem $6^\circ - 12^\circ$ pod horizontem. Při těchto intenzitách rovněž už není pozorovatelná Mléčná dráha. Obrázek převzat a upraven z (Falchi et al., 2016).

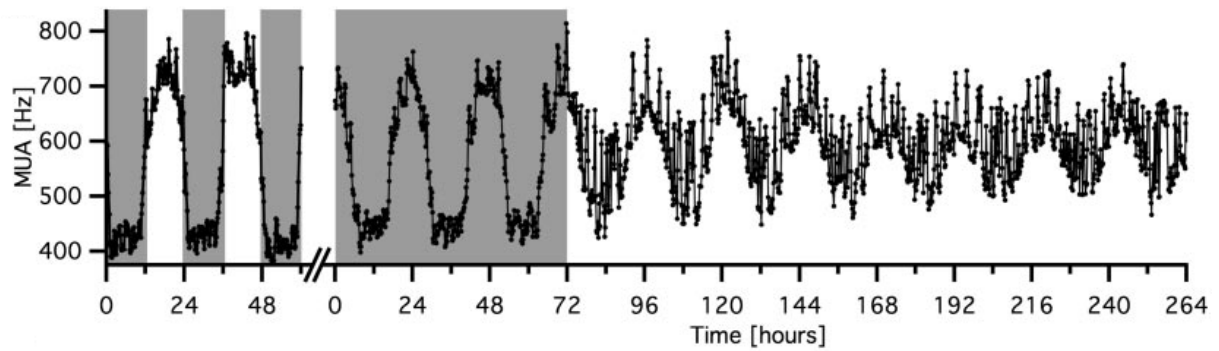
2.2.2. Dopad večerního sledování displeje a obrazovky na fyziologii člověka

Vedle zvyšující se hladiny nočního světla ve vnějším prostředí, působí na člověka také světlo emitované elektrickými zařízeními, jako jsou iPody, tablety a podobně. Nedávné experimenty ukázaly, že používání tabletu, počítače či čtečky knih ve večerních hodinách po dobu delší než 2h způsobuje signifikantní potlačení produkce melatoninu (Chang et al., 2015; Figueiro et al., 2011; Wood et al., 2013). Kromě hladin melatoninu večerní světlo snižuje míru večerní ospalosti a výskyt théta vln v předním mozku, což je asociováno s pozdějším usínáním a zhoršenou bystrostí a kognitivními schopnostmi při řešení úloh v ranním testování (Cajochen et al., 2000, 2011; Lockley et al., 2006). Vystavení člověka již 100 luxům po několik hodin večer zhoršuje tyto funkce o přibližně 50% maximální hodnoty, které je dosaženo při vystavení jedinců silnému světlu o

několika tisících luxech (Cajochen et al., 2000; Zeitzer et al., 2000). Je zajímavé, že televizor ani po 90 minutách nesnižuje večerní hladinu melatoninu, pravděpodobně kvůli vzdálenosti od zdroje světla, která byla poznatelně větší než při sledování například tabletu (Figueiro et al., 2013). Po vypnutí večerního světla syntéza melatoninu opět narůstá, ale dosahuje signifikantně nižšího maxima, které je zároveň fázově zpožděno i o několik hodin oproti kontrolním, neosvětleným osobám. Děti ve věku 15 až 17 let vykazují zvýšenou citlivost na večerní světlo a znatelnější potlačení syntézy melatoninu než ostatní věkové skupiny (Figueiro & Overington, 2015). Pozdější usínání vlivem večerního světla může v kombinaci s časným ranním vstáváním vést ke spánkové deprivaci. Obzvláště u školáků byly pozorovány časté spánkové deprivace během všedních dnů, které vedly ke zvýšení výskytu depresivních nálad a zhoršení kognitivních schopností u dětí (Carskadon et al., 2004).

2.2.3. SCN na stálém světle

Každý neuron SCN je schopen individuální oscilace na základě TTFL, ale synaptická propojení mezi nimi zajišťují jejich vzájemnou synchronizaci a vznik jednotného časového signálu (Welsh et al., 1995). Při nedostatečném synchronizačním stimulu v podobě střídání se světelné a dostatečně tmavé temností fáze dne, nejsou neurony SCN mezi sebou dobře synchronizované, výsledný časový signál z SCN je slabý a dochází k desynchronizaci cirkadiálního systému. Studie indikují, že neurony SCN nejsou schopny synchronizované cirkadiální aktivity v podmínkách stálého světla (LL). V *in vitro* kulturách SCN arytmičtých jedinců z LL podmínek byly cirkadiální rytmy v expresi hodinových genů v jednotlivých neuronech nesynchronizované, a výsledná amplituda rytmů celého SCN byla v porovnání s kontrolami signifikantně snížena. Amplituda rytmu u jednotlivých neuronů SCN zůstala zachována (Ohta et al., 2005). Desynchronizaci neuronů na LL potvrzují i pozorování *in vivo* (obr. č. 5). Při vystavení stálému světle o 180 luxech po dobu 5 týdnů se amplituda rytmu ve frekvenci akčních potenciálů snížila o 66% (Coomans et al., 2013). Časové signály, které vycházejí z SCN pak nejsou dostatečně silné pro efektivní synchronizaci periferních oscilátorů a dochází fázovým posunům jednotlivých rytmů od sebe navzájem (například teplotní rytmus se neshoduje s fází rytmu denní aktivity) (Depres-Brummer et al., 1995). Výsledkem je desynchronizace oscilátorů cirkadiálního systému od sebe navzájem na úrovni celého organismu.



Obrázek č. 5: Záznam elektrické aktivity SCN *in vivo*. Graf znázorňuje změny frekvence akčního potenciálu (černé body) SCN na světle o intenzitě 180 luxů (světlé pozadí grafu) a ve tmě (tmavé pozadí grafu). Zvířatům byl umožněn volný pohyb po výběhu. V levé části grafu je SCN synchronizováno LD podmínkami a amplituda SCN aktivity je nejvyšší. Zvířata v DD vykazovala prodloužení vnitřní periody (tau) a zachovanou vysokou amplitudu aktivity SCN. V levé části grafu byla zvířata vystavena 180 luxům stálého světla a jejich amplituda rytmu ve frekvenci akčních potenciálů SCN se po 5 týdnech LL podmínek snížila o 66%. Převzato a upraveno z (Coomans et al., 2013).

2.2.4. Vliv stálého světla na dospělý organismus

Při vystavení stálému světlu dochází k desynchronizaci jednotlivých oscilátorů v periferních tkáních od sebe navzájem a od SCN. Výsledkem cirkadiánní desynchronizace mohou být závažné metabolické komplikace v podobě nadměrného přibývání na váze a snížení energetického výdaje (Coomans et al., 2013), snížené inzulínové citlivosti a glukózové tolerance (Fonken et al., 2010) či dokonce podpora růstu nádorové tkáně (Guerrero-Vargas et al., 2017). Tyto metabolické a imunitní komplikace se ve velké míře vyskytují i u arytmiických myší s mutací hodinového genu *Clock* (Turek et al., 2005). U osob spících při 40 luxech v noci byl významně narušen spánek, lidé se významně častěji budili a měli sníženou amplitudu a aktivitu pomalých spánkových vln či prodlouženou fázi spánku N1 (Cho et al., 2013). Pozdější studie téže laboratoře ukázala zvýšený počet probuzení a změny struktury spánku u lidí dokonce při pouhých 5 luxech v noci, což je intenzita světla srovnatelná se svítáním kdy je slunce ještě pod horizontem (Cho et al., 2016).

Intenzita světla potřebná pro vyvolání signifikantních rozdílů v kognitivních schopnostech je druhově specifická. Při testech na dobrovolnících se působení 10 luxů během spánku projevilo na zhoršení výsledků v testech pracovní paměti a snížení aktivity vybraných oblastí mozku měřené fMRI, zatímco 5 luxů v noci nemělo dostatečný efekt (Kang et al., 2016). Laboratorním hlodavcům však už 5 luxů během noci stačilo k významnému zhoršení kognitivních schopností měřených testy

v Barnesově bludišti (Fonken et al., 2012). U savčích animálních modelů měly nízké intenzity světla během noci za následek potlačení cirkadiánní rytmicity tělesné teploty a pohybové aktivity (Depres-Brummer et al., 1995). Mezi citlivé fyziologické funkce organismu patří rovněž imunitní systém. Vystavení laboratorních zvířat po několik týdnů nočním intenzitám světla o 5 luxech způsobilo významné snížení efektivity imunitního systému (Bedrosian et al., 2011B). V neposlední řadě dochází k signifikantním změnám například v hormonálních hladinách, jmenovitě k potlačení pineálního melatoninu vlivem světla (obzvláště u modrého) během noci (Lewy et al., 1980) či narušení cirkadiánního biorytmu hladiny kortizolu (Rahman et al., 2019). SCN je multisynapticky propojeno s nadledvinami a se zvyšující intenzitou světla koreluje zvyšující se hladina glukokortikoidů v krvi, které následně indukují expresi genů rodiny *Per* v periferních oscilátorech (Balsalobre et al., 2000; Buijs et al., 1999; Ishida et al., 2005). Negativní efekt stálého světla je u dospělého člověka pocíťován na úrovni celého organismu, rozsah důsledků vystavení světelnému stresu na vyvíjejícího se jedince zůstává předmětem studií.

2.3. Vývoj cirkadiánního systému

Přestože je cirkadiánní systém nezbytný pro optimální fungování našeho těla, jeho vývoj není ještě zcela prozkoumán. Víme, že mateřský cirkadiánní systém není nezbytný pro vývoj cirkadiánního systému mláďat, neboť samicím s odstraněným SCN se narodila mláďata s plně funkčním cirkadiánním systémem (Davis & Gorski, 1988). Stejně tak samicím s delecí hodinového genu *Clock* se narodila mláďata s neporušenými hodinami (Jud & Albrecht, 2006). Během prenatalního vývoje dochází mezi dny E13,5 a E17 k tvorbě většiny nervových buněk SCN, a zhruba v tomto období je již také měřitelná, ač nerytmická, exprese hodinových genů v stále ještě nedokončených orgánech na periferiích (Altman & Bayer, 1978; Landgraf et al., 2015).

Citlivost cirkadiánního systému k zeitgeberům se však vyvíjí pozvolna. Po narození je u potkanů v den P10 dotvořen retinohypotalamický trakt (RHT) přenášející informace o světle ze sítnice do SCN, a v P15, den po otevření očí potkana, je teprve citlivost a odpověď sítnice a SCN na přítomnost světla srovnatelná s hodnotami pozorovanými v dospělém systému (Llamosas et al., 2000; Speh & Moore, 1993). Cirkadiánní exprese hodinových genů je spolehlivě měřitelná okolo P3 ale teprve v P10 jsou cirkadiánní oscilace přizpůsobené různé délce dne (Bendová et al., 2004; Kováčiková et al., 2005). Maturace SCN a jeho funkcí je u potkana dokončena během 3. týdne postnatálního vývoje, kdy dochází k dozrání astrocytů v jádře (Munekawa et al., 2000).

2.3.1 Efekt stálého světla během kritické periody vývoje cirkadiálního systému potkana

Studii zabývajících se vlivem světla v noci na maturaci cirkadiálního systému a kognitivních funkcí je poměrně málo. Laboratoř prof. Canal-Corretger se zabývala vymezením tzv. kritické periody vývoje cirkadiálního systému a ukázala, že vystavení stálému světlu mezi P10 a P20 mělo za následek významné snížení světlem-indukovaného fázového posunu exprese TTFL v SCN v dospělosti (Canal-Corretger et al., 2001). Pigmentovaná zvířata nevykazovala žádné změny morfologie či funkce sítnice vlivem LL v mládí, které by mohly být příčinou sníženého fázového posunu (Brooks et al., 2014; González-Menéndez et al., 2010A). U potkanů albínů ale studie objevily poškozující efekt stálého světla v raném postnatálním vývoji a degeneraci jejich čípků a tyčinek (Brooks et al., 2014; Rapp & Williams, 1980). Stálé světlo v mládí u albínů rovněž snížilo počet maturovaných ipRGCs (González-Menéndez et al., 2010B). Signály ze sítnice jsou však nezbytné pro zajištění správné funkce a morfologie SCN (Laemle et al., 2002). Ačkoliv albíni potkanů kmene Wistar mohou poskytnout dobré informace o provázanosti funkce SCN se sítnicí oka, pro studium efektu stálého světla představují extrém, který je pravděpodobně příliš vzdálen aplikaci výsledků v biomedicině.

Studie, zkoumající dlouhotrvající změny v SCN a cirkadiálním systému v dospělosti vlivem LL během raného postnatálního vývoje, popisují řadu signifikantních změn spíše adaptačního charakteru. Zvířata vyrůstající na LL si v LL podmínkách v dospělosti zachovávala větší cirkadiální rytmicitu chování než zvířata vyrůstající na LD a stala se tak odolnějšími vůči stálému světlu. (Cambras et al., 1998). Vznik arytmiického cirkadiálního chování LD zvířat na stálém světle koresponduje se snížením amplitudy výstupních signálů z SCN (Mason, 1991) a ztrátou rytmické exprese *Per2* v SCN (Sudo et al., 2003). Naopak u zvířat vystavených LL v mládí byla amplituda exprese *Per2* v SCN zvýšená. Zdá se tedy, že stres stálého světla během časného vývoje způsobuje adaptační přizpůsobení a posiluje synchronizaci mezi buňkami SCN kvůli vyšší amplitudě *Per2* exprese (Brooks et al., 2014; Meijer et al., 2012). Jiná studie však ukazuje, že u zvířat vyrůstajících na stálém světle v mládí jsou v dospělosti snížené hladiny AVP a VIP v SCN (Smith & Canal, 2009), tedy neuropeptidů podílejících se na synchronizaci SCN neuronů (VIP) (Aton et al., 2005) a outputu z SCN (AVP) (Kalsbeek et al., 2010). Expozice stálému světlu v juvenilním věku také vedlo ke strukturálním změnám astrocytů v SCN (Canal et al., 2009). Astrocyty se uplatňují v regulaci cirkadiálního chování (Moriya et al., 2000) a pravděpodobně se podílejí i na přenosu světelné informace v SCN (Lavialle et al., 2001).

U mláďat odchovaných na stálém světle, byly rovněž v dospělosti pozorovány změny v expresi hodinových genů v celém hypotalamu. Byla prokázána zvýšená amplituda v rytmu exprese genu *Clock* a snížená amplituda exprese genu pro REV-ERB α . Produkty genů *Per*, *Cry* a

Bmall, stejně jako ostatní geny TTFL v hypotalamu, nevykazovaly signifikantní změny v amplitudě (Cissé et al., 2016). Pro porovnání, vystavení dospělých zvířat stejným nízkým intenzitám světla (5 luxů) během temnostní periody, mělo za následek vždy snížení amplitudy rytmu transkriptů hodinových genů, jmenovitě u *Per1* a *2* v SCN, a genu pro REV-ERB v periferních orgánech (Fonken et al., 2013).

V oblasti hipokampu bylo u dospělců pod stálým světlem pozorováno signifikantní snížení exprese genu *BDNF* (angl. brain-derived neurotrophic factor), doprovázené depresivními stavy a sníženou hustotou dendritů CA1 neuronů (Bedrosian et al., 2011A; Fonken & Nelson, 2013). BDNF ve strukturách centrálního nervového systému podporuje vývoj a synaptickou plasticitu (Park & Poo, 2013) a zároveň se při jeho nedostatku stává struktura zranitelnější k poškození kyslíkovými radikály (Hacioglu et al., 2016). Snížené hladiny BDNF zapříčiněné světlem v noci by mohly být jedním z důvodů zhoršení prostorové paměti a dalších kognitivních funkcí (Fonken et al., 2012). Jaký je stav BDNF v nervových strukturách mláďat odchovaných v LL podmínkách zůstává neznámé. Studie rovněž naznačují, že hodinové geny regulují oxidativní stres ve strukturách mozku (Kondratov et al., 2006).

Studii zkoumající trvalé změny v expresi genů TTFL a v ostatních genech u zvířat vyrůstajících v LL podmínkách však zůstává nedostatek. Snížená amplituda a/nebo fázový posun rytmu cirkadiánní exprese *Per2* byla nalezena také v periferních orgánech, v srdci, plicích a slezině (Brooks et al., 2014). Exprese hodinových genů však zůstala nezměněna například v játrech, pravděpodobně díky schopnosti orgánů trávicího systému synchronizovat se spíše s dobou příjmu potravy a nikoliv se signály z SCN (Damiola et al., 2000).

2.3.2. Rozvoj úzkostného chování mláďat na stálém světle

Abnormální exprese hodinových genů je asociována s výskytem duševních poruch či úzkostnými stavy. Nové poznatky ukazují, že zvýšená intenzita světla v noci během kritické periody může způsobit dlouhodobé změny exprese těchto genů. U mláďat odchovaných na 5 luxech nočního světla během prvních pěti týdnů postnatálního vývoje byl v dospělosti pozorován zvýšený výskyt úzkostného chování. Studie rovněž zaznamenala dlouhodobé zvýšené amplitudy transkriptů *Clock* a snížené *Rev-Erb* v hypotalamu (Cissé et al., 2016). Podobné navýšení amplitudy exprese *Clock* genu bylo pozorováno v nucleu accumbens při vystavení jedince chronickému stresu (Logan et al., 2015). Dospělá zvířata na stálém světle vykazovala oproti kontrolám naopak snížené projevy úzkostného chování v aparaturách otevřeného pole, vyvýšeného kruhového bludiště i light/dark boxu (Aubrecht et al., 2013; Bedrosian et al., 2011A).

U zvířat odchovaných v LL podmínkách po dobu prvních 3 týdnů, se v dospělosti projeví změny v odpovědi na stres, odchylky v HPA ose a regulaci nálad. Zvířata měla sníženou expresi glukokortikoidového receptoru v oblasti hipokampu, zvýšenou expresi kortikoliberinu v paraventriculárním jádře hypotalamu, zvýšené hladiny kortikosteronu při začátku temnotní fáze a celkově zvýšené depresivního chování v dospělosti (Coleman et al., 2016). Dlouhodobé podmínky stálého světla mohou zvyšovat stres zvířete (Claustrat et al., 2008) a samice ve stresovém prostředí vykazují snížení průjevů mateřského chování, které vede ke změnám stresových odpovědí potomků (Ivy et al., 2008; Liu et al., 1997). Recentní studie však ukázala, že i silné stálé světlo několik dnů před porodem a během doby sání nezpůsobuje u matek zvýšení žádného ze zkoumaných stresových markerů (hladiny kortizolu v krvi, AVP a glukokortikoidových receptorů v mozku) a nesnižuje ani žádný z pozorovaných projevů mateřského chování (přenášení, čištění a olizování mláďat) (Coleman & Canal, 2017). Výsledky studie tak potvrzují, že změny v HPA ose mláďat ve stálém světle nejsou zapříčiněny mateřským stresem.

2.4. NMDA receptor a jeho podjednotky

NMDAR jsou glutamátové ionotropní receptory, které jsou stěžejní při excitačním synaptickém přenosu v CNS a umožňuje mj. synaptické modifikace LTP (dlouhodobá potenciace) či vývoj tkání CNS. Jejich přílišná aktivita může rovněž působit excitotoxicky v nervových buňkách. NMDA receptory se skládají celkem ze 4 podjednotek, které determinují vlastnosti receptoru (Moriyoshi et al., 1991). Receptor se skládá ze dvou GluN1 podjednotek, vázající koaktivátor receptoru glycin (Kuryatov et al., 1994) a dvou GluN2 podjednotek vázající glutamát (Anson et al., 1998). Ze čtyřech GluN2 podjednotek A-D jsou ve strukturách koncového mozku nejzastoupenější podjednotky A a B (Chazot & Stephenson, 1997). Se zvyšující se afinitou NMDAR ke glutamátu, se prodlužuje doba odvázní glutamátu od receptoru a způsobuje tak déle trvající EPSC (excitační postsynaptický proud) (Lester & Jahr, 1992). Jednotlivé podjednotky GluN2 se liší afinitou k ligandu, přičemž GluN2A disponuje afinitou nejnižší a její časová konstanta desenzitizace je 3 - 4x kratší než podjednotky GluN2B a GluN2C. U receptorů z GluN1-GluN2D byla pozorována nejvyšší afinita k ligandu a časová konstanta desenzitizace byla až 40x delší než u receptorů GluN1-GluN2A (Monyer et al., 1994).

Procentuální zastoupení jednotlivých podjednotek NMDA receptoru se zhruba v prvních 3 týdnech postnatálního vývoje drasticky mění, a to i v SCN (Bendová et al., 2009). Expresie GluN1 a GluN2A podjednotek v nervových buňkách se od dne narození rapidně navyšuje a ustaluje se do konstantních hodnot mezi 2. a 3. týdnem. Tento průběh byl pozorován ve většině zkoumaných

mozkových struktur (kortexu, hipokampu, talamu, mozečku). Oproti tomu exprese GluN2B podjednotky dosahovala svého maxima na konci prvního postnatálního týdne a po maximu zůstávala konstantní. Exprese GluN2B byla už od prvního dne narození vyšší, než pro podjednotku GluN2A a převyšuje ji až to zhruba konce prvního týdne vývoje. I přes konstantní expresi po dosažení svého maxima exprese GluN2B jednotek ve většině struktur, byl na kortikálních synapsích pozorován dokonce signifikantní úbytek po dosažení maxima exprese podjednotky GluN2B. Přibližně na konci prvního týdne exprese i zastoupení 2A podjednotek na synapsi, převyšuje hodnotu pro 2B jako je tomu u dospělých jedinců (Liu et al., 2004; Riva et al., 1994; Zhong et al., 1995). Aplikace NMDA antagonisty v kritické periodě vývoje, kdy exprese podjednotek GluN2B převyšuje GluN2A má za následek přetrvávající snížení citlivosti na podnět a plasticitu nervové struktury, které nenastává pokud je antagonist aplikován mimo tuto periodu (Bear et al., 1990). NMDA receptory jsou stěžejní pro synchronizaci světlem (Bendová et al., 2012; Ding et al., 1994; Wang et al., 2008) a změna jejich podjednotkového složení bývá průvodním znakem či příčinou rozvoje řady neurodegenerativních či neurovývojových onemocnění (Endele et al., 2010; Paoletti et al., 2013).

3. CÍLE PRÁCE

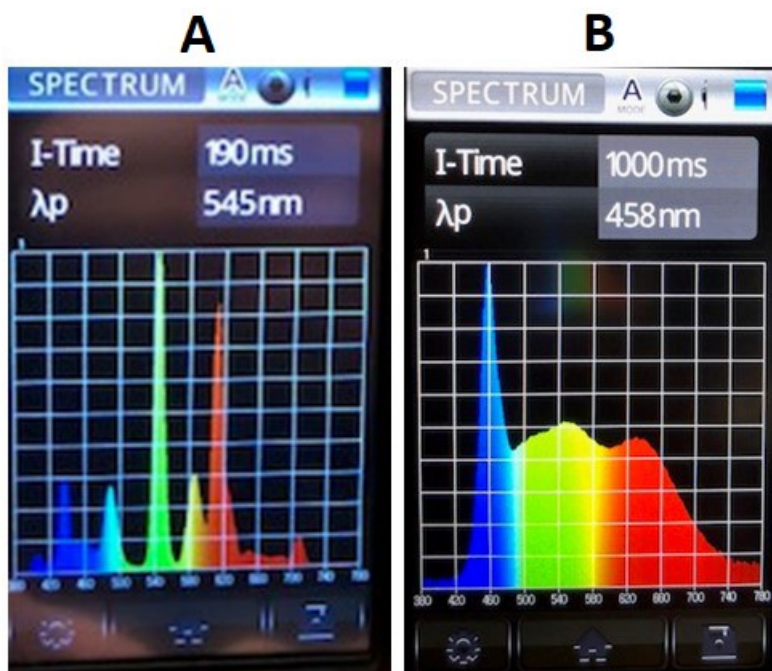
Cílem diplomové práce bylo zjistit vliv vystavení stálému světlu o intenzitě 50 luxů během raného postnatálního vývoje mezi dny P0 a P20 na rozvoj úzkostného chování a rytmickou genovou expresi v několika strukturách mozku. Prvním cílem bylo stanovení míry úzkostného chování u potkanů po dni P60 pomocí behaviorálních testů otevřeného pole, vyvýšeného kruhového bludiště a light/dark box testu. Druhým cílem bylo determinovat změny exprese hodinových genů *Per2* a *Nr1d1*, genů *Stat3*, *BDNF*, a genů podjednotek NMDA receptoru GluN1, GluN2A, GluN2B a dalších vybraných tkáňově specifických genů v sítnici oka. Změny v expresi byly určeny pomocí kvantifikace přítomné mRNA daného genu s použitím metody kvantitativní Real-Time PCR ve strukturách frontálního kortexu, parietálního kortexu, hipokampu, čichových laloků, SCN a sítnice.

4. METODY A VYBAVENÍ

4.1. Laboratorní zvířata

Pokus byl prováděn na samcích a samicích potkanů kmene Long-Evans ($n = 56$). Zvířata byla chována v boxech o maximálně třech jedincích se standardní podestýlkou, a přístupem k vodě a krmivu *ad libitum*. V chovné místnosti byla udržována pokojová teplota 23 ± 2 °C. Zdroje světla byly umístěny nad každou z chovných nádob a intenzita světla (50 luxů) byla kontrolována pomocí luxmetru. Světelné spektrum osvětlení použité v tomto experimentu je znázorněno na obrázku č. 6B. Automatické zapínání a vypínání světel bylo zajištěno spínacími hodinami v chovné místnosti. Zvířata byla několikrát týdně handlována v průběhu trvání experimentu.

Každá březí samice byla samostatně umístěna do chovného boxu, kde byla až do porodu mláďat na standardním světelném režimu, tj. od 7:00 (CT0) do 19:00 (CT12) na světle o intenzitě 50 luxů a v noci od 19:00 do 7:00 ve tmě 0 luxů (dále jako LD12:12). V den porodu (P0) byla mláďata náhodně rozdělena do dvou skupin. První skupině byl změněn světelný režim na stálé 24hodinové světlo o intenzitě 50 luxů (dále jako skupina LL, $n = 29$). Druhá skupina, sloužící jako kontrola, byla umístěna do oddělené místnosti se standardním světelným režimem LD12:12 ($n = 27$). Zvířata na těchto světelných podmínkách zůstala po dobu 20 dní (do P20), poté byly obě skupiny umístěny do LD12:12 světelném režimu po celý zbytek experimentu.



Obrázek č. 6: Světelné spektrum standardních zářivek (A) a LED osvětlení použité v našem experimentu (B). Světlo bylo nastavené na intenzitu světla 50 luxů uvnitř chovné nádoby a

umístěné nad chovnými boxy. Tento typ osvětlení více odpovídal světelnému spektru slunečního světla než běžné zářivky a zároveň poskytoval dostatek biologicky aktivního modrého světla, na které je cirkadiální systém nejvíce citlivý. Na obrázku A je pro porovnání znázorněno světelné spektrum běžného zářivkového osvětlení v chovech.

4.2. Behaviorální testy

Po dni P60 byla kontrolní a LL zvířata podrobena behaviorálním testům pro zjištění míry úzkostného chování. Testování probíhalo vždy ve stejnou denní dobu při pokojové teplotě $23 \pm 2^\circ\text{C}$ a konstantní intenzitě světla pro jednotlivé typy testů. Zvířata byla 30 minut před začátkem testování přemístěna do prostoru sousedícího s behaviorální testovací místností a ponechána minimálně 30 minut v klidu odpočinout. Potkani byli rozděleni do 5 skupin s rovnoměrným zastoupením kontrolních/LL zvířat a samců/samic. Jeden den byla testována vždy jen jedna skupina zvířat. Testování všech skupin v aparatuře otevřeného pole a vyvýšeného kruhového bludiště proběhlo vždy mezi 9:00 a 11:00 dopoledne. Pro test v light/dark boxu muselo být testování všech skupin posunuto na 13:30 až 15:30 odpoledne. Pohyb a chování zvířete bylo zaznamenáváno od okamžiku jejich umístění do aparatury po dobu vždy 5 minut. Po ukončení testu bylo zvíře vráceno do svého boxu v přílehlé habituální místnosti. V aparatuře bylo vždy v jeden čas přítomno a testováno pouze jedno zvíře a před umístěním nového zvířete do aparatury byla vždy celá plocha vyčištěna 70% ethanolem. Kamera umístěná nad aparaturou monitorovala pohyb zvířete po dobu měření a data byla vyhodnocena po skončení měření ze záznamu za použití AnyMaze software (Ugo Basile, Itálie).

V testu otevřeného pole byla zvířata umístěna vždy doprostřed aparatury o rozměrech 92 x 92 cm ohraničené 40 cm vysokou neprůhlednou stěnou. V záznamu byla aparatura rozdělena na dvě plochy o stejném obsahu, a to na oblast „středovou“ v centru aparatury a „okrajovou“ po stranách. Program zaznamenával celkovou uraženou dráhu zvířete v jednotlivých oblastech, celkový čas strávený v oblastech, počet vstupů do oblastí a délku nejdelšího setrvání v každé oblasti. Po dobu trvání experimentu byla nad aparaturou udržována konstantní intenzita světla 180 luxů ve středu a okolo 120 luxů při okrajích.

Aparatura vyvýšeného kruhového bludiště o průměru 120 cm se skládala ze dvou otevřených a dvou zakrytých ramen, vyzdvižených 60 cm nad zemí. V uzavřených ramenech ohraničených 30 cm vysokými neprůhlednými stěnami byla udržována konstantní intenzita světla 50 luxů. V otevřených ramenech bez stěn dosahovala intenzita světla 180 luxů. Zvířata byla vždy na začátku měření umístěna do středu jednoho z otevřených ramen a mohla se volně pohybovat

mezi jednotlivými rameny. V místnosti s aparaturou byl přítomen vědecký pracovník, kvůli možnosti pádu zvířete z otevřených ramen. Byla zaznamenávána celková uražená dráha v jednotlivých oblastech, celkový čas v oblastech, počet vstupů do uzavřené oblasti, nejdelší setrvání v uzavřené oblasti a doba do prvního vstupu do uzavřené oblasti.

V testu light/dark box bylo zvíře umístěno do aparatury skládající se z otevřené oblasti ohraničené průhlednou stěnou a uzavřené zastřešené části, které byly vzájemně odděleny otvorem umožňující průchod zvířete mezi oblastmi aparatury. Intenzita světla v otevřené oblasti dosahovala cca 180 luxů, v otvoru mezi oblastmi cca 50 luxů a uvnitř zatemněné části bylo 0 luxů. Zvíře bylo na začátku měření umístěno do osvětlené části aparatury a bylo ponecháno po dobu 5 minut volnému pohybu po aparatuře. Z důvodu zastřešení temné části aparatury nebylo možné monitorovat pohyb zvířete v této oblasti a ani celkovou uraženou dráhu. Záznam kamery byl zpětně analyzován po skončení měření s použitím programu BORIS (Friard & Gamba, 2016), který umožňuje přesně stanovit dobu strávenou v jednotlivých oblastech aparatury a počet výstupů z každé oblasti.

4.3. Statistické zpracování dat z behaviorálních testů

Naměřené hodnoty z behaviorálních testů obou testovaných skupin zvířat byly vyhodnoceny pomocí nepárového t-testu s Welchovou korekcí. Byl určen průměr zkoumaných parametrů pro obě skupiny, střední chyba průměru SEM a hodnota P, vyjadřující pravděpodobnost platnosti nulové hypotézy (tj. hypotéza, že dva zkoumané soubory dat se signifikantně neliší mezi sebou a jejich rozdíl je tak nízký/nulový). Pokud platilo $P < 0,05$ rozdíl mezi skupinami byl označen jako signifikantní. Analýza dat a tvorba grafů proběhla v programu GraphPad Prism software version 8 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornie, USA).

4.4. Odběr tkání a izolace tkání

V den P90 byla zvířata převedena do stálé tmy, aby se odmaskoval okamžitý vliv světla na genovou expresi, a ve čtyřech časových bodech (CT2, CT8, CT14, CT20) byla uspána intraperitoneální injekcí thiopentalu (50mg/kg) a usmrcena dekapitací. Zvířata z kontrolní/LL skupiny a samci/samice byli rovnoměrně rozděleni mezi jednotlivé odběrové body. Ihned po usmrcení byly odebrány vzorky frontálního a parietálního kortexu, hipokampu, čichových laloků, hypotalamický bloček obsahující SCN a sítnice očí, a vzorky byly umístěny do sterilních Eppendorfových

zkumavek na suchý led. Po ukončení odběru v každém časovém bodě byly vzorky tkání ihned uloženy do -80°C .

Pro izolaci RNA z odebraných tkání, byly vzorky umístěny do sterilních Eppendorfových zkumavek s roztokem RNazol RT (Molecular Research Center) a homogenizovány při 30 Hz po dobu 10 minut. Vzorky byly po homogenizaci stočeny při 4°C a 11000G na centrifuze a supernatant odebrán do sterilních zkumavek. Pro izolaci RNA ze získaného supernatantu byl použit Direct-zol™ RNA Miniprep Kit (Zymo Research) a zde jsme postupovali podle instrukcí v přiloženém protokolu izolačního kitu. Po stanovení koncentrace RNA byly vzorky naředěny podle nejnižší koncentrace (k vzorku s nejnižší koncentrací, u každé tkáně individuální hodnota, cca $200\text{ ng}/\mu\text{l}$) a přepsány z RNA do cDNA s použitím High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Po přepisu byly vzorky umístěny do -20°C . Homogenizace, izolace a přepis do cDNA proběhla pro každou tkáň a všechny zvířata vždy v jeden den.

Hypotalamické bločky obsahující SCN byly na kryokatu nařezány na $30\ \mu\text{m}$ tlusté koronální řezy. Řezy byly barveny po dobu 30 vteřin roztokem kresylové violetě a jemně promyty etanolem. Po zaschnutí byly z řezů pomocí laserové mikrodisekce izolovány vzorky SCN do roztoku RLT bufferu (součást RNeasy Plus Micro kitu, Qiagen) a zamraženy na -80°C do pokračování izolace. K izolaci byl použit RNeasy Plus Micro kit a při postupu byli dodrženy pokyny v protokolu výrobce kitu. Výsledná RNA byla přepsána do cDNA s použitím Enhanced Avian Reverse Transcriptase eAMV RT (Sigma-Aldrich). Kvůli nízkému výtěžku RNA ze vzorků SCN byla provedena preamplifikace pomocí TaqMan™ PreAmp Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Vzorky byly posléze uloženy do -20°C a do 7 dnů po preamplifikaci byla provedena qPCR.

4.5. Kvantitativní RT-qPCR

Vzorky cDNA byly ve sterilním boxu napipetovány do jamek destičky pro qPCR měření po $2\ \mu\text{l}$ spolu s $3,1\ \mu\text{l}$ $5\times$ HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (Solis BioDyne), $10,3\ \mu\text{l}$ injekční vody a $0,6\ \mu\text{l}$ TaqMan próby (Life Technologies; Tab. č. 1) požadovaného genu. Měření qPCR probíhalo v přístroji LightCycler® 480 Instrument (Roche Life Science, Indianapolis, Spojené Státy). Po 15minutové denaturaci v 95°C proběhlo v přístroji celkem 60 cyklů denaturace (95°C po 18 s) a syntézy DNA (60°C po 60s). Ze získaných hodnot Ct (threshold cycle) byla s použitím metody $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Livak & Schmittgen, 2001) determinována relativní míra exprese zkoumaných genů.

Tabulka č. 1: Seznam všech použitých prób v experimentu. Próby pro *Per1*, *Opn4*, *Opn5*, *Opn1sw* a *Rho* použity pouze v sítnici. Tabulka udává zkratku zkoumaného genu, jaký produkt tento gen kóduje a identifikační kód příslušné próby od výrobce.

Jméno genu	Zkratka genu	Kód eseje
Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza	Gapdh	Rn01775763_g1
Period hodinový gen 1	Per1	Rn01325256_m1
Period hodinový gen 2	Per2	Rn01427704_m1
Jaderný receptor rodiny 1, skupina D, člen 1 (REV-ERBAALPHA)	Nr1d1	Rn01460662_m1
Signal transducer and activator of transcription 3	Stat3	Rn00680715_m1
Glutamátový receptor, ionotropický, N-metyl D-aspartát 1	Grin1	Rn01436034_m1
Glutamátový receptor, ionotropický, N-metyl D-aspartát 2A	Grin2a	Rn00561341_m1
Glutamátový receptor, ionotropický, N-metyl D-aspartát 2B	Grin2b	Rn00680474_m1
Brain-derived neurotrophic factor	Bdnf	Rn02531967_s1
Aralkylamin N-acetyltransferáza	Aanat	Rn01461110_m1
Opsin 4	Opn4	Rn00593931_m1
Opsin 5	Opn5	Rn00710997_m1
Opsin 1 krátkovězně senzitivní	Opn1sw	Rn00578824_m1
Rodopsin	Rho	Rn00583728_m1

4.6. Statistické zpracování dat cirkadiánní genové exprese

Analýza hodnot s použitím $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metody (Livak & Schmittgen, 2001) probíhala v několika krocích v programu Microsoft Office Excel. První řadě jsme vypočítali průměr Ct z tripletů pro každý vzorek. Pro získání ΔCt z průměrných hodnot tripletů jsme v rámci každého vzorku zvlášť odečetli Ct housekeeping genu *Gapdh* od Ct zkoumaného genu a tento krok jsme opakovali pro všechny zkoumané genu. Pro získání $\Delta\Delta Ct$ jsme od každé hodnoty vzorku ΔCt odečetli nejnižší nalezenou hodnotu vzorku ΔCt ve stejném genu a tento úkon jsme opakovali pro všechny vzorky a všechny zkoumané geny. V posledním kroku jsme vypočítali relativní hodnotu exprese zkoumaných genů s použitím vzorce $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pro každou hodnotu získanou z předchozího kroku. Pro přehlednost jsou všechny použité vzorce a úkony $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metody rozepsány ve čtyřech bodech:

- 1) Průměr Ct hodnoty z tripletů pro každý vzorek
- 2) $\Delta Ct = Ct$ (zkoumaného genu např. *Per2*) – Ct (housekeeping genu *Gapdh*)
- 3) $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (zkoumaného genu např. *Per2*) – ΔCt (nejnižší získané hodnoty pro stejný gen)
- 4) Hodnota relativní genové exprese = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (pro každou hodnotu)

Výsledné hodnoty byly přeneseny do programu GraphPad Prism 8, kde proběhlo finální zpracování hodnot analýzou jednocestná a dvoucestná analýza variance (ANOVA) a kosinorovou analýzou. Kosinorová analýza popisuje vlastnosti cirkadiálního rytmu a poskytnutými hodnotami prokládá sinusoidu kosinorové křivky podle vzorce:

$$Y = \text{mesor} + (\text{amplituda} * -\cos(2 * \pi * (X - \text{akrofáze}) / \text{vlnová délka})$$

Mesor představuje hodnotu průměru mezi maximální a minimální hodnotou proložené sinusoidy, amplituda kosinorové křivky popisuje hodnotu mezi maximálním bodem sinusoidy a hodnotou mezoru, a akrofáze je časový bod kdy kosinorová křivka dosáhla svého maxima při konstantní vlnové délce rytmu 24 hodin. Mesor a amplituda kosinorové křivky byly stanoveny v hodnotách relativních mRNA hladiny a akrofáze v hodinách cirkadiálního času CT. Hodnota P udává míru významnosti rozdílu mezi zkoumanými hodnotami. Pokud analýza vyhodnotila $P < 0,05$, rozdíl mezi těmito daty byl označen jako signifikantní a hodnota byla v tabulce či grafu pro přehlednost tučně označena (Tab. č. 2a, 2b).

Přítomnost rytmu v cirkadiální expresi byla potvrzena nebo zamítnuta dvěma testy. Jednak kosinorovou analýzou, která srovnávala testovaný profil genové exprese s nulovou hypotézou definovanou jako horizontální čára (H_0), a jednak testem jednocestná ANOVA, který posuzuje rozdíl hodnot mezi časovými body. Pokud obě analýzy vyhodnotily rozdíl $P < 0,05$, rytmicita exprese zkoumaného genu byla potvrzena. Pokud byla hodnota P jednoho z testů větší než 0,05, rytmus exprese nebyl signifikantní a do příslušného grafu byl zakreslen přerušovanou čarou. U potvrzených rytmů v expresi genů byla určena akrofáze, amplituda a mesor, které byly porovnány mezi skupinami kosinorovou analýzou.

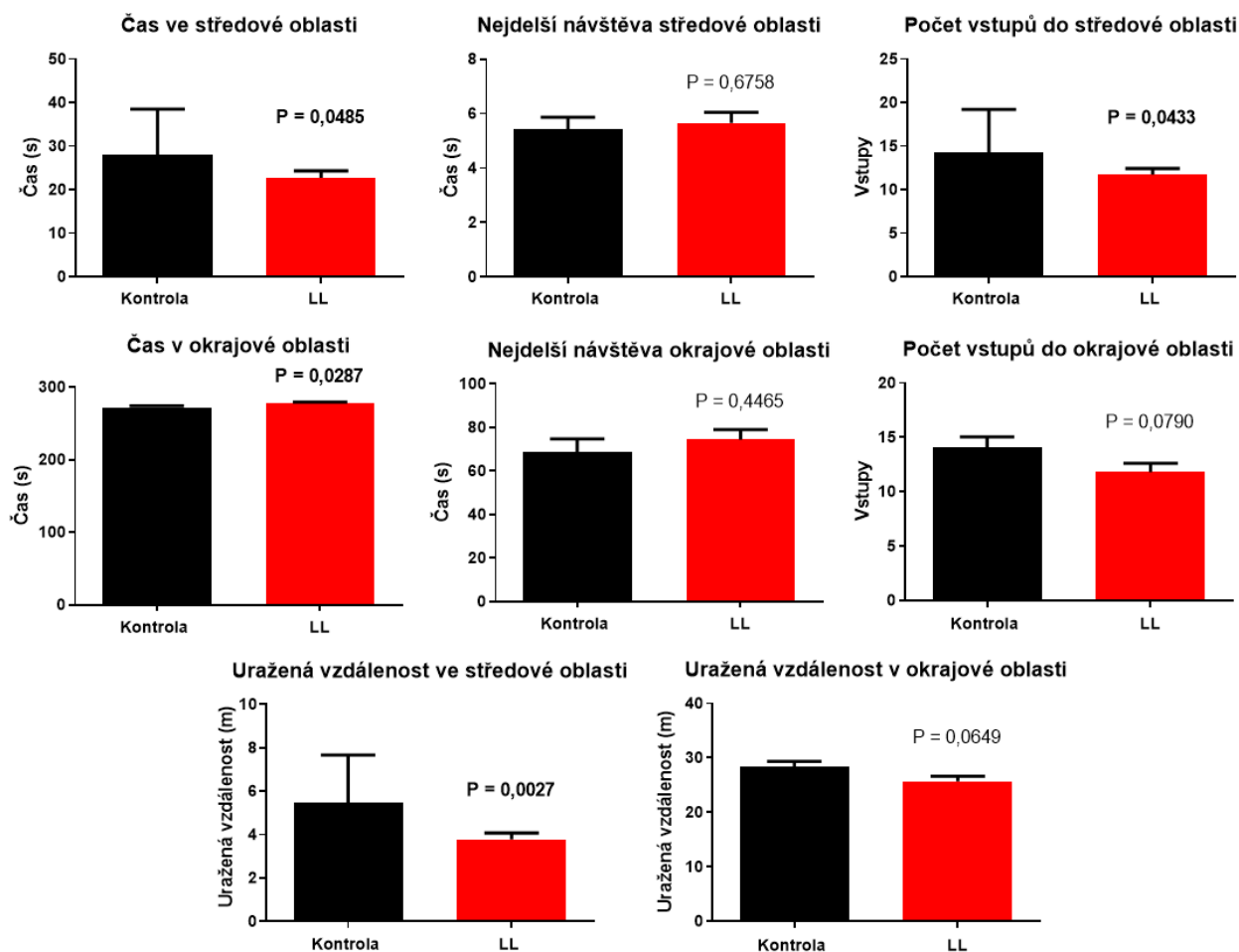
Rozdíl mezi hodnotami skupin kontrolních a LL zvířat byl hodnocen testem dvoucestné ANOVy. Jako v předchozím případě rozdíl mezi skupinami $P < 0,05$ byl označen jako signifikantní a v příslušném grafu byla tato hodnota tučně označena. Ve všech zkoumaných strukturách (tj. ve frontálním a parietálním kortexu, čichovém laloku, hipokampu, SCN a sítnici) proběhla analýza hodnot bez oddělení pohlaví.

5. VÝSLEDKY

5.1. BEHAVIORÁLNÍ TESTY

5.1.1. Výsledky testu otevřeného pole

Tento test analyzuje míru úzkostného chování porovnáním času stráveného ve středové a krajové oblasti a celkové uražené dráhy v těchto oblastech. Zvíře se zvýšenými projevy úzkostného chování stráví v okrajové oblasti delší dobu než zvířata zdravá. Úzkostná zvířata mají také tendenci méně prozkoumávat nové prostředí, což se projeví zkrácením délky uražené dráhy v aparatuře v porovnání ze zdravými jedinci. Po analýze dat z testu otevřeného pole, byl nalezen signifikantní rozdíl ve 4 z 8 měřených parametřů (obr. č. 7). Zvířata LL skupiny během testování strávila signifikantně kratší dobu ve středové oblasti ($P = 0,0485$), a delší dobu u okrajů aparatury ($P = 0,0287$) v porovnání s kontrolami. U LL skupiny zvířat byl rovněž zjištěn signifikantně nižší počet vstupů do středové oblasti ($P = 0,0433$) a významně kratší celková uražená dráha ve středové oblasti ($P = 0,0027$). Hodnoty mezi skupinami se od sebe signifikantně nelišily v počtu vstupů do okrajové oblasti ($P = 0,0790$), v uražené vzdálenosti v okrajové oblasti ($P = 0,0649$) a v nejdelší návštěvě středové ($P = 0,6758$) i okrajové oblasti ($P = 0,4465$).

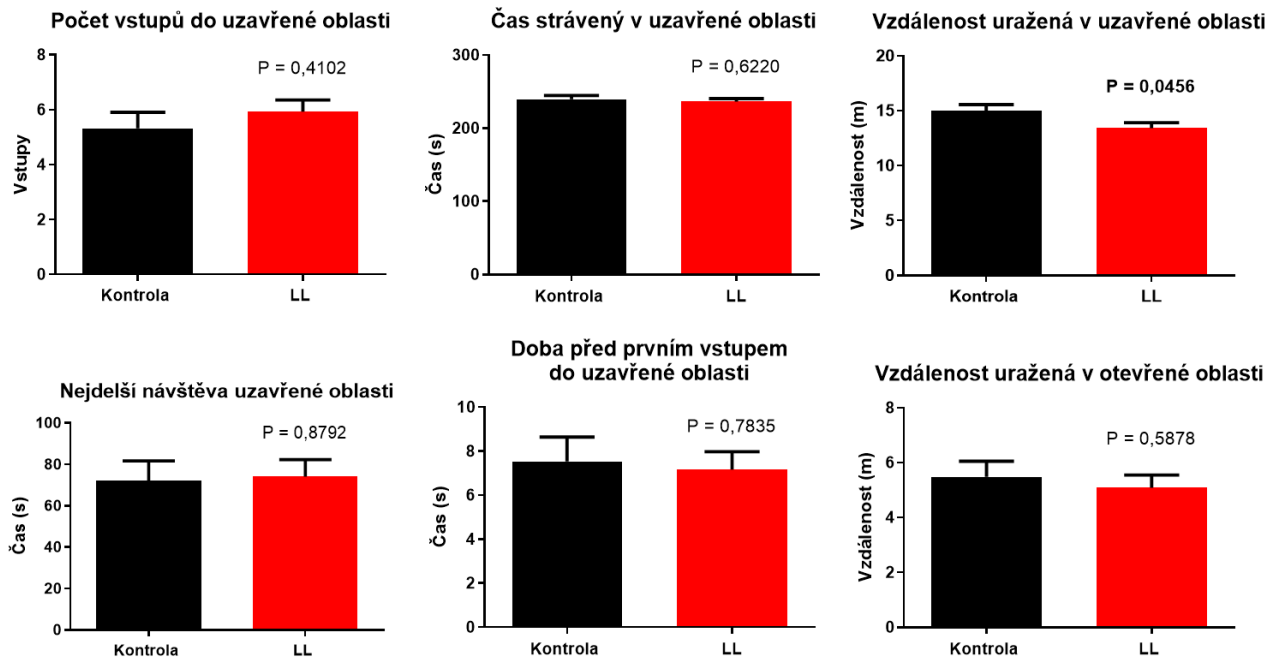


Obrázek č. 7: Porovnání výsledků testu otevřeného pole mezi kontrolní a LL skupinou. Grafy ukazují průměr hodnot \pm střední chyba průměru SEM. Byla sledována doba strávená v jednotlivých oblastech, počet vstupů do oblastí, uražená vzdálenost v oblastech a nejdelší návštěva oblastí. Každý z grafů obsahuje hodnotu P, udávající významnost rozdílu hodnot mezi oběma skupinami determinovanou pomocí nepárového t-testu s Welchovou korekcí. Rozdíl mezi skupinami byl považován za signifikantní, pokud platilo $P < 0,05$ (hodnota v grafu označena tučně). Signifikantní rozdíl byl nalezen v době strávené ve středové a okrajové oblasti, počtu vstupů do středové oblasti a celkové uražené vzdálenosti ve středové oblasti.

5.1.2. Výsledky testu vyvýšeného kruhového bludiště

Tento test analyzuje míru úzkostného chování porovnáním času stráveného v otevřených ramenech a uzavřených ramenech aparatury, a celkové uražené dráhy v těchto oblastech. Zvíře se zvýšenými projevy úzkostného chování stráví v uzavřených ramenech delší dobu než zvířata zdravá. Úzkostná zvířata mají rovněž tendenci méně prozkoumávat nové prostředí, což se projevuje kratší délkou uražené dráhy v aparatuře v porovnání ze zdravými jedinci. V tomto testu se hodnoty skupiny

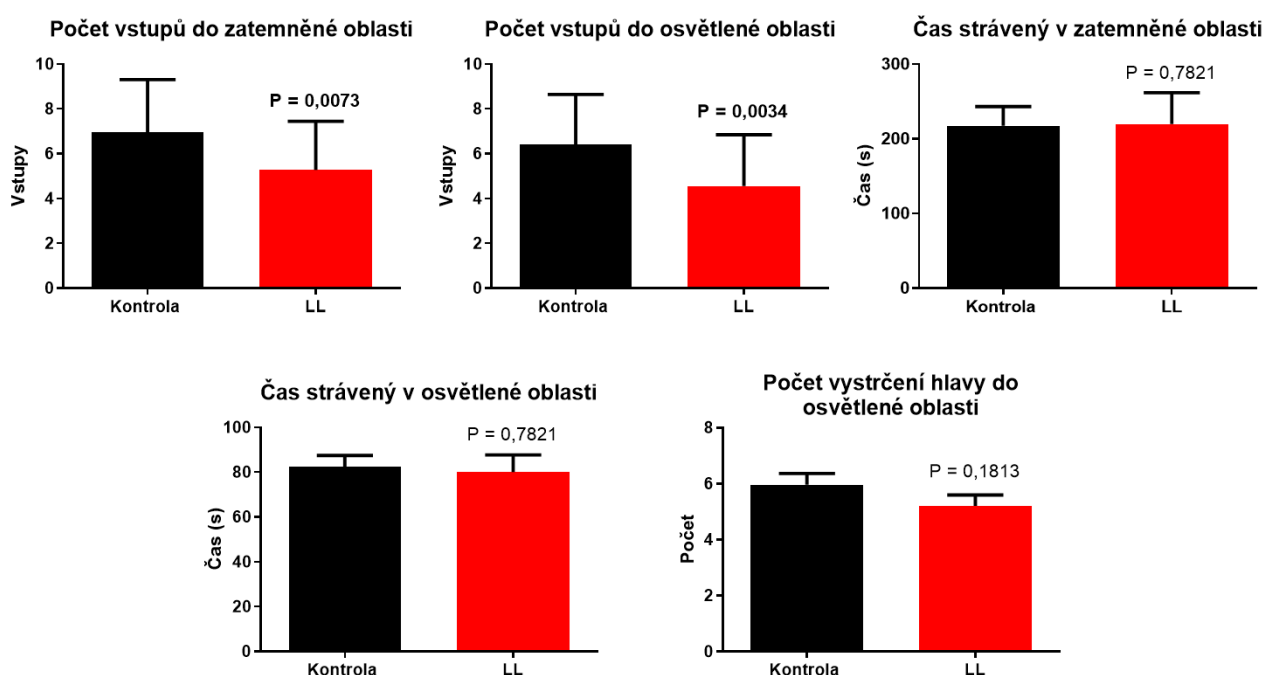
kontrolních a LL zvířat signifikantně lišily pouze v 1 z 6 sledovaných parametrů (obr. č. 8). Vyhodnocení výsledků odhalilo signifikantně nižší uraženou vzdálenost v uzavřené oblasti u LL skupiny zvířat ($P = 0,0456$), ale nikoliv ve vzdálenosti uražené v otevřených ramenech ($P = 0,5878$). Rovněž rozdíly mezi skupinami v počtu vstupů do uzavřené oblasti ($P = 0,4102$), celkovém čase stráveném v uzavřené oblasti ($P = 0,6220$), nejdelší návštěvě uzavřené oblasti ($P = 0,8792$) a ani době od začátku testu do prvního vstupu do uzavřené oblasti ($P = 0,7835$) nebyly signifikantní.



Obrázek č. 8: Porovnání výsledků testu vyvýšeného kruhového bludiště mezi kontrolní a LL skupinou zvířat. Grafy ukazují průměr hodnot \pm střední chyba průměru SEM. Každý z grafů obsahuje hodnotu P, udávající významnost rozdílu hodnot mezi oběma skupinami determinovanou pomocí nepárového t-testu s Welchovou korekcí. Rozdíl mezi skupinami byl považován za signifikantní pokud platilo $P < 0,05$ (hodnota v grafu označena tučně). Grafy znázorňují počet vstupů a čas strávený v uzavřených ramenech aparatury. Dále byla měřena nejdelší návštěva uzavřené oblasti, doba do prvního vstupu do uzavřené části aparatury, celková uražená dráha v uzavřených a otevřených oblastech. Signifikantní rozdíl mezi skupinami byl nalezen v uražené dráze v uzavřené oblasti.

5.1.3. Výsledky testu light/dark box

Tento test analyzuje míru úzkostného chování porovnáním času stráveného v otevřené, osvětlené oblasti a uzavřené, zatemněné oblasti aparatury a počtu průchodů mezi oblastmi. V tomto testu není možné monitorovat uraženou dráhu zvířete, z důvodu zastřešení uzavřené oblasti aparatury. Zvíře se zvýšenými projevy úzkostného chování stráví v uzavřené zatemněné části aparatury delší dobu než zvířata zdravá. Úzkostná zvířata také mají tendenci méně prozkoumávat nové prostředí, což se projevuje nižším počtem přechodů mezi oblastmi nebo nižší frekvencí vystrkování hlavy do osvětlené oblasti. V testu light/dark box byl po vyhodnocení výsledků determinován signifikantní rozdíl v chování kontrolní a LL skupiny zvířat ve 2 z 5 zkoumaných parametrů (obr. č. 9). Zvířata LL skupiny přecházela ze světlé části do zatemněné oblasti ($P = 0,0073$) a naopak ($P = 0,0034$) s mnohem nižší frekvencí než kontroly. Celkový čas, který v otevřené ($P = 0,7821$) a uzavřené oblasti ($P = 0,7821$) strávila, se však mezi skupinami signifikantně nelišil. Rovněž bylo zaznamenáno, kdy zvíře vykuklo otvorem propojujícím částí aparatury, ze zatemněné do osvětlené oblasti, ale nevstoupilo do něj. Pokud zvíře vykročilo do světelné oblasti oběma předními končetinami, byl pohyb vyhodnocen jako vstup do osvětlené oblasti. Tyto hodnoty se opět mezi skupinami signifikantně nelišily ($P = 0,1813$).



Obrázek č. 9: Porovnání výsledků testu light/dark box mezi kontrolní a LL skupinou zvířat. Grafy ukazují průměr hodnot \pm střední chyba průměru SEM. Každý z grafů obsahuje hodnotu P, udávající významnost rozdílu hodnot mezi oběma skupinami determinovanou pomocí nepárového t-testu s Welchovou korekcí. Rozdíl mezi skupinami byl považován za signifikantní pokud platilo

$P < 0,05$ (hodnota v grafu označena tučně). Grafy znázorňují počet vstupů do zatemněné a osvětlené oblasti, čas strávený v zatemněné a osvětlené oblasti a počet vystření pouze hlavy do osvětlené oblasti. Signifikantní rozdíl mezi skupinami byl nalezen v počtu vstupů do zatemněné i osvětlené oblasti.

5.2. VÝSLEDKY MĚŘENÍ CIRKADIÁNNÍCH RYTMŮ EXPRESE

5.2.1. Prokázání rytmicity genové exprese a parametry kosinorové analýzy

Odmítnutím nulové hypotézy (H_0) kosinorovou analýzou a potvrzením odlišnosti hodnot v jednotlivých časech jednocestnou ANOVou byl prokázován rytmus v expresi v jednotlivých genech ve všech strukturách a u obou skupin. Kosinorovou analýzou byly poté vypočítány hodnoty mesoru, amplitudy a akrofáze rytmu a srovnány mezi skupinami téže analýzou (Tab. č. 2a, 2b). Pokud platilo $P < 0,05$, hodnota byla v tabulce označena tučně. Pokud v některé ze skupin nebyl nalezen signifikantní rytmus exprese, hodnoty mesoru, amplitudy a akrofáze nemohly být vypočítány a srovnány s druhou skupinou.

Tabulka č. 2a: Hodnoty mesoru, amplitudy a akrofáze prokázaných rytmů zkoumaných genů ve frontálním a parietálním kortexu, čichovém laloku a hipokampu získané kosinorovou analýzou kontrolních a LL skupin zvířat. Mesor (průměrná hodnota rytmu) a amplituda rytmu uvedeny v hodnotách relativní hladiny mRNA. Akrofáze (doba maximální hodnoty rytmu) je stanovena v hodinách cirkadiánního času CT. Hodnoty se signifikantním rozdílem mezi skupinami ($P < 0,05$) jsou v tabulce označeny tučně.

		Frontální kortex			Parietální kortex			Čichový lalok			Hipokampus		
		Kontrola	LL	P =	Kontrola	LL	P =	Kontrola	LL	P =	Kontrola	LL	P =
Per2	mesor	1,250	1,138	0,415	0,514	0,557	0,225	0,410	0,426	0,661	0,631	0,691	0,084
	amplituda	0,301	0,680	0,051	0,200	0,251	0,337	0,219	0,303	0,090	0,103	0,037	0,157
	akrofáze	17,050	16,190	0,661	18,270	18,800	0,515	15,180	14,820	0,676	4,361	1,500	0,480
Nr1d1	mesor	0,990	0,825	0,037	0,791	0,973	0,003	0,480	0,462	0,586	0,661	0,752	0,004
	amplituda	0,616	0,451	0,150	0,346	0,495	0,098	0,224	0,164	0,225	0,290	0,185	0,018
	akrofáze	7,894	10,380	0,002	6,032	7,141	0,134	8,355	9,905	0,085	4,527	5,564	0,166
Stat3	mesor	0,685	NENÍ	NENÍ	0,816	NENÍ	NENÍ	0,968	NENÍ	NENÍ	0,674	0,738	0,012
	amplituda	0,172	RYTMUS	RYTMUS	0,183	RYTMUS	RYTMUS	0,096	RYTMUS	RYTMUS	0,132	0,069	0,063
	akrofáze	4,217			0,983			9,016			3,210	0,755	0,161
BDNF	mesor	0,635	0,605	0,558	NENÍ	0,715	NENÍ	NENÍ	0,509	NENÍ	0,605	0,699	0,010
	amplituda	0,149	0,142	0,924	RYTMUS	0,147	RYTMUS	RYTMUS	0,225	RYTMUS	0,122	0,112	0,850
	akrofáze	1,936	22,748	0,113		21,480			16,460		4,768	4,030	0,659
Grin1	mesor	0,807	0,892	0,208	NENÍ	0,650	NENÍ	NENÍ	NENÍ	NENÍ	0,745	NENÍ	NENÍ
	amplituda	0,153	0,263	0,232	RYTMUS	0,109	RYTMUS	RYTMUS	RYTMUS	RYTMUS	0,123	RYTMUS	RYTMUS
	akrofáze	5,396	3,172	0,285		3,115					2,989		
Grin2a	mesor	0,881	NENÍ	NENÍ	NENÍ	0,922	NENÍ	NENÍ	NENÍ	NENÍ	0,694	0,782	0,005
	amplituda	0,305	RYTMUS	RYTMUS	RYTMUS	0,227	RYTMUS	RYTMUS	RYTMUS	RYTMUS	0,130	0,069	0,134
	akrofáze	5,567				2,570					3,544	1,957	0,441
Grin2b	mesor	0,818	0,844	0,595	NENÍ	0,846	NENÍ	NENÍ	NENÍ	NENÍ	0,679	NENÍ	NENÍ
	amplituda	0,143	0,185	0,496	RYTMUS	0,292	RYTMUS	RYTMUS	RYTMUS	RYTMUS	0,141	RYTMUS	RYTMUS
	akrofáze	5,852	4,967	0,544		4,660					3,578		

Tabulka č. 2b: Hodnoty mesoru, amplitudy a akrofáze prokázaných rytmů zkoumaných genů v SCN a sítnici získané kosinorovou analýzou kontrolních a LL skupin zvířat. Mesor (průměrná hodnota rytmu) a amplituda rytmu uvedeny v hodnotách relativní hladiny mRNA. Akrofáze (doba maximální hodnoty rytmu) je stanovena v hodinách cirkadiálního času CT. Hodnoty se signifikantním rozdílem mezi skupinami ($P < 0,05$) jsou v tabulce označeny tučně. V případě genu *Grin2a* byla v SCN přístrojem LightCycler ve vzorcích detekována nulová exprese tohoto genu. Tento fakt je v tabulce znázorněn uhlopříčně proškrtnutým polem výsledků. Pokud ve struktuře detekce některého z genů neprobíhala, pole výsledků je ponecháno prázdné.

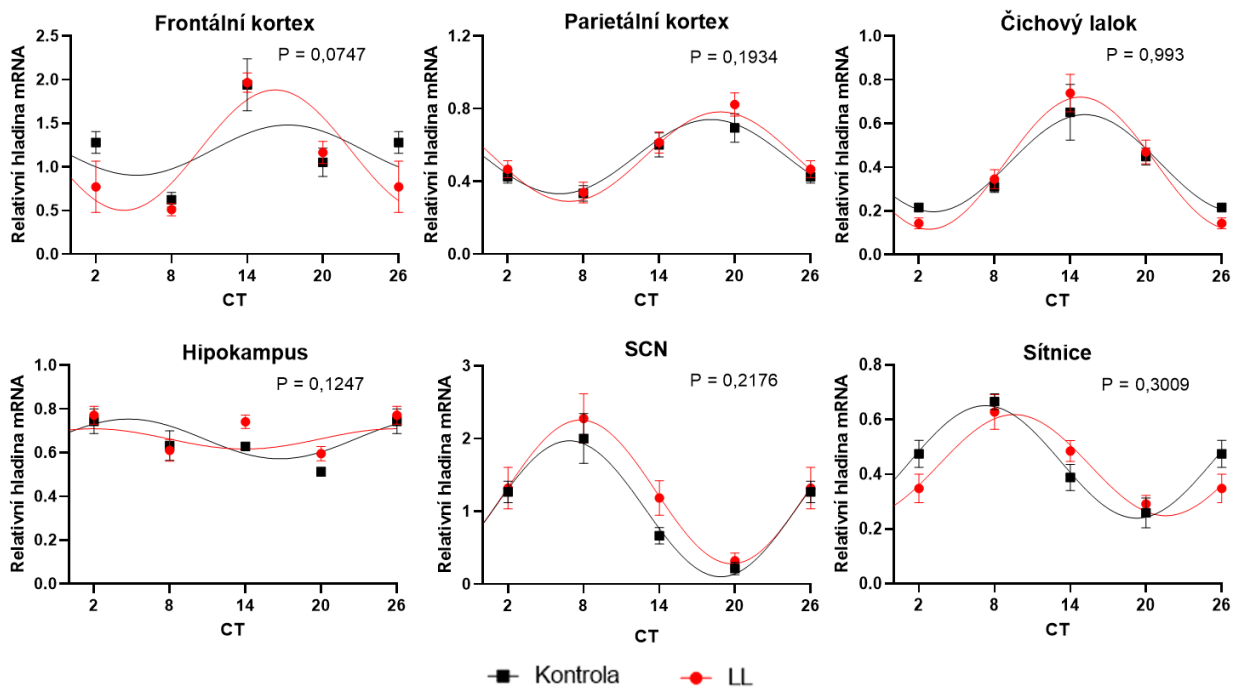
		SCN			Sítnice					Sítnice		
		Kontrola	LL	P =	Kontrola	LL	P =			Kontrola	LL	P =
Per2	mesor	1,036	1,268	0,157	0,445	0,434	0,703	Per1	mesor	0,530	0,492	0,256
	amplituda	0,934	0,987	0,831	0,206	0,185	0,662		amplituda	0,170	0,120	0,308
	akrofáze	6,871	7,759	0,293	7,271	9,551	0,006		akrofáze	10,510	10,080	0,733
Nr1d1	mesor	1,147	1,096	0,742	0,509	0,500	0,778	AANAT	mesor	0,348	0,399	0,155
	amplituda	0,652	0,679	0,893	0,166	0,148	0,717		amplituda	0,206	0,291	0,082
	akrofáze	3,565	1,983	0,261	6,863	9,239	0,029		akrofáze	16,330	15,810	0,541
Stat3	mesor	1,086	1,410	0,066				Opn4	mesor	0,551	0,508	0,146
	amplituda	0,480	0,809	0,209					amplituda	0,181	0,205	0,560
	akrofáze	5,219	8,717	0,030					akrofáze	10,110	11,410	0,119
BDNF	mesor		1,079	NENÍ		0,465	NENÍ	Opn5	mesor			
	amplituda	NENÍ	0,465	NENÍ	NENÍ	0,119	NENÍ		amplituda	NENÍ	NENÍ	NENÍ
	akrofáze	RYTMUS	8,965	RYTMUS	RYTMUS	1,869	RYTMUS		akrofáze	RYTMUS	RYTMUS	RYTMUS
Grin1	mesor	1,197						Opn1sw	mesor	0,491		
	amplituda	0,623	NENÍ	NENÍ					amplituda	0,116	NENÍ	NENÍ
	akrofáze	6,866	RYTMUS	RYTMUS					akrofáze	6,446	RYTMUS	RYTMUS
Grin2a	mesor	/						Rho	mesor	0,666	0,593	0,051
	amplituda	/							amplituda	0,099	0,148	0,373
	akrofáze	/							akrofáze	8,745	10,700	0,251
Grin2b	mesor	0,949										
	amplituda	0,494	NENÍ	NENÍ								
	akrofáze	3,674	RYTMUS	RYTMUS								

5.2.2 Exprese genu *Per2*

Expres hodnového genu *Per2* byla měřena ve strukturách frontálního a parietálního kortexu, čichovém laloku, hipokampu, SCN a sítnici (obr. č. 10). Jednocestná ANOVA i kosinorová analýza prokázaly rytmicitu exprese v tomto genu u všech zkoumaných struktur a skupin. Dvoucestná ANOVA nedetekovala signifikantní rozdíl v relativních hladinách mRNA mezi kontrolní a LL skupinou v žádné z těchto struktur. Srovnání hodnot mesoru, amplitudy a akrofáze ukázalo signifikantní zpoždění akrofáze LL skupiny oproti kontrolám v sítnici oka (Tab. č. 2b).

Jednocestná ANOVA potvrdila přítomnost rytmické exprese *Per2* u kontrolní ($P = 0,0003$; $F(4, 27) = 7,779$) i LL ($P < 0,0001$; $F(4, 27) = 13,43$) skupiny zvířat v oblasti frontálního kortexu. Kosinorová analýza odmítla H_0 s pravděpodobností $P = 0,0417$ pro kontrolní skupinu a $P < 0,0001$ pro LL skupinu. I přes drobné odchylky v amplitudě či akrofázi kosinorových křivek, nedosahoval

rozdíl mezi skupinami v žádném z případů signifikantní hodnoty P. Test dvoucestná ANOVA potvrdil nesignifikantní rozdíl mezi skupinami ve frontálním kortexu ($P = 0,0747$; $F(1, 54) = 3,303$). V parietálním kortexu jednocestná ANOVA prokázala rytmickou expresi *Per2* u kontrol ($P = 0,0003$; $F(4, 29) = 7,472$) i u LL zvířat ($P < 0,0001$; $F(4, 31) = 10,43$). Kosinorová analýza odmítla H_0 s pravděpodobností $P < 0,0001$ pro kontrolní skupinu a $P < 0,0001$ pro LL skupinu. Dvoucestná ANOVA stanovila rozdíl skupin v parietálním kortexu jako nesignifikantní ($P = 0,1934$; $F(1, 60) = 1,730$). Rytmus *Per2* v čichovém laloku byl opět prokázán testem jednocestná ANOVA v obou skupinách zvířat kontrol ($P < 0,0001$; $F(4, 28) = 10,51$) a LL skupině zvířat ($P < 0,0001$; $F(4, 27) = 17,43$). Kosinorová analýza odmítla H_0 s pravděpodobností $P < 0,0001$ pro kontrolní skupinu a $P < 0,0001$ pro LL skupinu. Dvoucestná ANOVA determinovala v čichovém laloku opět nesignifikantní rozdíl mezi skupinami ($P = 0,9930$; $F(1, 55) = 7,718e-005$). Rytmičká exprese *Per2* v hipokampu byla potvrzena jednocestnou ANOVou ve skupině kontrol ($P = 0,0152$; $F(4, 28) = 3,711$) i LL zvířat ($P = 0,0057$; $F(4, 30) = 4,514$). Kosinorová analýza odmítla H_0 s pravděpodobností $P = 0,0233$ pro kontrolní skupinu a $P = 0,0457$ pro LL skupinu. V hipokampu opět nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi skupinami ($P = 0,1247$; $F(1, 58) = 2,427$). Rytmus *Per2* v SCN byl nalezen v obou skupinách kontrol (jednocestná ANOVA: $P < 0,0001$; $F(4, 26) = 11,80$; kosinorová analýza: $P < 0,0001$) a LL zvířat (jednocestná ANOVA: $P = 0,0041$; $F(4, 27) = 4,918$; kosinorová analýza: $P = 0,0004$). V SCN test dvoucestná ANOVA nenalezl signifikantní rozdíl mezi skupinami ($P = 0,2176$; $F(1, 19) = 1,220$). Test jednocestná ANOVA v sítnici potvrdil rytmicitu exprese u skupiny kontrolních ($P < 0,0001$; $F(4, 28) = 11,74$) i LL zvířat ($P = 0,0005$; $F(4, 29) = 6,929$). Kosinorová analýza odmítla H_0 s pravděpodobností $P < 0,0001$ pro kontrolní skupinu a $P < 0,0001$ pro LL skupinu. Rozdíl mezi skupinami zde, podobně jako u ostatních struktur nedosahoval požadované signifikantní hodnoty ($P = 0,3009$; $F(1, 56) = 1,090$). Kosinorová analýza ale v sítnici detekovala signifikantní zpoždění akrofáze LL skupiny o přibližně 2 hodiny a 20 minut (Tab. č. 2b).



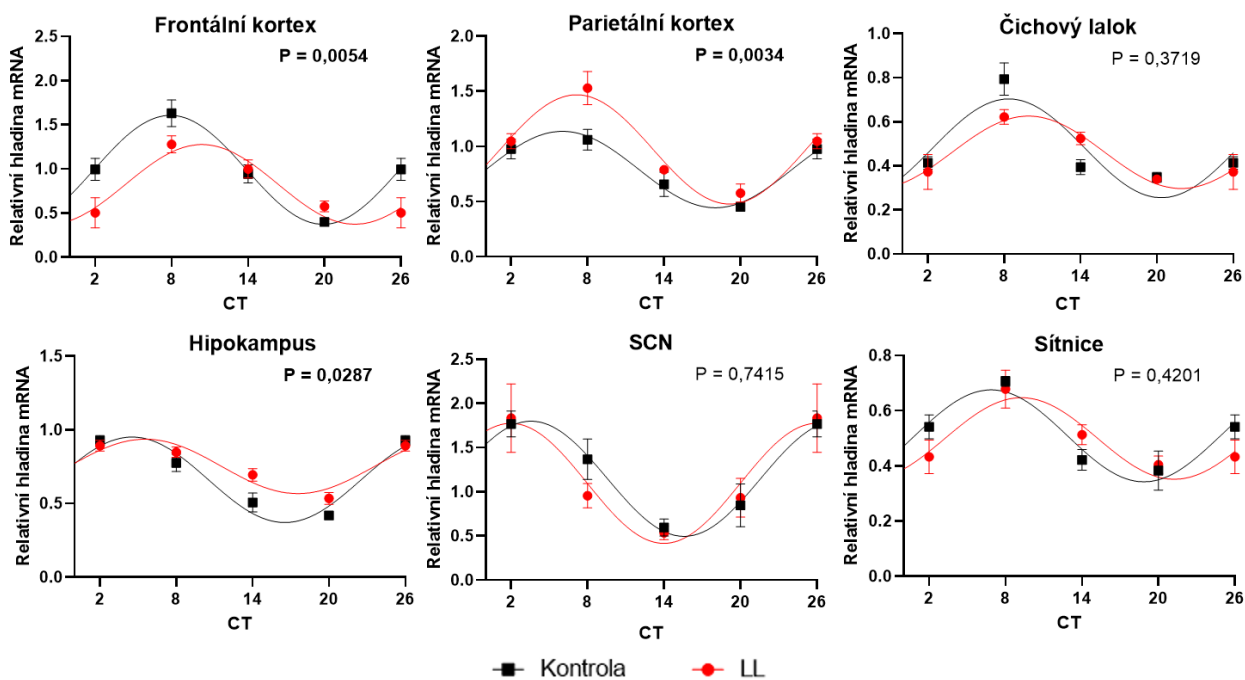
Obrázek č. 10: Grafy rytmu exprese *Per2*. Grafy znázorňují kosinorovou křivku pro každou ze skupin, proloženou průměry relativních hladin mRNA genu *Per2* ± SEM v cirkadiálním čase 2, 8, 14, 20 a 26 (hodnoty v CT2 a CT26 jsou identické, hodnota v CT26 byla přidána pro lepší konstrukci grafů). Všechny grafy zahrnují hodnoty obou pohlaví a hodnoty kontrolní skupiny jsou vždy znázorněny černě a LL skupina červeně. Do grafů byla vložena hodnota P určená testem dvoucestná ANOVA, udávající míru rozdílu mezi všemi hodnotami obou skupin. Signifikantního rozdílu ($P < 0,05$) nedosahovala exprese *Per2* v žádné ze zkoumaných struktur.

5.2.3. Exprese genu *Nr1d1*

Expres hodiny genu *Nr1d1* byla měřena ve strukturách frontálního a parietálního kortexu, čichovém laloku, hipokampu, SCN a v sítnici (obr. č. 11). Kosinorová analýza a jednocestná ANOVA potvrdily ve všech strukturách signifikantní rytmus exprese bez výjimky. Dvoucestná ANOVA detekovala signifikantní rozdíl v hladinách mRNA mezi kontrolní a LL skupinou zvířat ve struktuře frontálního kortexu, parietálního kortexu a hipokampu. Kosinorová analýza detekovala signifikantní rozdíl v mesoru a akrofázi rytmů frontálního kortexu, mesoru parietálního kortexu, v mesoru a amplitudě hipokampu a v akrofázi rytmu v sítnici (Tab. č. 2a, 2b).

Rytmická exprese byla ve frontálním kortexu nalezena u skupiny kontrol (jednocestná ANOVA: $P < 0,0001$; $F(4, 29) = 11,36$; kosinorová analýza: $P < 0,0001$) i LL zvířat (jednocestná ANOVA: $P < 0,0001$; $F(4, 29) = 9,907$; kosinorová analýza: $P < 0,0001$). Ve frontálním kortexu odhalila kosinorová analýza u skupiny LL signifikantní snížení mesoru a opoždění akrofáze rytmu

o přibližně 2 hodiny a 30 minut ve srovnání s kontrolami (Tab. č. 2a). Test dvoucestná ANOVA potvrdil, že se exprese ve skupinách kontrol a LL frontálního kortexu signifikantně lišila ($P = 0,0054$; $F(1, 58) = 8,350$). Rytmičké exprese byla v parietálním kortexu potvrzena jak u kontrolní (jednocestná ANOVA: $P < 0,0001$; $F(4, 29) = 15,29$; kosinorová analýza: $P < 0,0001$) = 15,29), tak i u LL skupiny (jednocestná ANOVA: $P < 0,0001$; $F(4, 29) = 15,29$; kosinorová analýza: $P < 0,0001$). V rytmu exprese v parietálním kortexu byl kosinovou analýzou detekován signifikantně zvýšený mesor u LL skupiny zvířat (Tab. č. 2a). Rozdíl mezi hodnotami skupin byl v parietálním kortexu testem dvoucestná ANOVA vyhodnocen jako signifikantní ($P = 0,0034$; $F(1, 57) = 9,370$). Rytmus exprese byl v čichovém laloku opět přítomen u obou skupin kontrol (jednocestná ANOVA: $P < 0,0001$; $F(4, 29) = 18,97$; kosinorová analýza: $P < 0,0001$) a LL zvířat (jednocestná ANOVA: $P = 0,0010$; $F(4, 29) = 6,201$; kosinorová analýza: $P < 0,0001$). V čichovém laloku kosinorová analýza neodhalila signifikantní rozdíl v žádném ze zkoumaných parametrů a test dvoucestná ANOVA rovněž determinoval rozdíl mezi skupinami jako nesignifikantní ($P = 0,3719$; $F(1, 58) = 0,8099$). Jednocestná ANOVA v hipokampu u skupin kontrol ($P < 0,0001$; $F(4, 27) = 26,00$) i LL zvířat ($P < 0,0001$; $F(4, 31) = 14,41$) našla signifikantní rozdíl mezi hodnotami CT, a potvrdila tím tak přítomnost rytmu v expresi *Nr1dl*. Kosinorová analýza odmítla H_0 s pravděpodobností $P < 0,0001$ pro kontrolní skupinu a $P < 0,0001$ pro LL skupinu. V hipokampu kosinorová analýza odhalila signifikantní snížení amplitudy a zvýšení mesoru rytmu LL skupiny v porovnání s kontrolní skupinou (Tab. č. 2a). Rozdíl mezi skupinami v hipokampu byl vyhodnocen jako signifikantní ($P = 0,0287$; $F(1, 58) = 5,035$). Exprese *Nr1dl* v SCN kontrolní skupině ($P = 0,0003$; $F(4, 27) = 7,540$) i skupině LL zvířat ($P = 0,0072$; $F(4, 27) = 4,402$) byla v SCN testem jednocestná ANOVA určena jako rytmická se signifikantními rozdíly mezi CT. Kosinorová analýza odmítla H_0 s pravděpodobností $P < 0,0001$ pro kontrolní skupinu a $P = 0,001$ pro LL skupinu. Rozdíl v hladinách mRNA mezi skupinami v SCN nebyl signifikantní ($P = 0,7415$; $F(1, 54) = 0,1099$). V sítnici jednocestná ANOVA potvrdila rytmicitu exprese *Nr1dl* u kontrolní ($P < 0,0001$; $F(4, 30) = 8,740$) i LL skupiny ($P = 0,0113$; $F(4, 29) = 3,940$). Kosinorová analýza odmítla H_0 s pravděpodobností $P = 0,0001$ pro kontrolní skupinu a $P = 0,0022$ pro LL skupinu. Stejně jako v případě *Per2* i zde byla odhaleno signifikantní zpoždění akrofáze rytmu exprese, zde o přibližně 2 hodiny a 30 minut (Tab. č. 2b). Dvoucestná ANOVA určila rozdíl mezi skupinami v sítnici jako nesignifikantní ($P = 0,4201$; $F(1, 58) = 0,6595$).



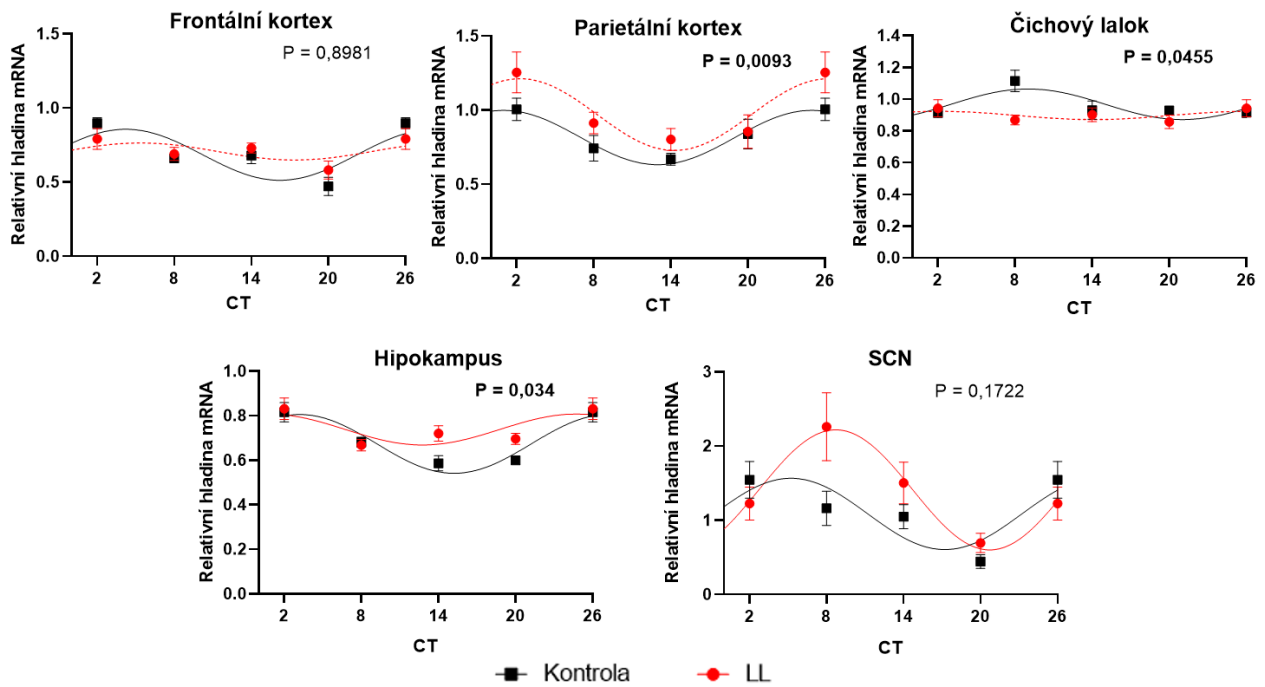
Obrázek č. 11: Grafy rytmu exprese *Nr1d1*. Grafy znázorňují kosinorovou křivku pro každou ze skupin, proloženou průměry relativních hladin mRNA genu *Nr1d1* ± SEM v cirkadiánním čase 2, 8, 14, 20 a 26 (hodnoty v CT2 a CT26 jsou identické, hodnota v CT26 byla přidána pro lepší konstrukci grafů). Všechny grafy zahrnují hodnoty obou pohlaví a hodnoty kontrolní skupiny jsou vždy znázorněny černě a LL skupina červeně. Do grafů byla vložena hodnota P určená testem dvoucestná ANOVA, udávající míru rozdílu mezi všemi hodnotami obou skupin. Signifikantní rozdíl ($P < 0,05$) byl nalezen a tučně označen ve strukturách frontálního kortexu, parietálního kortexu a hipokampu.

5.2.4. Exprese genu *Stat3*

Exprese genu *Stat3* byla měřena ve strukturách frontálního a parietálního kortexu, čichovém laloku, hipokampu a SCN (obr. č. 12). V sítnici detekce exprese genu *Stat3* neproběhla z technických důvodů. Kosinorová analýza a jednocestná ANOVA prokázala ve strukturách obou skupin signifikantní rytmus exprese s výjimkou frontálního kortexu, parietálního kortexu a čichového laloku LL skupiny. Dvoucestná ANOVA detekovala signifikantní rozdíl v hladinách mRNA mezi kontrolní a LL skupinou ve struktuře parietálního kortexu, čichového laloku a hipokampu. Kosinorová analýza odhalila v hipokampu signifikantní zvýšení mezoru LL skupiny a v SCN zpoždění akrofáze rytmu LL skupiny (Tab. č. 2a, 2b).

Rytmicita exprese byla testem jednocestná ANOVA zamítnuta ve frontálním kortexu LL skupiny zvířat ($P = 0,5472$; $F(4, 28) = 0,7808$), na rozdíl od kontrolní skupiny ($P < 0,0001$; $F(4,$

27) = 17,00). Kvůli rytmické expresi pouze u jedné ze skupin, nemohly být kosinorovou analýzou zjištěny hodnoty mesoru, amplitudy a akrofáze a posouzen jejich rozdíl mezi oběma skupinami. Kosinorová analýza odmítla H_0 s pravděpodobností $P = 0,0006$ pouze u kontrolní skupiny, ale u LL skupiny s pravděpodobností $P = 0,3111$ nikoliv. Rozdíl mezi skupinami byl testem dvoucestná ANOVA ve frontálním kortexu vyhodnocen jako nesignifikantní ($P = 0,8981$; $F(1, 54) = 0,01655$). Jednocestná ANOVA v parietálním kortexu LL skupiny nepotvrdila signifikantní rytmus v expresi *Stat3* ($P = 0,0646$; $F(4, 26) = 2,530$), zatímco v kontrolní skupině byl rytmus prokázán ($P = 0,0189$; $F(4, 29) = 3,500$). Kosinorová analýza odmítla H_0 s pravděpodobností $P = 0,0027$ pro kontrolní skupinu a $P = 0,0024$ pro LL skupinu. Dvoucestná ANOVA našla signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami v této struktuře ($P = 0,0093$; $F(1, 60) = 7,233$). V čichovém laloku jednocestná ANOVA prokázala rytmickou expresi pouze u kontrolní skupiny ($P = 0,0151$; $F(4, 29) = 3,688$) a u LL skupiny zvířat nikoliv ($P = 0,5617$; $F(4, 29) = 0,7569$). Kosinorová analýza odmítla H_0 s pravděpodobností $P = 0,023$ pouze u kontrolní skupiny, a nikoliv u LL skupiny s pravděpodobností $P = 0,6189$. Dvoucestná ANOVA potvrdila signifikantní rozdíl v čichovém laloku mezi kontrolní a LL skupinou ($P = 0,0455$; $F(1, 58) = 4,179$). V hipokampu byl detekován zvýšený mesor u LL skupiny (Tab. č. 2a) a signifikantní rytmická exprese u kontrolní (jednocestná ANOVA: $P < 0,0001$; $F(4, 29) = 10,77$; kosinorová analýza: $P < 0,0001$) i LL skupiny zvířat (jednocestná ANOVA: $P = 0,0088$; $F(4, 31) = 4,097$; kosinorová analýza: $P = 0,0258$). Rytmy obou skupin se v hipokampu od sebe signifikantně lišily ($P = 0,0340$; $F(1, 60) = 4,707$). Kosinorová analýza v SCN odhalila u LL skupiny výrazné zpoždění akrofáze o přibližně 3 hodiny a 30 minut (Tab. č. 2b). Signifikantní rozdíl mezi hodnotami pro různá CT byl přítomen u kontrolní ($P = 0,0049$; $F(4, 25) = 4,853$) i LL skupiny ($P = 0,0230$; $F(4, 26) = 3,399$) a přítomnost rytmu exprese tedy byla potvrzena. Kosinorová analýza odmítla H_0 s pravděpodobností $P = 0,0102$ pro kontrolní skupinu a $P = 0,003$ pro LL skupinu. Rozdíl mezi hodnotami obou skupin byl v SCN i přes zpoždění fáze rytmu označen jako nesignifikantní ($P = 0,1722$; $F(1, 51) = 1,917$).



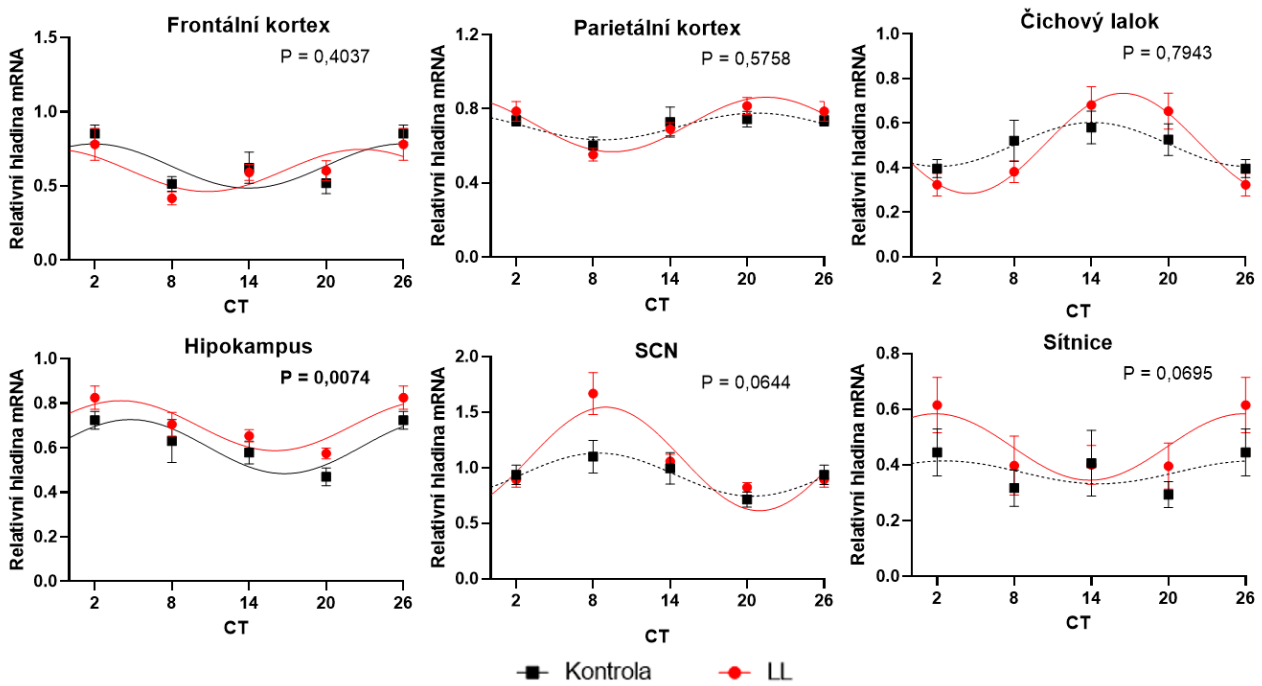
Obrázek č. 12: Grafy rytmu exprese *Stat3*. Grafy znázorňují kosinorovou křivku pro každou ze skupin, proloženou průměry relativních hladin mRNA genu *Stat3* \pm SEM v cirkadiálním čase 2, 8, 14, 20 a 26 (hodnoty v CT2 a CT26 jsou identické, hodnota v CT26 byla přidána pro lepší konstrukci grafů). Všechny grafy zahrnují hodnoty obou pohlaví a hodnoty kontrolní skupiny jsou vždy znázorněny černě a LL skupina červeně. Pokud byla statistickými testy zamítnuta rytmicita exprese, příslušná sinusoida je v grafu znázorněna přerušovaně. Do grafů byla vložena hodnota P určená testem dvoucestná ANOVA, udávající míru rozdílu mezi všemi hodnotami obou skupin. Signifikantní rozdíl ($P < 0,05$) byl nalezen a tučně označen ve strukturách parietálního kortexu, čichového laloku a hipokampu.

5.2.5. Exprese genu *BDNF*

Expresse genu *BDNF* byla studována ve strukturách frontálního a parietálního kortexu, čichovém laloku, hipokampu, SCN a v sítnici (obr. č. 13). Kosinorová analýza a jednocestná ANOVA zamítly rytmicitu exprese u kontrol v parietálním kortexu, čichovém laloku, SCN a sítnici. Dvoucestná ANOVA detekovala signifikantní rozdíl v hladinách mRNA mezi kontrolní a LL skupinou ve struktuře hipokampu. Kosinorová analýza odhalila v hipokampu signifikantní zvýšení mesoru u LL skupiny zvířat (Tab. č. 2a).

Ve frontálním kortexu byl prokázán signifikantní rytmus exprese u kontrolní (jednocestná ANOVA: $P = 0,0420$; $F(4, 29) = 2,841$; kosinorová analýza: $P = 0,0206$) i LL skupiny (jednocestná ANOVA: $P = 0,0011$; $F(4, 24) = 6,445$; kosinorová analýza: $P = 0,0224$). Dvoucestná ANOVA

nešla ve frontálním kortexu signifikantní rozdíl v expresi genu *BDNF* mezi oběma skupinami ($P = 0,4037$; $F(1, 52) = 0,7089$). V parietálním kortexu byl detekován signifikantní rytmus exprese *BDNF* pouze u LL zvířat (jednocestná ANOVA: $P = 0,0023$; $F(4, 31) = 5,298$; kosinorová analýza: $P = 0,0001$), zatímco u kontrol nebyl prokázán (jednocestná ANOVA: $P = 0,1292$; $F(4, 29) = 1,948$; kosinorová analýza: $P = 0,1052$). Rozdíl mezi skupinami zvířat v parietálním kortexu byl určen testem dvoucestná ANOVA jako nesignifikantní ($P = 0,5758$; $F(1, 57) = 0,3168$). V čichovém laloku byl rovněž detekován signifikantní rytmus exprese pouze v LL skupině zvířat (jednocestná ANOVA: $P = 0,0006$; $F(4, 27) = 6,811$; kosinorová analýza: $P < 0,0001$), ale v kontrolní skupině nikoliv (jednocestná ANOVA: $P = 0,2184$; $F(4, 29) = 1,534$; kosinorová analýza: $P = 0,0604$). Rozdíl mezi hodnotami obou skupin v čichovém laloku nebyl signifikantní ($P = 0,7943$; $F(1, 56) = 0,06866$). V hipokampu kosinorová analýza odhalila zvýšený mesor rytmu exprese *BDNF* u LL skupiny bez výrazné změny amplitudy či akrofáze (Tab. č. 2a). Signifikantní rytmická exprese byla v hipokampu pozorována u kontrolní (jednocestná ANOVA: $P = 0,0207$; $F(4, 29) = 3,423$; kosinorová analýza: $P = 0,0137$) i LL skupiny (jednocestná ANOVA: $P = 0,0019$; $F(4, 31) = 5,456$; kosinorová analýza: $P = 0,0023$). Dvoucestná ANOVA vyhodnotila rozdíl mezi rytmy LL a kontrolní skupiny jako signifikantní ($P = 0,0074$; $F(1, 60) = 7,694$). V SCN byl opět detekován signifikantní rytmus exprese *BDNF* pouze v LL skupině zvířat (jednocestná ANOVA: $P < 0,0001$; $F(4, 28) = 10,84$; kosinorová analýza: $P < 0,0001$), a v kontrolní skupině nikoliv (jednocestná ANOVA: $P = 0,1714$; $F(4, 27) = 1,735$; kosinorová analýza: $P = 0,0431$). Dvoucestná ANOVA stanovila rozdíl mezi skupinami v SCN jako nesignifikantní ($P = 0,0644$; $F(1, 55) = 3,562$). V sítnici byla opět (jako u většiny předchozích zkoumaných struktur) detekována signifikantní rytmicitata exprese genu *BDNF* pouze v LL skupině (jednocestná ANOVA: $P = 0,0128$; $F(4, 28) = 3,855$; kosinorová analýza: $P = 0,0094$), a ve skupině kontrol nikoliv (jednocestná ANOVA: $P = 0,5654$; $F(4, 28) = 0,7516$; kosinorová analýza: $P = 0,7218$). Rozdíl skupin určený testem dvoucestná ANOVA v sítnici nedosahoval signifikantní hodnoty ($P = 0,0695$; $F(1, 58) = 3,421$).



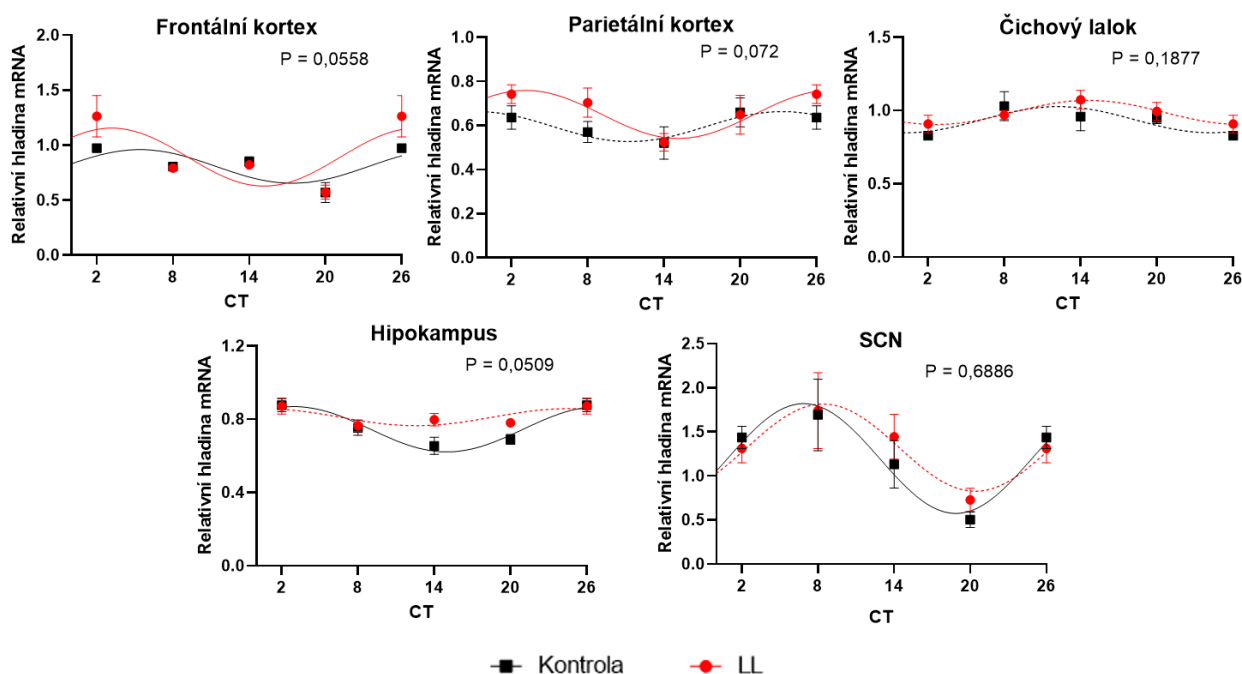
Obrázek č. 13: Grafy rytmu exprese *BDNF*. Grafy znázorňují kosinorovou křivku pro každou ze skupin, proloženou průměry relativních hladin mRNA genu *BDNF* \pm SEM v cirkadiánním čase 2, 8, 14, 20 a 26 (hodnoty v CT2 a CT26 jsou identické, hodnota v CT26 byla přidána pro lepší konstrukci grafů). Na všech grafech je vždy znázorněna kontrolní skupina černě a LL skupina červeně. Pokud byla statisticky zamítnuta rytmicitá exprese, příslušná sinusoida je v grafu znázorněna přerušovanou čarou. Do grafů byla vložena hodnota P určená testem dvoucestná ANOVA, udávající míru rozdílu mezi sadami hodnot obou skupin. Signifikantní rozdíl ($P < 0,05$) byl nalezen a tučně označen v hipokampu.

5.2.6. Exprese genu *Grin1*

Expres genu *Grin1* kódující podjednotku glutamátového NMDA receptoru GluN1, byla měřena ve strukturách frontálního a parietálního kortexu, čichovém laloku, hipokampu a SCN (obr. č. 14). Kosinorová analýza a jednocestná ANOVA nepotvrdily rytmus v expresi u skupiny LL v parietálním kortexu, u obou skupin v čichovém laloku, u LL skupiny v hipokampu a v SCN u LL skupiny. Kosinorová analýza nenašla v žádném z rytmů signifikantní rozdíl v hodnotách mesoru, amplitudy či akrofáze (Tab. č. 2a, 2b). Dvoucestná ANOVA v žádné z těchto struktur nedetekovala signifikantní změny mezi kontrolní a LL skupinou.

Ve frontálním kortexu jednocestná ANOVA prokázala rytmickou expresi genu *Grin1* v kontrolní ($P = 0,0145$; $F(4, 29) = 3,727$) i LL skupině zvířat ($P = 0,0003$; $F(4, 29) = 7,283$). Kosinorová analýza odmítla H_0 s pravděpodobností $P = 0,0059$ pro kontrolní skupinu a $P = 0,0061$

pro LL skupinu. Rozdíl mezi skupinami nedosahoval stanovené hranice ($P = 0,0558$; $F(1, 56) = 3,815$). V parietálním kortexu byla u LL skupiny (jednocestná ANOVA: $P = 0,0454$; $F(4, 31) = 2,754$; kosinorová analýza: $P = 0,0094$) prokázána rytmická exprese. Rytmus kontrolní skupiny v parietálním kortexu nebyl detekován (jednocestná ANOVA: $P = 0,4758$; $F(4, 29) = 0,9017$; kosinorová analýza: $P = 0,2044$). Hodnoty relativní hladiny mRNA genu *Grin1* skupin zvířat LL a kontrol v parietálním kortexu nedosahovaly signifikantního rozdílu mezi sebou ($P = 0,0720$; $F(1, 60) = 3,355$). V čichovém laloku nebyla prokázána rytmická exprese v kontrolní skupině (jednocestná ANOVA: $P = 0,1806$; $F(4, 27) = 1,693$; kosinorová analýza: $P = 0,1318$) ani v LL skupině (jednocestná ANOVA: $P = 0,2123$; $F(4, 29) = 1,557$; kosinorová analýza: $P = 0,0498$). Hodnoty obou skupin se v čichovém laloku od sebe signifikantně nelišily ($P = 0,1877$; $F(1, 56) = 1,779$). V hipokampu byl potvrzen rytmus v expresi *Grin1* pouze u kontrolní skupiny (jednocestná ANOVA: $P = 0,0003$; $F(4, 29) = 7,535$; kosinorová analýza: $P < 0,0001$) a nikoliv u LL zvířat (jednocestná ANOVA: $P = 0,0951$; $F(4, 31) = 2,174$; kosinorová analýza: $P = 0,1303$). Rozdíl mezi oběma skupinami v hipokampu nepřekonal stanovenou hodnotu P pro signifikanci ($P = 0,0509$; $F(1, 59) = 3,971$). Ani v SCN nebyl detekován signifikantní rozdíl mezi skupinami ($P = 0,6886$; $F(1, 53) = 0,1624$). Rytmická exprese *Grin1* byla v SCN prokázána u kontrolní skupiny (jednocestná ANOVA: $P = 0,0154$; $F(4, 27) = 3,726$; kosinorová analýza: $P = 0,0024$), zatímco u LL zvířat nikoliv (jednocestná ANOVA: $P = 0,2042$; $F(4, 26) = 1,600$; kosinorová analýza: $P = 0,0539$).



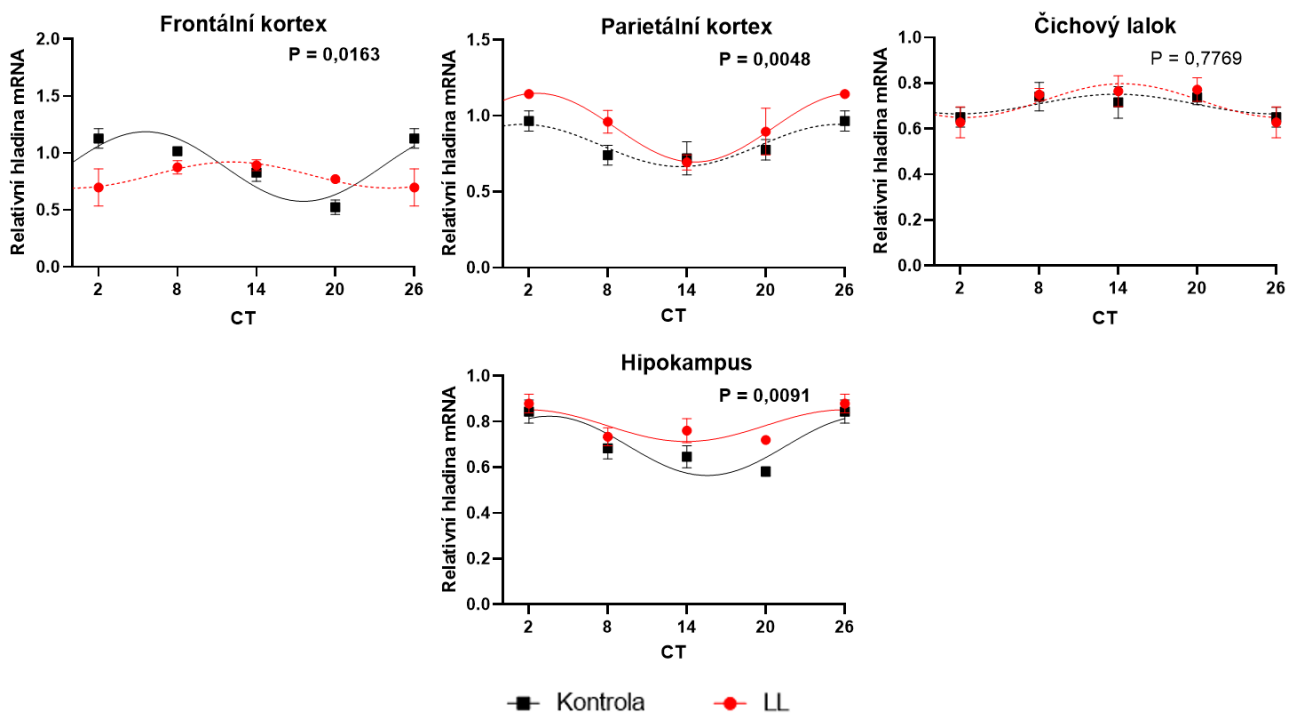
Obrázek č. 14: Grafy rytmu exprese *Grin1*. Grafy znázorňují kosinorovou křivku pro každou ze skupin, proloženou průměry relativních hladin mRNA genu *Grin1* \pm SEM v cirkadiánním čase 2, 8, 14, 20 a 26 (hodnoty v CT2 a CT26 jsou identické, hodnota v CT26 byla přidána pro lepší

konstrukci grafů). Na všech grafech je vždy znázorněna kontrolní skupina černě a LL skupina červeně. Pokud byla statisticky zamítnuta rytmicitá exprese, příslušná sinusoida je v grafu znázorněna přerušovanou čarou. Do grafů byla vložena hodnota P určená testem dvoucestná ANOVA, udávající míru rozdílu mezi sadami hodnot obou skupin. Signifikantní rozdíl ($P < 0,05$) nebyl nalezen ani v jedné ze zkoumaných struktur.

5.2.7. Exprese genu *Grin2a*

Expresse genu *Grin2a* kódující podjednotku glutamátového NMDA receptoru GluN2A byla měřena ve strukturách frontálního a parietálního kortexu, čichovém laloku a hipokampu (obr. č. 15). Jednocestná ANOVA a kosinorová analýza neprokázaly rytmus ve frontálním kortexu LL skupiny, parietálním kortexu kontrolní skupiny a v obou skupinách v čichovém laloku. Kosinorová analýza detekovala signifikantní rozdíl pouze v mesoru rytmů v hipokampu (Tab. č. 2a). Dvoucestná ANOVA prokázala signifikantní rozdíl mezi skupinami kontrol a LL ve strukturách frontálního kortexu, parietálního kortexu a hipokampu.

Ve frontálním kortexu byl prokázán rytmus pouze u kontrolní skupiny (jednocestná ANOVA: $P < 0,0001$; $F(4, 27) = 13,93$; kosinorová analýza: $P < 0,0001$). Kosinorová analýza a jednocestná ANOVA stanovily v LL skupině rytmus exprese *Grin2a* jako nesignifikantní (jednocestná ANOVA: $P = 0,5050$; $F(4, 28) = 0,8512$; kosinorová analýza: $P = 0,1875$). Dvoucestná ANOVA stanovila rozdíl mezi skupinami ve frontálním kortexu jako signifikantní ($P = 0,0163$; $F(1, 55) = 6,145$). V parietálním kortexu byl naopak prokázán rytmus exprese pouze u LL skupiny zvířat (jednocestná ANOVA: $P = 0,0002$; $F(4, 30) = 8,047$; kosinorová analýza: $P < 0,0001$), a u kontrolní skupiny nikoliv (jednocestná ANOVA: $P = 0,0533$; $F(4, 29) = 2,650$; kosinorová analýza: $P = 0,0169$). Rozdíl mezi skupinami v této struktuře byl testem dvoucestná ANOVA determinován jako signifikantní ($P = 0,0048$; $F(1, 59) = 8,570$). V čichovém laloku nebyl prokázán rytmus exprese *Grin2a* v kontrolní (jednocestná ANOVA: $P = 0,5283$; $F(4, 29) = 0,8112$; kosinorová analýza: $P = 0,3909$), ani v LL skupině zvířat (jednocestná ANOVA: $P = 0,2168$; $F(4, 29) = 1,540$; kosinorová analýza: $P = 0,1074$). Rozdíl mezi hodnotami skupin tu rovněž nebyl signifikantní ($P = 0,7769$; $F(1, 58) = 0,08104$). V hipokampu jednocestná ANOVA i kosinorová analýza prokázaly rytmicitu exprese genu *Grin2a* u kontrolní (jednocestná ANOVA: $P = 0,0004$; $F(4, 29) = 7,123$; kosinorová analýza: $P = 0,0007$) i LL skupiny (jednocestná ANOVA: $P = 0,0212$; $F(4, 31) = 3,368$; kosinorová analýza: $P = 0,0396$). Kosinorová analýza určila v této struktuře signifikantní zvýšení mesoru rytmu u LL skupiny zvířat (Tab. č. 2a) a dvoucestná ANOVA stanovila v hipokampu signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami ($P = 0,0091$; $F(1, 60) = 7,273$).

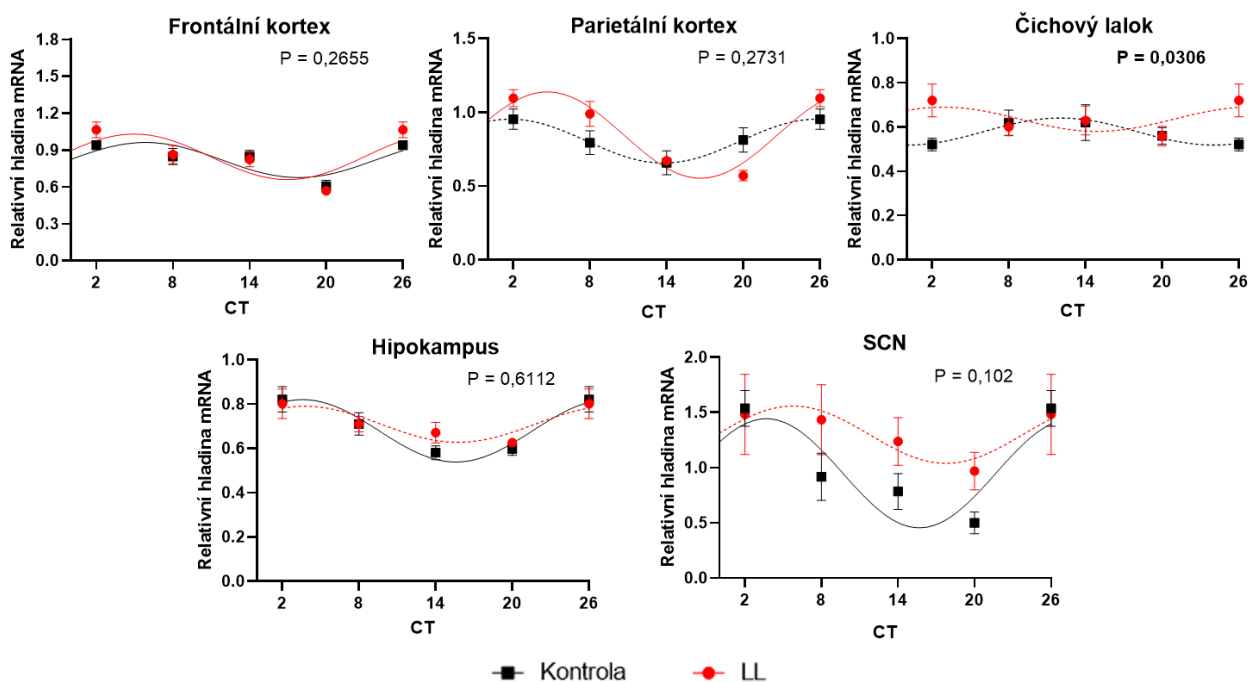


Obrázek č. 15: Grafy rytmu exprese *Grin2a*. Grafy znázorňují kosinorovou křivku pro každou ze skupin, proloženou průměry relativních hladin mRNA genu *Grin1* \pm SEM v cirkadiálním čase 2, 8, 14, 20 a 26 (hodnoty v CT2 a CT26 jsou identické, hodnota v CT26 byla přidána pro lepší konstrukci grafů). Na všech grafech je vždy znázorněna kontrolní skupina černě a LL skupina červeně. Pokud byla statisticky zamítnuta rytmicita exprese, příslušná sinusoida je v grafu znázorněna přerušovanou čarou. Do grafů byla vložena hodnota P určená testem dvoucestná ANOVA, udávající míru rozdílu mezi sadami hodnot obou skupin. Signifikantní rozdíl ($P < 0,05$) byl nalezen a tučně označen ve frontálním kortexu, parietálním kortexu a hipokampu.

5.2.8. Exprese genu *Grin2b*

Expres genu *Grin2b* kódující podjednotku glutamátového NMDA receptoru GluN2B byla pozorována ve strukturách frontálního a parietálního kortexu, čichovém laloku, hipokampu a SCN (obr. č. 16). Kosinorová analýza a jednocestná ANOVA neprokázaly rytmus v parietálním kortexu kontrolní skupiny, obou skupinách v čichového laloku, v hipokampu LL skupiny a v SCN LL skupiny. Kosinorová analýza nenašla v žádném z rytmů signifikantní rozdíl v hodnotách mesoru, amplitudy či akrofáze (Tab. č. 2a, 2b). Dvoucestná ANOVA determinovala signifikantní rozdíl mezi skupinami kontrol a LL zvířat pouze v oblasti čichového laloku.

Ve frontálním kortexu byla i přes nízkou amplitudu, testem jednocestná ANOVA potvrzena přítomnost rytmické exprese u kontrolní ($P = 0,0010$; $F(4, 29) = 6,219$) i LL skupiny ($P = 0,0004$; $F(4, 27) = 7,364$). Kosinorová analýza odmítla H_0 s pravděpodobností $P = 0,0029$ pro kontrolní skupinu a $P = 0,0029$ pro LL skupinu. Dvoucestná ANOVA nenalezla signifikantní rozdíl v oblasti frontálního kortexu mezi kontrolní a LL skupinou ($P = 0,2655$; $F(1, 56) = 1,265$). Rytická exprese *Grin2b* byla nalezena v parietálním kortexu pouze u LL skupiny (jednocestná ANOVA: $P < 0,0001$; $F(4, 28) = 13,45$; kosinorová analýza: $P < 0,0001$) a u kontrolní skupiny nikoliv (jednocestná ANOVA: $P = 0,0639$; $F(4, 29) = 2,504$; kosinorová analýza: $P = 0,0101$). Rozdíl mezi těmito skupinami v parietální kortexu byl opět vyhodnocen jako nesignifikantní ($P = 0,2731$ $F(1, 57) = 1,225$). V čichovém laloku jednocestná ANOVA vyvrátila přítomnost rytmu exprese *Grin2b* u kontrolní ($P = 0,4051$; $F(4, 29) = 1,037$) i LL skupiny ($P = 0,2867$; $F(4, 29) = 1,318$). Kosinorová analýza rovněž neodmítla H_0 s pravděpodobností $P = 0,1381$ pro kontrolní skupinu a $P = 0,3373$ pro LL skupinu. Rozdíl mezi hodnotami těchto skupin byl v čichovém laloku přesto vyhodnocen jako signifikantní ($P = 0,0306$; $F(1, 58) = 4,911$). Rytmicita exprese tohoto genu byla v hipokampu prokázána pouze u kontrolní skupiny (jednocestná ANOVA: $P = 0,0014$; $F(4, 29) = 5,850$; kosinorová analýza: $P = 0,0002$). Rytická exprese genu *Grin2b* nebyla v hipokampu LL skupiny potvrzena (jednocestná ANOVA: $P = 0,0899$; $F(4, 31) = 2,218$; kosinorová analýza: $P = 0,0451$). V hipokampu rozdíl v expresi *Grin2b* mezi oběma skupinami nedosahoval signifikance ($P = 0,6112$; $F(1, 60) = 0,2612$). Přítomnost signifikantního rytmu byl testem jednocestná ANOVA v SCN prokázán pouze u kontrolní skupiny ($P = 0,0002$; $F(4, 27) = 7,917$), pro LL skupiny nebyl tento rozdíl mezi CT signifikantní ($P = 0,7849$; $F(4, 28) = 0,4312$) a přítomnost rytmu v této skupině tak nebyla potvrzena. Kosinorová analýza rovněž odmítla H_0 s pravděpodobností $P = 0,0008$ pro kontrolní skupinu, ale nikoliv pro LL skupinu $P = 0,4728$. Test dvoucestná ANOVA vyhodnotil míru rozdílu v SCN mezi oběma skupinami jako nesignifikantní ($P = 0,1020$; $F(1, 55) = 2,765$).

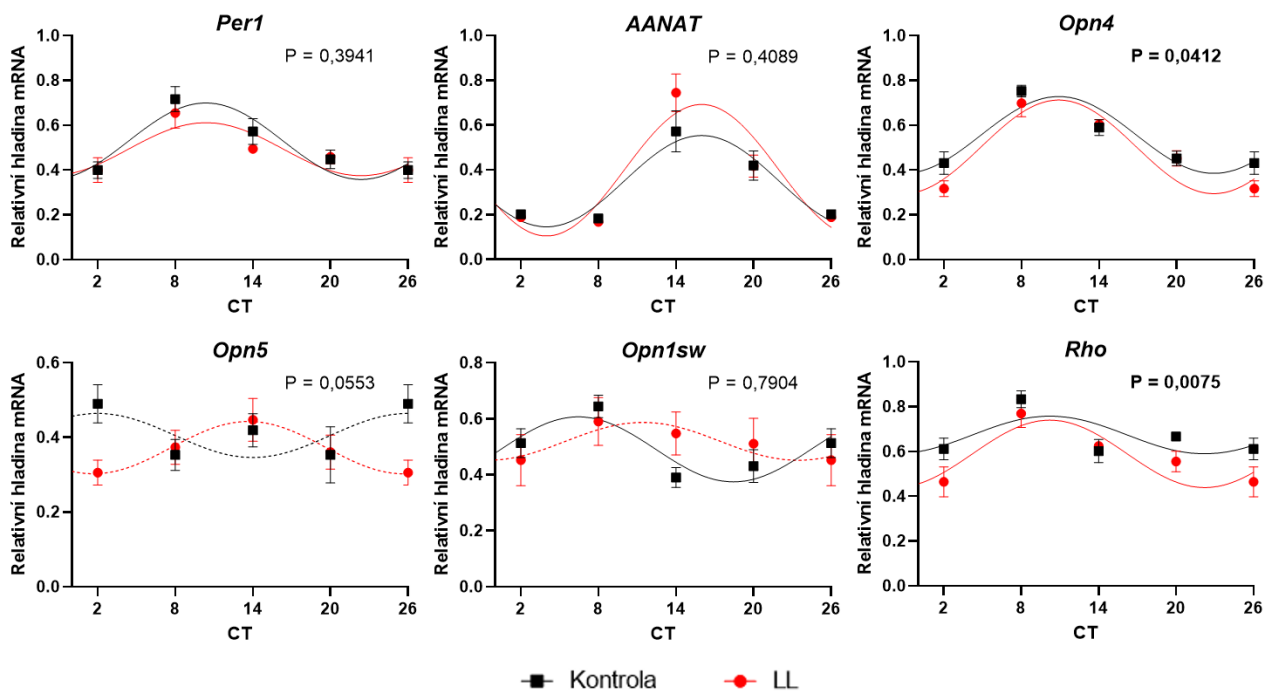


Obrázek č. 16: Grafy rytmu exprese *Grin2b*. Grafy znázorňují kosinorovou křivku pro každou ze skupin, proloženou průměry relativních hladin mRNA genu *Grin2b* ± SEM v cirkadiánním čase 2, 8, 14, 20 a 26 (hodnoty v CT2 a CT26 jsou identické, hodnota v CT26 byla přidána pro lepší konstrukci grafů). Na všech grafech je vždy znázorněna kontrolní skupina černě a LL skupina červeně. Pokud byla statisticky zamítnuta rytmicita exprese, příslušná sinusoida je v grafu znázorněna přerušovanou čarou. Do grafů byla vložena hodnota P určená testem dvoucestná ANOVA, udávající míru rozdílu mezi sadami hodnot obou skupin. Signifikantní rozdíl ($P < 0,05$) byl nalezen a tučně označen v čichovém laloku.

5.2.9. Expresce tkáňově specifických genů v sítnici

V sítnici oka byly kromě výše uvedených genů *Per2*, *Nr1d1* a *Bdnf* měřeny ještě hladiny mRNA genů *Per1*, *AANAT*, *Opn4*, *Opn5*, *Opn1sw* a *Rho* (obr. č. 17). Kosinorová analýza a jednocestná ANOVA prokázaly rytmus exprese u většiny těchto genů, s výjimkou *Opn5* v obou testovaných skupinách a *Opn1sw* u LL skupiny zvířat. Kosinorová analýza nenašla v žádném z rytmů genů signifikantní rozdíl v hodnotách mesoru, amplitudy či akrofáze (Tab. č. 2b). Dvoucestná ANOVA determinoval signifikantní rozdíl mezi skupinami kontrol a LL v genech *Opn4* a *Rho*.

Kosinorová analýza a jednocestná ANOVA prokázaly přítomnost rytmu v expresi *Per1* u kontrolní (jednocestná ANOVA: $P < 0,0001$; $F(4, 30) = 9,107$; kosinorová analýza: $P < 0,0001$) i LL skupiny zvířat (jednocestná ANOVA: $P = 0,0056$; $F(4, 29) = 4,558$; kosinorová analýza: $P = 0,0075$) a rozdíl mezi těmito dvěma rytmy byl určen testem dvoucestná ANOVA jako nesignifikantní ($P = 0,3941$; $F(1, 58) = 0,7371$). V případě exprese genu *AANAT* byly opět prokázány rytmy cirkadiánní exprese u skupin kontrolních (jednocestná ANOVA: $P < 0,0001$; $F(4, 30) = 15,02$; kosinorová analýza: $P < 0,0001$) i LL zvířat (jednocestná ANOVA: $P < 0,0001$; $F(4, 27) = 13,55$; kosinorová analýza: $P < 0,0001$) a rozdíl mezi nimi byl opět stanoven jako nesignifikantní ($P = 0,4089$; $F(1, 59) = 0,6917$). V sítnici pro gen *Opn4* jednocestná ANOVA opět potvrdila přítomnost cirkadiánní rytmické exprese u kontrolní ($P < 0,0001$; $F(4, 30) = 11,72$) i LL skupiny zvířat ($P < 0,0001$; $F(4, 29) = 16,79$). Kosinorová analýza odmítla H_0 s pravděpodobností $P < 0,0001$ pro kontrolní skupinu a $P < 0,0001$ pro LL skupinu. Rozdíl od předchozích dvou genů byl rozdíl mezi rytmy exprese *Opn4* obou skupin vyhodnocen jako signifikantní ($P = 0,0412$; $F(1, 57) = 4,364$). V případě genu *Opn5* byla v sítnici zamítnuta rytmicita exprese u kontrolní (jednocestná ANOVA: $P = 0,1981$; $F(4, 28) = 1,615$; kosinorová analýza: $P = 0,2771$) i LL skupiny (jednocestná ANOVA: $P = 0,1552$; $F(4, 30) = 1,798$; kosinorová analýza: $P = 0,0329$). Dvoucestná ANOVA určila rozdíl v expresi *Opn5* mezi skupinami jako nesignifikantní ($P = 0,0553$; $F(1, 58) = 3,826$). Jednocestná ANOVA potvrdila rytmus v expresi *Opnlsw* pouze v kontrolní skupině ($P = 0,0006$; $F(4, 30) = 6,697$), ale v LL skupině zvířat nikoliv ($P = 0,7471$; $F(4, 30) = 0,4843$). Kosinorová analýza rovněž odmítla H_0 s pravděpodobností $P = 0,0074$ pro kontrolní skupinu, ale nikoliv pro LL skupinu $P = 0,4499$. Rozdíl v expresi genu *Opnlsw* mezi skupinami nebyl signifikantní ($P = 0,7904$; $F(1, 59) = 0,07127$). Rytmicita exprese genu *Rho* byla prokázána u kontrolní (jednocestná ANOVA: $P = 0,0029$; $F(4, 27) = 5,250$; kosinorová analýza: $P = 0,0389$) i LL skupiny (jednocestná ANOVA: $P = 0,0023$; $F(4, 29) = 5,395$; kosinorová analýza: $P = 0,0022$). Následná analýza odhalila snížení mesoru rytmu LL skupiny zvířat, výsledná hodnota P udávající významnost rozdílu mezi mesory rytmů obou skupin však nedosáhla požadované hodnoty ($P = 0,051$; Tab. č. 2b). Dvoucestná ANOVA našla signifikantní rozdíl mezi skupinami ($P = 0,0075$; $F(1, 56) = 7,686$).



Obrázek č. 17: Grafy rytmu exprese tkáňově specifických genů sítnice. Grafy znázorňují kosinorovou křivku pro každou ze skupin, proloženou průměry relativních hladin mRNA genů *Per1*, *AANAT*, *Opn4*, *Opn5*, *Opn1sw* a *Rho* ± SEM v cirkadiánním čase 2, 8, 14, 20 a 26 (hodnoty v CT2 a CT26 jsou identické, hodnota v CT26 byla přidána pro lepší konstrukci grafů). Na všech grafech je vždy znázorněna kontrolní skupina černě a LL skupina červeně. Pokud byla statisticky zamítnuta rytmicita exprese, příslušná sinusoida je v grafu znázorněna přerušovanou čarou. Do grafů byla vložena hodnota P určená testem dvoucestná ANOVA, udávající míru rozdílu mezi sadami hodnot obou skupin. Signifikantní rozdíl ($P < 0,05$) byl nalezen a tučně označen v rytmech genů *Opn4* a *Rho*.

6. DISKUZE

6.1. Vliv stálého světla v raném postnatálním období na rozvoj úzkostného chování v dospělosti

Výsledky provedených testů chování potvrdily zvýšený rozvoj úzkostného chování v dospělosti, pokud byla mláďata vystavena během rané periody postnatálního vývoje 24hodinovému stálému světlu (tj. LL skupina zvířat). Všechny tři provedené behaviorální testy využívají přirozené tendence hlodavců vyhýbat se velkým otevřeným a dobře osvětleným plochám, která kontrastuje se spontánním prozkoumáváním nového prostředí (Choleris et al., 2001; Crawley & Goodwin, 1980; Crawley, 1985). U úzkostnějších zvířat je posílena averze k pohybu v otevřeném prostředí a utlumena přirozená zvědavost.

V testu otevřeného pole jsou k určení míry úzkostného chování využita data o uražené dráze zvířete během testu a času stráveném v jednotlivých částech aparatury (Carola et al., 2002). Studie potvrzují u úzkostných zvířat nižší uraženou dráhu v obou oblastech aparatury. Dále se úzkostná zvířata typicky více zdržují v okrajové oblasti a frekvence přechodů mezi oblastmi u nich bývá nižší než u zdravých zvířat (Carola et al., 2002). Detailnější studie v některých případech vyhodnocují kromě dráhy i chování v aparatuře jako například očichávání stěn, čištění se nebo míru defekace. Tyto parametry ale v této diplomové práci z technických a časových důvodů vyhodnocovány nebyly.

Naše výsledky ukazují, že zvířata, která vyrůstala na stálém světle o intenzitě 50 luxů po prvních 20 dní svého postnatálního vývoje, setrvávají signifikantně kratší dobu ve středové oblasti, a naopak delší dobu pobývají v okrajové oblasti aparatury otevřeného pole v porovnání s kontrolní skupinou. Podle dostupné literatury je toto chování typické pro zvířata s vyšší mírou úzkosti (Carola et al., 2002). Také dráha uražená ve středové oblasti byla u LL skupiny zvířat významně kratší než u zvířat kontrolní skupiny. Zvířata LL skupiny však rovněž urazila průměrně kratší dráhu než kontrolní zvířata i v okrajové oblasti. V tomto případě rozdíl mezi hodnotami nebyl signifikantní. Z obou srovnání je přesto patrné, že LL skupina zvířat se méně pohybovala v otevřeném poli, což naznačuje, že se tato skupina více bála nového prostředí testovací aparatury (Choleris et al., 2001). U LL skupiny zvířat byla detekována nižší frekvence přechodů mezi oblastmi aparatury. Po vyhodnocení byl ale signifikantní rozdíl pouze mezi počty vstupů do středové oblasti, a nikoliv vstupů do okrajové oblasti. Domníváme se, že zvířata LL skupiny se více bála středové oblasti a pohybovala se v ní mnohem méně. Z tohoto důvodu také mnohem pravděpodobněji svou 5minutovou dráhu testu ukončila v okrajové oblasti. Protože všechna zvířata byla umístěna na začátku testu do středové oblasti, byl tak u většiny LL zvířat počet vstupů do okrajní oblasti o jeden větší, než počet vstupů do středové. Naproti tomu kontrolní zvířata, u kterých se méně projevovaly

známky úzkostného chování, se ve středové oblasti pohybovala mnohem více a rovněž mnohem častěji ukončovala 5minutový test ve středové oblasti. Počet vstupů se tak rovnal počtu výstupů častěji u skupiny kontrol než u LL skupiny. Tento fakt způsobil, že byl rozdíl v počtu vstupů do středové oblasti vyhodnocen jako signifikantní a počet vstupů do okrajové oblasti nikoliv. Nicméně signifikantní snížení počtu vstupů LL skupiny zvířat do této oblasti opět svědčí o úzkostnějším chování u této skupiny. Posledním zkoumaným parametrem byla délka nejdelší návštěvy středové a okrajové oblasti. Rozdíl mezi kontrolní a LL skupinou však v obou případech nebyl vyhodnocen jako signifikantní.

Míra úzkostného chování byla dále zkoumána testem vyvýšeného kruhového bludiště. I v této aparatuře bylo již dříve prokázáno, že úzkostné zvíře se více zdržuje v uzavřených a zastíněných oblastech aparatury (Carola et al., 2002; Shepherd et al., 1994). Nižší počet vstupů do oblastí a procentuální snížení času stráveného v otevřených ramenech je podle předchozích studií znak typický pro úzkostná a stresovaná zvířata (Carola et al., 2002; Shepherd et al., 1994).

Naše výsledky ukázaly nesignifikantní rozdíl mezi skupinami v počtu přechodů mezi oblastmi, v době strávené v jednotlivých oblastech i v době před prvním vstupem do uzavřené oblasti. Signifikantní rozdíl mezi skupinami byl nalezen pouze ve vzdálenosti uražené v uzavřených ramenech aparatury. Zvířata LL skupiny urazila v porovnání s kontrolami menší dráhu v uzavřených ramenech, nebyly ale nalezeny signifikantní rozdíly v době strávené v této oblasti ani ve vzdálenosti uražené v otevřené oblasti. Z těchto dat vyplývá, že se zvířata LL skupiny pohybovala v uzavřené oblasti pomaleji nebo častěji nehybně vyčkávala v uzavřené „bezpečnější oblasti“.

V testu light/dark box bylo opět využíváno konfliktu mezi přirozenou averzí hlodavců k pohybu v osvětlených plochách a spontánním zkoumáním nového prostředí (Choleris et al., 2001; Crawley & Goodwin, 1980; Crawley, 1985). U úzkostných zvířat se předpokládá kratší doba strávená v osvětlené části aparatury a potlačení explorativního chování těchto zvířat (Costall et al., 1989; Crawley & Goodwin, 1980).

Naše skupina LL zvířat se průměrně pohybovala v osvětlené části srovnatelně dlouhou dobu jako kontrolní skupina a rozdíl v hodnotách mezi skupinami nebyl signifikantní. Naproti tomu, LL zvířata přecházela mezi oblastmi s výrazně nižší frekvencí než kontrolní skupina. Z našich dat vyplývá, že pokud LL zvířata vstoupila do osvětlené oblasti, strávila v ní během jedné návštěvy průměrně delší čas, než tomu bylo u kontrol. Zvířata kontrolní skupiny procházela mezi oblastmi s mnohem větší frekvencí a oblasti vždy navštívila jen krátkodobě. Do vstupů do osvětlené oblasti nebyly počítány případy, kdy zvíře vykuklo hlavou do osvětlené oblasti a poté se opět schovalo do zastřešené části. Pokud zvíře do osvětleného prostoru vstoupilo oběma předními končetinami,

jednalo se již o vstup do druhé oblasti. Průměrný počet vystrčení hlavy do osvětlené části se mezi skupinami signifikantně nelišil. Domníváme se však, že naše výsledky potvrzují zvýšení projevů úzkostného chování u LL skupiny zvířat. Snížená frekvence vstupů do oblastí aparatury totiž indikuje nižší míru spontánního explorativního chování u LL skupiny a větší strach z nového prostředí. Kvůli zastřešení oblasti nemohla být z technických důvodů monitorována dráha zvířete v zatemněné oblasti a stejně tak v osvětlené oblasti, kde měl systém monitorující dráhu zvířete problémy s opětovným zaměřováním zvířete, v důvodu častého přecházení zvířat mezi oblastmi.

Naše výsledky ukázaly, že test otevřeného pole poskytl nejvíce průkazných rozdílů mezi kontrolní a experimentální skupinou a naznačil, že časně postnatální vývoj ve stálém světle může zesilovat úzkostné chování jedinců v dospělosti. Testy vyvýšeného kruhového bludiště a light/dark boxu tyto výsledky příliš nedoplnily, ale ani nevyvrátily. Je pravděpodobné, že použitím většího počtu zvířat bychom dosáhli statisticky významných rozdílů i ve většině parametrů v ostatních testech. Výsledky všech tří testů se ale shodují v jednom závěru a to, že experimentální skupina zvířat byla signifikantně méně pohyblivá než skupina kontrolních zvířat.

Naše data se shodují s nálezy předchozí studie (Roman & Karlsson, 2013), provedené na potkanech vystavených stálému světle v pozdním prenatalním a časném perinatálním období (den E20 – P4). Stejně jako v našem experimentu pozorovali autoři v testu otevřeného pole signifikantní rozdíly mezi kontrolními a experimentálními zvířaty, indikující rozvoj úzkostného chování u LL skupiny zvířat, které přetrvává do dospělosti. Podobná studie (Cissé et al., 2016) provedená na myších prokázala úzkostné chování u dospělců, pokud byla zvířata chována od narození do 3. nebo 5. týdne svého postnatálního vývoje na stálém světle. V testu otevřeného pole zvířata vyrůstající na stálém světle strávila v obou případech signifikantně kratší dobu ve středové oblasti než kontrolní skupiny. V této studii byl proveden i test vyvýšeného pole, ve kterém nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi skupinami ani v jednom ze zkoumaných parametrů. Navzdory signifikanci rozdílů z pouze v jednom behaviorálním testu, autoři tohoto článku prohlásili hypotézu rozvoje úzkostného chování kvůli stálému světle v mládí za potvrzenou.

Zajímavé výsledky ukázala předchozí práce stejné výzkumné skupiny (Borniger et al., 2014), na kterou navazovala citovaná studie (Cissé et al., 2016). U myši vyrůstajících na stálém světle 3 týdny byl rovněž potvrzen rozvoj úzkostného chování, na základě rozdílů v chování v aparatuře vyvýšeného bludiště. V této studii naopak nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v době strávené ve středové a okrajové oblasti v testu otevřeného pole. Autoři této práce se domnívají, že rozdílné výsledky z aparatur byly zapříčiněny posunem testování vyvýšeného bludiště do aktivní fáze dne myši (tedy v noci), zatímco test otevřeného pole byl prováděn ve dne. Tuto teorii podporuje práce (Verma et al., 2010), která odhalila signifikantní rozdíly ve výsledcích testů úzkosti

prováděných během dne a během noci. V aparaturách zkoumajících dobu pobytu hlodavce v zastíněných či osvětlených oblastech se zvířata (obzvláště samice) během noci zdržovala více v zastíněných částech aparatur, než tomu bylo v pokusech odehrávajících se během dne. Tato cirkadiánní variabilita v preferenci zastíněných oblastí mohla v našem měření přispět k malému počtu signifikantních rozdílů v testu light/dark box. Naše měření v aparaturách otevřeného pole a vyvýšeného kruhového bludiště začínala vždy v 9:00 dopoledne, což bylo 2 hodiny po automatickém rozsvícení světel v chovné místnosti, a tedy poměrně blízko aktivní fáze dne potkanů. Začátek testu light/dark box ale musel být posunut z organizačních důvodů na 13:30 odpoledne, a tedy později do neaktivní fáze dne potkana. Posun testu do neaktivní fáze potkanů, kdy se zvířata přirozeně více vyskytují v osvětlených částech aparatury, mohl být jednou z příčin nesignifikantního rozdílu mezi skupinami v časech strávených v osvětlených a zastíněných oblastech aparatury light/dark testu.

Naše výsledky spolu se závěry předchozích studií naznačují, že podmínky stálého světla během raného postnatálního vývoje způsobují rozvoj úzkostného chování jedinců, které přetrvává do dospělosti. Domníváme se, že stálé světlo je hlavním faktorem této změny chování. Předešlé studie potvrzují (Coleman & Canal, 2017), že podmínky stálého světla několik dní před porodem a v době sání nesnižují u samic potkanů projevy mateřského chování (přenášení, olizování a čištění mláďat). Nedostatečné mateřské chování matky totiž způsobuje u potomků zvýšení odpovědi na stres a alternace v HPA ose v dospělosti (Ivy et al., 2008; Liu et al., 1997). U matek na stálém světle rovněž není pozorováno zvýšení hladiny kortizolu či glukokortikoidních receptorů v mozku (Coleman & Canal, 2017). Ačkoliv stálé světlo působí na organismus jako významný stresor, jeho účinky na chování zvířete a zvýšení stresových markerů se začínají projevovat až zpravidla 3. týden zvířete na světelném režimu LL (Claustrat et al., 2008), tedy přibližně v době, kdy jsou zvířata v našem pokusu převedena zpět na střídavé světelné podmínky LD12:12. Domníváme se tedy, že rozvoj úzkostného chování nebyl způsoben zvýšeným stresem samice kvůli LL podmínkám, ale působením LL podmínek přímo vývoj mláďat.

6.2. Vliv stálého světla v raném postnatálním vývoji na přetrvávající změny v cirkadiánních rytmech exprese zkoumaných genů

V našich experimentech jsme vycházeli z prací, které dokázaly, že podmínky stálého světla během raného postnatálního vývoje způsobují trvalé změny rytmů exprese hodinových genů v periferních orgánech (Brooks et al., 2014) a v hypotalamu myši (Cissé et al., 2016). Plný rozsah těchto alternací v expresi genů však zůstává neznámý. V naší práci jsme se rozhodli zkoumat rozsah změn v rytmech exprese genů *Per2*, *Nr1d1*, *Stat3*, *BDNF*, *Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b* ve strukturách

frontálního a parietálního kortexu, čichového laloku, hipokampu a SCN, a genů *Per2*, *Nr1dl*, *BDNF*, *Per1*, *AANAT*, *Opn4*, *Opn5*, *Opnlsw* a *Rho* v sítnici. Naše měření hladin mRNA těchto genů detekovala nejvýraznější změny mezi skupinami v expresi genu *Nr1dl* kódujícího jaderný receptor REV-ERB α , který je také součástí cirkadiánní zpětnovazebné smyčky TTFL (Preitner et al., 2002). Ve většině testovaných struktur se také mezi skupinami lišila exprese genu *Stat3* kódující člena signalizační kaskády zánětlivé odpovědi v mozku (Rummel, 2016) a velmi často se také lišila exprese *Grin2a* kódující GluN2A podjednotku NMDA glutamátového receptoru. Největší počet změn v expresi genů mezi kontrolní a experimentální skupinou jsme pozorovali v hipokampu.

Naše experimenty neodhalily signifikantní změny v rytmu exprese hodinového genu *Per2* mezi skupinami v žádné ze zkoumaných struktur. Jediný signifikantní rozdíl byl akrofázi rytmu v sítnici, která byla u LL skupiny přibližně o 2 hodiny a 30 minut zpožděna oproti kontrole. Přestože předchozí výsledky ukázaly, že stálé světlo v dospělosti způsobuje v SCN výrazné snížení amplitudy exprese genu *Per2* (Sudo et al., 2003), naše výsledky naznačují, že LL podmínky časně postnatálně nemají na vývoj rytmu v expresi *Per2* vliv a rytmus *Per2* se v SCN neliší od kontrol, pokud je jedinec v dospělosti na světelném režimu LD12:12. Naše výsledky jsou také v rozporu s výše zmíněnou studií (Brooks et al., 2014), která detekovala ve svých experimentech trvalé snížení amplitudy *Per2* rytmu SCN a rovněž v oscilátorech periferních orgánů (srdce, plíce). Tato studie ale prováděla svůj experiment na myších, což by mohl být důvod neshody s našimi výsledky. Další příčinou rozporu výsledků může být prodloužení podmínek stálého světla ve zmíněné studii od embryonálního dne 18 (E18) až po 21. den postnatálního vývoje (P21). Výsledky naší a této studie naznačují, že pro trvalé snížení amplitudy rytmu *Per2* exprese v SCN a periferních oscilátorech je stálé světlo 3 týdny postnatálního vývoje nedostačující, a klíčové by mohli být LL podmínky hlavně během prenatálního vývoje.

Předchozí studie potvrzují vliv stálého světla v dospělosti na rytmicitu v expresi *Nr1dl* (Cissé et al., 2016; Fonken et al., 2013). Ačkoliv studie (Cissé et al., 2016) deklaruje, ač nedokumentuje, sníženou amplitudu rytmu v expresi *Nr1dl*, jiná práce ukazuje (Fonken et al., 2013), že exprese *Nr1dl* v hypotalamu zůstává nezměněna. Snížení rytmu exprese genu *Nr1dl*, bylo ale v této studii detekováno například v játrech či bílé tukové tkáni. Naše měření odhalila přetrvávající změny v rytmu exprese genu *Nr1dl* ve frontálním kortexu, parietálním kortexu a hipokampu. Ve frontálním laloku jsme našli signifikantní snížení mesoru rytmu a zpoždění akrofáze o přibližně 2 hodiny a 30 minut u LL skupiny zvířat. Stejně jako v případě *Per2*, detekovali jsme signifikantní zpoždění akrofáze exprese rytmu *Nr1dl* v sítnici o přibližně 2 hodiny a 20 minut. Naše experimenty dále odhalily signifikantní zvýšení mesoru rytmu exprese *Nr1dl* v parietálním kortexu LL skupiny a v hipokampu a snížení amplitudy rytmu exprese tohoto genu v hipokampu.

Oproti tomu studie zkoumající efekt stálého světla na dospělé jedince, nenalezla v oblasti hipokampu změnu v *Nr1dl* expresi (Fonken et al., 2013). Ve strukturách čichového laloku a v SCN jsme nedetkovali změnu v rytmu exprese *Nr1dl* genu.

Dlouhodobé snížení exprese genu *Nr1dl* v mozkových strukturách může mít své důsledky. Inhibicí exprese tohoto genu u dospělých jedinců, dochází například k rozvoji stavů mánie a zvýšení hladiny dopaminu ve středním mozku (Chung et al., 2014). Změny v expresi hodinových genů jsou rovněž asociovány s rozvojem bipolární poruchy, a podávání léčiva pacientů s bipolární poruchou má synchronizační efekt na TTFL, zvyšuje amplitudu rytmu v expresi hodinových genů a zmírňuje tak příznaky nemoci (Kripke et al., 2009; McCarthy et al., 2013). Přetrvávající zpoždění v rytmech exprese *Per2* i *Nr1dl* v sítnicích zvířat LL skupiny indikuje změny v cirkadiánní expresi hodinových genů v této struktuře. Cirkadiánní systém sítnice je důležitý pro regulaci fyziologických procesů v sítnici samotné, a tedy pro kvalitní obrazové i neobrazové vidění. Otázkou budoucího studia zůstává, jak narušení cirkadiánních oscilací stálým světlem ovlivňuje maturaci zrakového systému potkanů.

Transkripční faktor *Stat3* je součástí intracelulární signalizační kaskády aktivované cytokiny, růstovými faktory a řadou dalších stimulantů vrozené i adaptativní imunity (Hirano et al., 2000; Takeda & Akira, 2000). V mozku hraje *Stat3* kritickou roli například v signalizační kaskádě podporující astrogliogenezi a diferenciaci nervových progenitorových buněk (Chen et al., 2013; Koblar et al., 1998; Nakashima et al., 1999). Studie prokazují, že transkripce *Stat3* je narušena, pokud je geneticky deletován hodinový gen *Cry2*, což rovněž způsobuje narušení chodu TTFL (Hoffman et al., 2009). *Stat3* rovněž působí jako represor transkripce hodinového genu *Nr1dl* (Wang et al., 2017B) a *Stat3* by tak mohl představovat jeden z mnoha faktorů propojující imunitní a cirkadiánní systém. *Stat3* je také považován za potenciální onkogen a jeho zvýšená transkripce a aktivace světlem v noci je považována za součást kaskády procesů vedoucích ke vzniku karcinomu prsu u žen pracujících na směny (Hill et al., 2017; Xiang et al., 2019).

Naše výsledky prokázaly změny rytmické exprese genu *Stat3* v oblasti parietálního kortexu, čichového laloku a hipokampu. Přestože dvoucestná ANOVA neprokázala rozdíl mezi skupinami ve frontálním kortexu a v SCN, exprese *Stat3* u LL skupiny v kortexu nebyla, na rozdíl od kontrol, rytmická a v SCN měl rytmus experimentálních zvířat významně zpožděnou akrofázi. Rovněž ve strukturách parietálního kortexu a čichového laloku nebyl u skupiny LL zvířat prokázán rytmus exprese genu *Stat3*. V hipokampu byl naměřen signifikantně zvýšený mesor rytmu exprese *Stat3* u LL skupiny zvířat. Hlavním znakem exprese *Stat3* u experimentální skupiny zvířat ve všech strukturách s výjimkou SCN, je snížená amplituda rytmu až jeho vymizení. Takto snížená amplituda rytmu exprese by mohla způsobovat dlouhodobé změny v signalizační kaskádě imunitního systému

a potenciálně snížit efektivitu imunitní odpovědi v zasažených oblastech. Bohužel nejsou k dispozici žádné studie dokumentující efekt stálého světla na expresi *Stat3*, ať už v raném postnatálním vývoji či v dospělosti, a tuto teorii ani naše výsledky nemůžeme porovnat s žádnou dostupnou literaturou. Rytmiická exprese *Stat3* v SCN je v souladu s předchozími studiemi naší laboratoře (Moravcová et al., 2018). Na rozdíl od jiných struktur jsme však v SCN testem dvoucestná ANOVA nedetekovali signifikantní rozdíl v rytmu exprese mezi kontrolní a LL skupinou zvířat a žádný pokles amplitudy.

Stálé světlo má vliv na expresi *BDNF* genu. U jedinců na stálém světle během dospělosti byly detekovány snížené hladiny BDNF v oblasti hipokampu a autoři předchozích studií se domnívají, že by tato změna exprese mohla přispívat ke zhoršení kognitivních schopností u těchto zvířat (Bedrosian et al., 2011A; Fonken & Nelson, 2013). Snížené hladiny BDNF činí danou strukturu zranitelnější ke kyslíkovému poškození a rovněž je negativně ovlivněn vývoj a synaptická plasticita (Hacioglu et al., 2016; Park & Poo, 2013). V našem experimentu jsme ale objevili signifikantně zvýšené hladiny BDNF v hipokampu v dospělosti. V oblastech parietálního kortexu, čichového laloku, SCN a sítnice nebyl naopak potvrzen rytmus u kontrolních skupin. Domníváme se, že pozorované zvýšení exprese *BDNF* u našich LL zvířat je součástí adaptivního přizpůsobení, neboť na rozdíl od jiných studií, stálé světlo v naší práci působilo v časně ontogenezi při maturačních procesech mozku. Zvýšení exprese *BDNF* a amplitudy jejího rytmu v oblasti parietálního kortexu, čichových laloků, SCN a sítnice značí, že se tato adaptace mohla vyskytovat ve vyšším procentu mozkových struktur. Práce provedená na sítnicích potkanů vystavených během prvních 3 týdnů vývoje stálému světle potvrzuje signifikantní zvýšení hladin BDNF v gangliových a amakrinních buňkách sítnice (Fujieda & Sasaki, 2008). Naše nálezy se ale neshodují se studií, ve které nebyla pozorována v oblasti hipokampu a prefrontálního kortexu u zvířat vyrůstajících na stálém světle žádná signifikantní změna v rytmu exprese *BDNF* (Borniger et al., 2014). Domníváme se, že příčinou této neshody by mohla být příliš nízká intenzita světla v noci u této studie (5 luxů), oproti intenzitě světla použité v našem experimentu (50 luxů). Rozdíl ve výsledcích zmíněné studie mohl být rovněž způsobem provedením tohoto experimentu na myších, a nikoli jako v našem případě na potkanech.

V našem experimentu jsme se rozhodli zjistit, zda stálé světlo během rané postnatální periody způsobuje dlouhotrvající změny v rytmech exprese podjednotek glutamátových NMDA receptorů. Recentní studie odhalily potlačující efekt stálého světla na expresi $\gamma 2$ podjednotky ionotropního receptoru GABAA na synapsích ve VLSCN, přijímajících signály ze sítnice, a způsobuje tak změnu funkce receptoru (Stell & Mody, 2002; Walton et al., 2017). Bylo rovněž prokázáno, že aplikace GABAA agonisty během druhého týdne života potkana způsobovala, mimo

změny chování, i dlouhodobé modulace v podjednotkách a afinitě NMDA receptoru (Kubová et al., 2018). Domnívali jsme se tedy, že podmínky stálého světla v této kritické periodě vývoje by mohly mít dlouhotrvající dopad na expresi NMDA podjednotek. Zda má stálé světlo v mládí vliv na změnu exprese podjednotek NMDA receptoru není z literatury známo.

Naše výsledky naznačily dlouhotrvající změnu v expresi podjednotek NMDA receptoru, obzvláště v GluN2A podjednotce. GluN2A se liší od ostatních podjednotek GluN2 třídy afinitou k ligandu, přičemž GluN2A disponuje afinitou nejnižší a její časová konstanta desenzitizace je 3-4x kratší než podjednotky GluN2B (Monyer et al., 1994). Procentuální změna v zastoupení GluN2 podjednotek by tak měla dopad na celkovou afinitu receptoru k ligandu a jeho funkci.

Ve velkém počtu případů nebyl detekován u kontrolních i LL skupin zvířat rytmus exprese genů pro NMDA podjednotky, pravděpodobně kvůli své nízké amplitudě a širokému rozptylu mezi vzorky v jednotlivých CT. Ve frontálním kortexu jsme pozorovali pouze malé odchylky exprese GluN1 a GluN2B podjednotky mezi skupinami. Signifikantní rozdíl v expresi mezi skupinami byl detekován v případě GluN2A podjednotky, jejíž rytmus v expresi u LL skupiny nebyl rytmický. V parietálním kortexu byla u všech zkoumaných podjednotek naznačena zvýšená amplituda rytmů exprese u LL skupiny zvířat, která zajistila prokazatelnost rytmicity v expresi všech podjednotek, avšak dvoucestná ANOVA potvrdila rozdíl mezi skupinami pouze pro GluN2A podjednotku. Domníváme se, že zvýšená rytmicita exprese v parietálním kortexu, či snížená rytmicita GluN2A ve frontálním kortexu, by mohly vést ke změně ve složení NMDA receptorů ve světelné části dne, kde jsme detekovali maxima rytmu exprese podjednotek. Pro posouzení fyziologického významu těchto změn je však třeba přihlídnout i k dynamice translace jednotlivých mRNA a post-translačních modifikacích, které významně modulují funkci receptoru.

V čichovém laloku nebyla prokázána rytmická exprese v žádné z podjednotek u kontrolní i LL skupiny zvířat. Signifikance mezi skupinami byla detekována pouze u GluN2B podjednotky, exprese se ale lišila pouze v jednom časovém bodě, což neumožňuje učinit spolehlivý závěr. Naše data prokazují vliv stálého světla během vývoje na potlačení rytmické exprese podjednotek NMDAR v hipokampu a signifikantní zvýšení mesoru rytmu GluN2A. Domníváme se, že stálé světlo při vývoji jedince způsobuje trvalé zvýšení poměru této podjednotky v NMDAR hipokampu a snižuje tím afinitu receptoru k ligandu. V oblasti SCN jsme nenalezli měřitelné množství mRNA podjednotky GluN2A. Příprava vzorků pro qPCR proběhla v SCN pro detekci *Grin2a* exprese stejným postupem jako u ostatních genů zkoumaných v tomto jádře. Přístroj LightCycler použitý v metodě qPCR ale nebyl schopen detekovat dostatečně vysokou koncentraci mRNA tohoto genu pro určení Ct jak u kontrolní, tak i u LL skupiny. O míře exprese GluN2A podjednotky v SCN nebyla nalezena žádná literatura. Nepublikované výsledky naší laboratoře ukazují, že tato podjednotka není

v SCN detekovatelná ani na úrovni proteinu imunohistochemicky, či mRNA metodou *in situ* hybridizace. U zbývajících dvou podjednotek, GluN1 a GluN2B, nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi skupinami, ale u obou podjednotek byla v LL skupině zamítnuta rytmicita jejich exprese. V SCN jsme tak nezaznamenali signifikantní změnu mezi skupinami kontrolních a LL zvířat v žádném ze zkoumaných genů metodou dvoucestné ANOVy, avšak kosinorová analýza ukázala fázový posun rytmu v expresi *Stat3* a ztrátu rytmicity exprese podjednotek NMDA receptoru GluN1 a GluN2B.

Naše výsledky naznačují, že stálé světlo během vývoje způsobuje ve strukturách frontálního kortexu, parietálního kortexu, čichovém laloku a hipokampu změnu v zastoupení GluN2 podjednotek v receptorech NMDA, což by mohlo způsobovat změny ve funkci receptoru a afinitu k ligandu. Pro potvrzení této teorie by bylo nutné provést vazebné eseje receptorů, které jsou schopny změny afinity k ligandu lépe a přesněji determinovat. Žádné obdobné studie zkoumající vliv stálého světla na NMDAR podjednotky nebyly provedeny a naše výsledky tak nemůžeme porovnat s žádnou existující prací.

Studie prováděné na pigmentovaných myších vyrůstajících na stálém světle nedetekovaly u těchto zvířat přetrvávající změny v morfologii či funkci sítnice (Brooks et al., 2014; González-Menéndez et al., 2010A). Rovněž však bylo prokázáno, že vystavení zvířat stálému světlu mezi dny P10 a P20 způsobuje v dospělosti snížení maximálního možného fázového posunu po světelném pulsu (Canal-Corretger et al., 2001). Dodnes není zcela známo, jak stálé světlo způsobuje takové snížení plasticity cirkadiálního systému. Podobný nálezn byl popsán i pro zvířata s potlačenou expresí fotorodopsinu melanopsinu (*Opn4*) (Panda et al., 2002B). Chtěli jsme proto zjistit, zda stálé světlo v časně ontogenezi neovlivňuje expresi genu *Opn4* v dospělosti. Naše výsledky odhalily signifikantní snížení exprese *Opn4* genu u zvířat vyrůstajících na stálém světlé. Domníváme se, že toto trvalé snížení exprese melanopsinu, by mohlo přispívat ke snížené citlivosti dráhy pro neobrazové vidění na světlo, a tím zmenšení fázového posunu cirkadiálních rytmů po světelném pulsu u těchto zvířat. Rovněž jsme u LL skupiny zvířat detekovali signifikantní snížení exprese genu pro rodopsin. Studie zaznamenaly u zvířat s potlačenou expresí rodopsinu v tyčinkách zvýšený práh citlivosti na světlo a celkově sníženou odpověď na přítomnost světla na úrovni jednotlivých buněk (Lem et al., 1999; Rosenfeld et al., 1992). Není tak vyloučeno, že i u našich zvířat vyrůstajících na stálém světlé došlo k podobnému snížení citlivosti ke světlé, obzvláště v temnostní fázi dne, kde jsme zaznamenali největší pokles exprese. OPN5 je UVA-fotosenzitivní pigment gangliových buněk sítnice savců (Kojima et al., 2011). Jeho funkci není dodnes zcela plně porozuměno, ale studie indikují, že by se mohl účastnit světelné cirkadiální synchronizace. Sám OPN5 bez přítomnosti ostatních fotosenzitivních pigmentů sítnice ale nebyl schopen vyvolat

signifikantní fázový posun (Buhr et al., 2015; Ota et al., 2018). Rozhodli jsme se rovněž zjistit, zda stálé světlo v raném vývoji nebude způsobovat změnu exprese krátkovlnných opsinů v čípcích sítnice (gen *Opn1sw*) (Peichl, 2005). AANAT je enzym zodpovědný za syntézu melatoninu v epifýze (Klein et al., 1997), a jak studie prokazují, rovněž také v sítnici (Binkley et al., 1979). Gen pro AANAT, stejně jako celá řada ostatních CCGs, obsahuje v oblasti svého promotoru E-box (Chong et al., 2000) a dlouhodobá změna v expresi hodinových genů by tak mohla mít dopad i na syntézu melatoninu v sítnici. V expresi krátkovlnného opsinu čípků (*Opn1sw*), *Opn5*, enzymu *AANAT* zodpovědného za produkci melatoninu a v hodinovém genu *Per1* jsme nezaznamenali žádné signifikantní změny.

Naše výsledky odhalily dlouhodobé změny rytmů v expresi genů, způsobené stálým světlem v raném postnatálním vývoji. Výsledky indikují, že v hipokampu v podmínkách stálého světla během vývoje došlo k zvýšení exprese *BDNF*, který v nervových strukturách podporuje jejich vývoj a chrání před poškozením kyslíkovými radikály (Hacioglu et al., 2016; Park & Poo, 2013). Je možné, že k těmto změnám dochází při snaze organismu adaptovat se na zvýšený výskyt světla během své kritické periody vývoje. Stálé světlo v časně ontogenezi vedlo rovněž k trvalému snížení exprese v genech pro melanopsin a rodopsin. Rovněž bylo u hodinových genů *Per2* a *Nr1d1* v sítnici zaznamenáno zpoždění fáze rytmu o přibližně 2 hodiny a 30 minut. Domníváme se, že by tyto změny v expresi mohly vést k dlouhodobé snížené citlivosti na světlo o vlnových délkách, které melanopsin a rodopsin registrují. Vzniklé snížení exprese genu pro melanopsin by mohlo vysvětlovat snížení fázového posunu cirkadiálního systému při změně světelných podmínek, potvrzené v předchozí studii (Canal-Corretger et al., 2001). Rovněž jsme detekovali množství struktur s přetrvávající změnou exprese v genu *Stat3*. Domníváme se, že by tato změna mohla u zvířat vyrůstající na stálém světle způsobit změny v intenzitě některých typů imunitních odpovědí, a v budoucích pracích by bylo vhodné tuto hypotézu ověřit. Je překvapením, že stálé světlo nezpůsobovalo tak závažné změny v expresi hodinových genů v cirkadiálním pacemakeru, jak jsme před začátkem experimentu očekávali. V SCN jsme nepozorovali žádnou signifikantní změnu v rytmu exprese zkoumaných genů a rovněž jsme v žádné ze struktur (mimo opoždění akrofáze v sítnici) nedetekovali změny v expresi *Per2*. Navzdory tomu, jsme ve většině zkoumaných struktur objevili signifikantní alternace v *Nr1d1* expresi. Kvůli funkci REV-ERBa v potlačení exprese genu *Bmal1* (Preitner et al., 2002), by v zasažených strukturách mohly rovněž vznikat alternace v rytmu tohoto genu a potenciálně změny v délce vnitřní periody. Zda u zvířat vyrůstajících na stálém světle dochází ke změnám délce vnitřní periody při absenci světelného zeitgeberu, musí určit budoucí studie. Kvůli signifikantní změně rytmu exprese *Nr1d1* pouze v některých strukturách, by rovněž při absenci synchronizačního stimulu mohlo u těchto zvířat docházet k rychlejší a intenzivnější desynchronizaci cirkadiálního systému. Vzniklé odchylky v *Nr1d1* expresi by mohly dále souviset

s rozvojem psychických změn, například zvýšeným projevům úzkostného chování. Naše výsledky rovněž odhalily vliv stálého světla v mládí na expresi NMDAR podjednotek (obzvláště GluN2A) a naznačují tak možný rozvoj změn v afinitě a funkci těchto receptoru. Pro potvrzení této teorie by bylo vhodné stanovit změny afinity NMDAR pomocí vhodných vazebných esejí. Naše práce potvrdila zvýšený rozvoj úzkostného chování u zvířat vyrůstající během své rané postnatální periody na stálém světle, který byl popsán v předchozích studiích (Borniger et al., 2014; Cissé et al., 2016; Roman & Karlsson, 2013). Na základě srovnání našich dat s předchozími studiemi (Coleman & Canal, 2017) se rovněž domníváme, že tyto změny v expresi a úzkostném chování nevznikly kvůli zvýšenému stresu samice na stálém světle. Je ale možná, že tyto změny mohou být sekundárně způsobeny narušením noční aktivity stálým světlem či kvůli potlačeným hladinám melatoninu.

7. ZÁVĚR

Tato práce poskytuje informace o dlouhotrvajících změnách exprese hodinových a dalších genů a rozvoji úzkostného chování u zvířat vyrůstajících na stálém světle během raného postnatálního vývoje. Naše výsledky prokazují snížení exprese genů pro melanopsin a rodopsin v sítnici, které je patrné v dospělosti. Domníváme se, že tyto změny v expresi fotoreceptorů by mohly u těchto zvířat vést ke snížení citlivosti na příslušné vlnové délky. Dále jsme u těchto zvířat detekovali signifikantní změny v rytmu exprese pro geny *Nr1d1*, *BDNF*, *Stat3* a *Grin2a* ve zkoumaných mozkových strukturách. V SCN nebyla detekována žádná trvalá změna exprese v hodinových genech *Per2*, *Nr1d1* a ani v žádném z dalších zkoumaných genů. V žádné zkoumané struktuře rovněž nebyla prokázána změna v rytmu exprese v *Per2*. Výsledky prokazují odolnost centrálních hodin cirkadiálního systému vůči změnám způsobených stálým světlem v mládí, ale dodatečné studie by měly být provedeny pro determinaci rozsahu a důsledku změn v rytmech exprese *Nr1d1* v periferních oscilátorech. Ve většině testovaných struktur jsme rovněž detekovali změny v rytmu exprese genu *Stat3*, které by mohly mít potenciální důsledky v odpovědích imunitního systému mozku. Naše výsledky odhalily změny v rytmech exprese GluN2A podjednotky NMDA receptoru, které by mohly znamenat změny v afinitě a funkci tohoto receptoru v průběhu dne. Tato teorie by však musela být potvrzena vhodnou vazebnou esejí, která by určila přímé změny afinity NMDA receptoru. Rovněž jsme odhalili trvalé zvýšení exprese *BDNF* v hipokampu, které může znamenat adaptační přizpůsobení světelnému stresu během vývoje. V neposlední řadě naše experimenty potvrdily zvýšený rozvoj úzkostného chování u zvířat vyrůstajících během svého raného postnatálního vývoje na stálém světle. Naše výsledky potvrzují rozsáhlé dlouhotrvající změny v expresi a úzkostném chování a naznačují tak, jaké následky může mít např. usínání mladých dětí v místnosti se zapnutým světlem či displejem.

Seznam literatury

- Abe, M., Herzog, E. D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., & Block, G. D. (2002). Circadian rhythms in isolated brain regions. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(1), 350–356.
- Aida, R., Moriya, T., Araki, M., Akiyama, M., Wada, K., Wada, E., & Shibata, S. (2002). Gastrin-Releasing Peptide Mediates Photic Entrainable Signals to Dorsal Subsets of Suprachiasmatic Nucleus via Induction of Period Gene in Mice. *Molecular Pharmacology*, 61(1), 26–34.
- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T., & Nishida, E. (2002). Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. *Molecular and Cellular Biology*, 22(6), 1693–1703.
- Albus, H., Vansteensel, M. J., Michel, S., Block, G. D., & Meijer, J. H. (2005). A GABAergic Mechanism Is Necessary for Coupling Dissociable Ventral and Dorsal Regional Oscillators within the Circadian Clock. *Current Biology*, 15(10), 886–893.
- Altman, J., & Bayer, S. A. (1978). Development of the diencephalon in the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 182(5), 945–971.
- Anson, L. C., Chen, P. E., Wyllie, D. J., Colquhoun, D., & Schoepfer, R. (1998). Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(2), 581–589.
- Aton, S. J., Colwell, C. S., Harmar, A. J., Waschek, J., & Herzog, E. D. (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nature Neuroscience*, 8(4), 476–483.
- Aubrecht, T. G., Weil, Z. M., Magalang, U. J., & Nelson, R. J. (2013). Dim light at night interacts with intermittent hypoxia to alter cognitive and affective responses. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 305(1), 78–86.
- Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schütz, G., & Schibler, U. (2000). Resetting of Circadian Time in Peripheral Tissues by Glucocorticoid Signaling. *Science*, 289(5488), 2344–2347.
- Bear, M. F., Kleinschmidt, A., Gu, Q., & Singer, W. (1990). Disruption of experience-dependent synaptic modifications in striate cortex by infusion of an NMDA receptor antagonist. *Journal of Neuroscience*, 10(3), 909–925.
- Bedrosian, T. A., Fonken, L. K., Walton, J. C., Haim, A., & Nelson, R. J. (2011A). Dim light at night provokes depression-like behaviors and reduces CA1 dendritic spine density in female hamsters. *Psychoneuroendocrinology*, 36(7), 1062–1069.

- Bedrosian, T. A., Fonken, L. K., Walton, J. C., & Nelson, R. J. (2011B). Chronic exposure to dim light at night suppresses immune responses in Siberian hamsters. *Biology Letters*, 7(3), 468–471.
- Bendová, Z., Sumová, A., & Mikkelsen, J. D. (2009). Circadian and developmental regulation of N-methyl-D-aspartate-receptor 1 mRNA splice variants and N-methyl-D-aspartate-receptor 3 subunit expression within the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 159(2), 599–609.
- Bendová, Z., Sládek, M., & Svobodová, I. (2012). The expression of NR2B subunit of NMDA receptor in the suprachiasmatic nucleus of Wistar rats and its role in glutamate-induced CREB and ERK1/2 phosphorylation. *Neurochemistry International*, 61(1), 43–47.
- Bendová, Z., Sumová, A., & Illnerová, H. (2004). Development of circadian rhythmicity and photoperiodic response in subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus. *Developmental Brain Research*, 148(1), 105–112.
- Bering, T., Carstensen, M. B., Wörtwein, G., Weikop, P., & Rath, M. F. (2017). The Circadian Oscillator of the Cerebral Cortex: Molecular, Biochemical and Behavioral Effects of Deleting the Arntl Clock Gene in Cortical Neurons. *Cerebral Cortex*, 28(2), 644–657.
- Berson, D. M., Dunn, F. A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science*, 295(5557), 1070–1073.
- Binkley, S., Hryshchshyn, M., & Reilly, K. (1979). N-acetyltransferase activity responds to environmental lighting in the eye as well as in the pineal gland. *Nature*, 281(5731), 479–481.
- Boivin, D. B., Duffy, J. F., Kronauer, R. E., & Czeisler, C. A. (1996). Dose-response relationships for resetting of human circadian clock by light. *Nature*, 379(6565), 540–542.
- Borniger, J. C., McHenry, Z. D., Abi Salloum, B. A., & Nelson, R. J. (2014). Exposure to dim light at night during early development increases adult anxiety-like responses. *Physiology & Behavior*, 133, 99–106.
- Brooks, E., Patel, D., & Canal, M. M. (2014). Programming of Mice Circadian Photic Responses by Postnatal Light Environment. *PLOS ONE*, 9(5), e97160.
- Brown, S. A., Zimbrunn, G., Fleury-Olela, F., Preitner, N., & Schibler, U. (2002). Rhythms of Mammalian Body Temperature Can Sustain Peripheral Circadian Clocks. *Current Biology*, 12(18), 1574–1583.
- Brown, T. M., Wynne, J., Piggins, H. D., & Lucas, R. J. (2011). Multiple hypothalamic cell populations encoding distinct visual information. *The Journal of Physiology*, 589(Pt 5), 1173–1194.
- Buhr, E. D., Yue, W. W. S., Ren, X., Jiang, Z., Liao, H.-W. R., Mei, X., Vemaraju, S., Nguyen, M.-T., Reed, R. R., Lang, R. A., Yau, K.-W., & Van Gelder, R. N. (2015). Neuropsin (OPN5)-mediated photoentrainment of local circadian oscillators in mammalian retina and cornea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(42), 13093–13098.
- Buijs, R. M., Wortel, J., Van Heerikhuize, J. J., Feenstra, M. G. P., Ter Horst, G. J., Romijn, H. J., & Kalsbeek, A. (1999). Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal

- (cortex) pathway. *European Journal of Neuroscience*, *11*(5), 1535–1544.
- Busino, L., Bassermann, F., Maiolica, A., Lee, C., Nolan, P. M., Godinho, S. I. H., Draetta, G. F., & Pagano, M. (2007). SCFFbx13 Controls the Oscillation of the Circadian Clock by Directing the Degradation of Cryptochrome Proteins. *Science*, *316*(5826), 900–904.
- Cailotto, C., Lei, J., van der Vliet, J., van Heijningen, C., van Eden, C. G., Kalsbeek, A., Pévet, P., & Buijs, R. M. (2009). Effects of nocturnal light on (clock) gene expression in peripheral organs: a role for the autonomic innervation of the liver. *PLoS One*, *4*(5), e5650.
- Cajochen, C., Frey, S., Anders, D., Späti, J., Bues, M., Pross, A., Mager, R., Wirz-Justice, A., & Stefani, O. (2011). Evening exposure to a light-emitting diodes (LED)-backlit computer screen affects circadian physiology and cognitive performance. *Journal of Applied Physiology*, *110*(5), 1432–1438.
- Cajochen, C., Zeitzer, J. M., Czeisler, C. A., & Dijk, D.-J. (2000). Dose-response relationship for light intensity and ocular and electroencephalographic correlates of human alertness. *Behavioural Brain Research*, *115*(1), 75–83.
- Camacho, F., Cilio, M., Guo, Y., Virshup, D. M., Patel, K., Khorkova, O., Styren, S., Morse, B., Yao, Z., & Keesler, G. A. (2001). Human casein kinase I δ phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2. *FEBS Letters*, *489*(2–3), 159–165.
- Cambras, T., Vilaplana, J., Torres, A., Canal, M. M., Casamitjana, N., Campuzano, A., & Díez-Noguera, A. (1998). Constant Bright Light (LL) during Lactation in Rats Prevents Arrhythmicity Due to LL. *Physiology & Behavior*, *63*(5), 875–882.
- Canal-Corretger, M. M., Vilaplana, J., Cambras, T., & Díez-Noguera, A. (2001). Functioning of the rat circadian system is modified by light applied in critical postnatal days. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *280*(4), 1023–1030.
- Canal, M. M., Mohammed, N. M., & Rodríguez, J. J. (2009). Early programming of astrocyte organization in the mouse suprachiasmatic nuclei by light. *Chronobiology International*, *26*(8), 1545–1558.
- Carlezon Jr, W. A., Duman, R. S., & Nestler, E. J. (2005). The many faces of CREB. *Trends in Neurosciences*, *28*(8), 436–445.
- Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., & Renzi, P. (2002). Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behavioural Brain Research*, *134*(1), 49–57.
- Carskadon, M. A., Acebo, C., & Jenni, O. G. (2004). Regulation of Adolescent Sleep: Implications for Behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1021*(1), 276–291.
- Chang, A.-M., Aeschbach, D., Duffy, J. F., & Czeisler, C. A. (2015). Evening use of light-emitting eReaders negatively affects sleep, circadian timing, and next-morning alertness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(4), 1232–1237.

- Chazot, P. L., & Stephenson, F. A. (1997). Molecular Dissection of Native Mammalian Forebrain NMDA Receptors Containing the NR1 C2 Exon: Direct Demonstration of NMDA Receptors Comprising NR1, NR2A, and NR2B Subunits Within the Same Complex. *Journal of Neurochemistry*, *69*(5), 2138–2144.
- Chen, E., Xu, D., Lan, X., Jia, B., Sun, L., Zheng, J. C., & Peng, H. (2013). A novel role of the STAT3 pathway in brain inflammation-induced human neural progenitor cell differentiation. *Current Molecular Medicine*, *13*(9), 1474–1484.
- Chiou, Y.-Y., Yang, Y., Rashid, N., Ye, R., Selby, C. P., & Sancar, A. (2016). Mammalian Period represses and de-represses transcription by displacing CLOCK–BMAL1 from promoters in a Cryptochrome-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(41), 6072–6079.
- Cho, C.-H., Lee, H.-J., Yoon, H.-K., Kang, S.-G., Bok, K.-N., Jung, K.-Y., Kim, L., & Lee, E.-I. (2016). Exposure to dim artificial light at night increases REM sleep and awakenings in humans. *Chronobiology International*, *33*(1), 117–123.
- Cho, J. R., Joo, E. Y., Koo, D. L., & Hong, S. B. (2013). Let there be no light: the effect of bedside light on sleep quality and background electroencephalographic rhythms. *Sleep Medicine*, *14*(12), 1422–1425.
- Choleris, E., Thomas, A. W., Kavaliers, M., & Prato, F. S. (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *25*(3), 235–260.
- Chong, N., Bernard, M., & Klein, D. (2000). Characterization of the chicken serotonin N-acetyltransferase gene. Activation via clock gene heterodimer/E box interaction. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*, 32991–32998.
- Chung, S., Lee, E. J., Yun, S., Choe, H. K., Park, S. B., Son, H. J., Kim, K. S., Dluzen, D. E., Lee, I., Hwang, O., Son, G. H., & Kim, K. (2014). Impact of circadian nuclear receptor REV-ERB α on midbrain dopamine production and mood regulation. *Cell*, *157*(4), 858–868.
- Cissé, Y. M., Peng, J., & Nelson, R. J. (2016). Dim light at night prior to adolescence increases adult anxiety-like behaviors. *Chronobiology International*, *33*(10), 1473–1480.
- Claustrat, B., Valatx, J.-L., Harthé, C., & Brun, J. (2008). Effect of Constant Light on Prolactin and Corticosterone Rhythms Evaluated Using a Noninvasive Urine Sampling Protocol in the Rat. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones et Métabolisme*, *40*, 398–403.
- Coleman, G., & Canal, M. M. (2017). Postnatal Light Effects on Pup Stress Axis Development Are Independent of Maternal Behavior. *Frontiers in Neuroscience*, *11*, 46.
- Coleman, G., Gigg, J., & Canal, M. M. (2016). Postnatal light alters hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and induces a depressive-like phenotype in adult mice. *European Journal of Neuroscience*, *44*(10), 2807–2817.
- Colwell, C. S. (2001). NMDA-evoked calcium transients and currents in the suprachiasmatic nucleus: gating by

- the circadian system. *The European Journal of Neuroscience*, *13*(7), 1420–1428.
- Colwell, C. S., Foster, R. G., & Menaker, M. (1991). NMDA receptor antagonists block the effects of light on circadian behavior in the mouse. *Brain Research*, *554*(1), 105–110.
- Coomans, C. P., van den Berg, S. A. A., Houben, T., van Klinken, J.-B., van den Berg, R., Pronk, A. C. M., Havekes, L. M., Romijn, J. A., van Dijk, K. W., Biermasz, N. R., & Meijer, J. H. (2013). Detrimental effects of constant light exposure and high-fat diet on circadian energy metabolism and insulin sensitivity. *The FASEB Journal*, *27*(4), 1721–1732.
- Costall, B., Jones, B. J., Kelly, M. E., Naylor, R. J., & Tomkins, D. M. (1989). Exploration of mice in a black and white test box: Validation as a model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *32*(3), 777–785.
- Crawley, J., & Goodwin, F. K. (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *13*(2), 167–170.
- Crawley, J. N. (1985). Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *9*(1), 37–44.
- Czeisler, C. A., Kronauer, R. E., Allan, J. S., Duffy, J. F., Jewett, M. E., Brown, E. N., & Ronda, J. M. (1989). Bright light induction of strong (type 0) resetting of the human circadian pacemaker. *Science*, *244*(4910), 1328–1333.
- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., & Schibler, U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes & Development*, *14*(23), 2950–2961.
- Davis, F. C., & Gorski, R. A. (1988). Development of hamster circadian rhythms: Role of the maternal suprachiasmatic nucleus. *Journal of Comparative Physiology A*, *162*(5), 601–610.
- de la Iglesia, H. O., Cambras, T., Schwartz, W. J., & Díez-Noguera, A. (2004). Forced Desynchronization of Dual Circadian Oscillators within the Rat Suprachiasmatic Nucleus. *Current Biology*, *14*(9), 796–800.
- Deery, M. J., Maywood, E. S., Chesham, J. E., Sládek, M., Karp, N. A., Green, E. W., Charles, P. D., Reddy, A. B., Kyriacou, C. P., Lilley, K. S., & Hastings, M. H. (2009). Proteomic Analysis Reveals the Role of Synaptic Vesicle Cycling in Sustaining the Suprachiasmatic Circadian Clock. *Current Biology*, *19*(23), 2031–2036.
- Depres-Brummer, P., Levi, F., Metzger, G., & Touitou, Y. (1995). Light-induced suppression of the rat circadian system. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *268*(5), 1111–1116.
- Dewan, K., Benloucif, S., Reid, K., Wolfe, L. F., & Zee, P. C. (2011). Light-induced changes of the circadian clock of humans: increasing duration is more effective than increasing light intensity. *Sleep*, *34*(5), 593–599.

- Ding, J. M., Chen, D., Weber, E. T., Faiman, L. E., Rea, M. A., & Gillette, M. U. (1994). Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science*, *266*(5191), 1713–1717.
- Eide, E. J., Vielhaber, E. L., Hinz, W. A., & Virshup, D. M. (2002). The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iepsilon. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(19), 17248–17254.
- Endele, S., Rosenberger, G., Geider, K., Popp, B., Tamer, C., Stefanova, I., Milh, M., Kortüm, F., Fritsch, A., Pientka, F. K., Hellenbroich, Y., Kalscheuer, V. M., Kohlhase, J., Moog, U., Rappold, G., Rauch, A., Ropers, H.-H., von Spiczak, S., Tönnies, H., Villeneuve, N., Villard, L., Zabel, B., Zenker, M., Laube, B., Reis, A., Wieczorek, D., Van Maldergem, L., Kutsche, K. (2010). Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nature Genetics*, *42*(11), 1021–1026.
- Falchi, F., Cinzano, P., Duriscoe, D., Kyba, C. C. M., Elvidge, C. D., Baugh, K., Portnov, B. A., Rybnikova, N. A., & Furgoni, R. (2016). The new world atlas of artificial night sky brightness. *Science Advances*, *2*(6), e1600377.
- Figueiro, M., & Overington, D. (2015). Self-luminous devices and melatonin suppression in adolescents. *Lighting Research & Technology*, *48*(8), 966–975.
- Figueiro, M., Wood, B., Plitnick, B., & Rea, M. (2011). The impact of light from computer monitors on melatonin levels in college students. *Neuro Endocrinology Letters*, *32*, 158–163.
- Figueiro, M., Wood, B., Plitnick, B., & Rea, M. S. (2013). The impact of watching television on evening melatonin levels. *Journal of the Society for Information Display*, *21*(10), 417–421.
- Fonken, L. K., Aubrecht, T. G., Meléndez-Fernández, O. H., Weil, Z. M., & Nelson, R. J. (2013). Dim light at night disrupts molecular circadian rhythms and increases body weight. *Journal of Biological Rhythms*, *28*(4), 262–271.
- Fonken, L. K., Kitsmiller, E., Smale, L., & Nelson, R. J. (2012). Dim Nighttime Light Impairs Cognition and Provokes Depressive-Like Responses in a Diurnal Rodent. *Journal of Biological Rhythms*, *27*(4), 319–327.
- Fonken, L. K., & Nelson, R. J. (2013). Dim light at night increases depressive-like responses in male C3H/HeNHsd mice. *Behavioural Brain Research*, *243*, 74–78.
- Fonken, L. K., Workman, J. L., Walton, J. C., Weil, Z. M., Morris, J. S., Haim, A., & Nelson, R. J. (2010). Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(43), 18664–18669.
- Foster, R. G., Provencio, I., Hudson, D., Fiske, S., De Grip, W., & Menaker, M. (1991). Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). *Journal of Comparative Physiology A*, *169*(1), 39–50.
- Freedman, M. S., Lucas, R. J., Soni, B., von Schantz, M., Muñoz, M., David-Gray, Z., & Foster, R. (1999).

- Regulation of Mammalian Circadian Behavior by Non-rod, Non-cone, Ocular Photoreceptors. *Science*, 284(5413), 502–504.
- Friard, O., & Gamba, M. (2016). BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1325–1330.
- Fujieda, H., & Sasaki, H. (2008). Expression of brain-derived neurotrophic factor in cholinergic and dopaminergic amacrine cells in the rat retina and the effects of constant light rearing. *Experimental Eye Research*, 86(2), 335–343.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., & Weitz, C. J. (1998). Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism. *Science*, 280(5369), 1564–1569.
- Gilhooley, M. J., Pinnock, S. B., & Herbert, J. (2011). Rhythmic expression of *per1* in the dentate gyrus is suppressed by corticosterone: Implications for neurogenesis. *Neuroscience Letters*, 489(3), 177–181.
- Glinka, M. E., Samuels, B. A., Diodato, A., Teillon, J., Feng Mei, D., Shykind, B. M., Hen, R., & Fleischmann, A. (2012). Olfactory deficits cause anxiety-like behaviors in mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(19), 6718–6725.
- Goel, N., Lee, T. M., & Pieper, D. R. (1998). Removal of the olfactory bulbs delays photic reentrainment of circadian activity rhythms and modifies the reproductive axis in male *Octodon degus*. *Brain Research*, 792(2), 229–236.
- Golombek, D. A., Bussi, I. L., & Agostino, P. V. (2014). Minutes, days and years: molecular interactions among different scales of biological timing. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1637), 20120465.
- González-Menéndez, I., Contreras, F., Cernuda-Cernuda, R., & García-Fernández, J. (2010A). No loss of melanopsin-expressing ganglion cells detected during postnatal development of the mouse retina. *Histology and Histopathology*, 25, 73–82.
- González-Menéndez, I., Contreras, F., Cernuda-Cernuda, R., Provencio, I., & García-Fernández, J. M. (2010B). Postnatal Development and Functional Adaptations of the Melanopsin Photoreceptive System in the Albino Mouse Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(9), 4840–4847.
- Granados-Fuentes, D., Saxena, M. T., Prolo, L. M., Aton, S. J., & Herzog, E. D. (2004). Olfactory bulb neurons express functional, entrainable circadian rhythms. *The European Journal of Neuroscience*, 19(4), 898–906.
- Guerrero-Vargas, N. N., Navarro-Espíndola, R., Guzmán-Ruiz, M. A., Basualdo, M. del C., Espitia-Bautista, E., López-Bago, A., Lascurain, R., Córdoba-Manilla, C., Buijs, R. M., & Escobar, C. (2017). Circadian disruption promotes tumor growth by anabolic host metabolism; experimental evidence in a rat model. *BMC Cancer*, 17, 625.
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V., & Cermakian, N. (2005). Differential Control of *Bmal1* Circadian Transcription by REV-ERB and ROR Nuclear Receptors. *Journal of Biological Rhythms*, 20(5), 391–403.

- Hacioglu, G., Senturk, A., Ince, I., & Alver, A. (2016). Assessment of oxidative stress parameters of brain-derived neurotrophic factor heterozygous mice in acute stress model. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, *19*(4), 388–393.
- Hill, S. M., Xiang, S., Dauchy, R. T., Wren-Dail, M., Anbalagan, M., Rowan, B., Frasch, T., & Blask, D. E. (2017). Circadian/melatonin disruption by dim light at night drives human epithelial breast cancer to a metastatic phenotype. *Cancer Research*, *77*(13 Supplement), 4897–4897.
- Hirano, T., Ishihara, K., & Hibi, M. (2000). Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*, *19*(21), 2548–2556.
- Hoffman, A. E., Zheng, T., Stevens, R. G., Ba, Y., Zhang, Y., Leaderer, D., Yi, C., Holford, T. R., & Zhu, Y. (2009). Clock-cancer connection in non-Hodgkin's lymphoma: a genetic association study and pathway analysis of the circadian gene cryptochrome 2. *Cancer Research*, *69*(8), 3605–3613.
- Horst, G. T. J. van der, Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., Wit, J. de, Verkerk, A., Eker, A. P. M., Leenen, D. van, Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H. J., & Yasui, A. (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, *398*, 627.
- Inouye, S. T., & Kawamura, H. (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic “island” containing the suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *76*(11), 5962–5966.
- Ishida, A., Mutoh, T., Ueyama, T., Bando, H., Masubuchi, S., Nakahara, D., Tsujimoto, G., & Okamura, H. (2005). Light activates the adrenal gland: Timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metabolism*, *2*(5), 297–307.
- Ivy, A. S., Brunson, K. L., Sandman, C., & Baram, T. Z. (2008). Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: a clinically relevant model for early-life stress. *Neuroscience*, *154*(3), 1132–1142.
- Jilg, A., Lesny, S., Peruzki, N., Schwegler, H., Selbach, O., Dehghani, F., & Stehle, J. H. (2010). Temporal dynamics of mouse hippocampal clock gene expression support memory processing. *Hippocampus*, *20*(3), 377–388.
- Jud, C., & Albrecht, U. (2006). Circadian Rhythms in Murine Pups Develop in Absence of a Functional Maternal Circadian Clock. *Journal of Biological Rhythms*, *21*(2), 149–154.
- Kalsbeek, A., Fliers, E., Hofman, M. A., Swaab, D. F., & Buijs, R. M. (2010). Vasopressin and the Output of the Hypothalamic Biological Clock. *Journal of Neuroendocrinology*, *22*(5), 362–372.
- Kang, S.-G., Yoon, H.-K., Cho, C.-H., Kwon, S., Kang, J., Park, Y.-M., Lee, E., Kim, L., & Lee, H.-J. (2016). Decrease in fMRI brain activation during working memory performed after sleeping under 10 lux light. *Scientific Reports*, *6*, 36731.
- Kelber, A., & Lind, O. (2010). Limits of colour vision in dim light. *Ophthalmic and Physiological Optics*, *30*(5), 454–459.

- Khalsa, S. B. S., Jewett, M. E., Cajochen, C., & Czeisler, C. A. (2003). A phase response curve to single bright light pulses in human subjects. *The Journal of Physiology*, *549*(Pt 3), 945–952.
- Klein, D., Coon, S., Roseboom, P., Weller, J. L., Bernard, M., Gastel, J. A., Zatz, M., Iuvone, P., Rodriguez, I., Bégay, V., Falcón, J., Cahill, G., Cassone, V., & Baler, R. (1997). The Melatonin Rhythm-generating Enzyme: Molecular Regulation of Serotonin N-acetyltransferase in the Pineal Gland. *Recent Progress in Hormone Research*, *52*, 307–357.
- Koblar, S. A., Turnley, A. M., Classon, B. J., Reid, K. L., Ware, C. B., Cheema, S. S., Murphy, M., & Bartlett, P. F. (1998). Neural precursor differentiation into astrocytes requires signaling through the leukemia inhibitory factor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(6), 3178–3181.
- Kojima, D., Mori, S., Torii, M., Wada, A., Morishita, R., & Fukada, Y. (2011). UV-sensitive photoreceptor protein OPN5 in humans and mice. *PLoS One*, *6*(10), 26388–26388.
- Kondratov, R. V., Kondratova, A. A., Gorbacheva, V. Y., Vykhovanets, O. V., & Antoch, M. P. (2006). Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes & Development*, *20*(14), 1868–1873.
- Kováčiková, Z., Sládek, M., Laurinová, K., Bendová, Z., Illnerová, H., & Sumová, A. (2005). Ontogenesis of photoperiodic entrainment of the molecular core clockwork in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, *1064*(1), 83–89.
- Kripke, D. F., Elliott, J. A., Youngstedt, S. D., & Rex, K. M. (2007). Circadian phase response curves to light in older and young women and men. *Journal of Circadian Rhythms*, *5*, 4.
- Kripke, D. F., Nievergelt, C. M., Joo, E., Shekhtman, T., & Kelsoe, J. R. (2009). Circadian polymorphisms associated with affective disorders. *Journal of Circadian Rhythms*, *7*, 2.
- Krout, K. E., Kawano, J., Mettenleiter, T. C., & Loewy, A. D. (2002). CNS inputs to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroscience*, *110*(1), 73–92.
- Kubová, H., Bendová, Z., Moravcová, S., Pačesová, D., Rocha, L. L., & Mareš, P. (2018). Neonatal Clonazepam Administration Induces Long-Lasting Changes in Glutamate Receptors. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*, 382.
- Kuryatov, A., Laube, B., Betz, H., & Kuhse, J. (1994). Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: Structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron*, *12*(6), 1291–1300.
- Laemle, L. K., Hori, N., Strominger, N. L., Tan, Y., & Carpenter, D. O. (2002). Physiological and anatomical properties of the suprachiasmatic nucleus of an anophthalmic mouse. *Brain Research*, *953*(1), 73–81.
- Landgraf, D., Achten, C., Dallmann, F., & Oster, H. (2015). Embryonic development and maternal regulation of murine circadian clock function. *Chronobiology International*, *32*(3), 416–427.

- Lavialle, M., Begue, A., Papillon, C., & Vilaplana, J. (2001). Modifications of retinal afferent activity induce changes in astroglial plasticity in the hamster circadian clock. *Glia*, *34*(2), 88–100.
- Lefta, M., Wolff, G., & Esser, K. A. (2011). Circadian rhythms, the molecular clock, and skeletal muscle. *Current Topics in Developmental Biology*, *96*, 231–271.
- LeGates, T. A., Fernandez, D. C., & Hattar, S. (2014). Light as a central modulator of circadian rhythms, sleep and affect. *Nature Reviews. Neuroscience*, *15*(7), 443–454.
- Lem, J., Krasnoperova, N. V., Calvert, P. D., Kosaras, B., Cameron, D. A., Nicolò, M., Makino, C. L., & Sidman, R. L. (1999). Morphological, physiological, and biochemical changes in rhodopsin knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(2), 736–741.
- Lester, R. A., & Jahr, C. E. (1992). NMDA channel behavior depends on agonist affinity. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *12*(2), 635–643.
- Lewy, A. J., Wehr, T. A., Goodwin, F. K., Newsome, D. A., & Markey, S. P. (1980). Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science*, *210*(4475), 1267–1269.
- Li, J. Z., Bunney, B. G., Meng, F., Hagenauer, M. H., Walsh, D. M., Vawter, M. P., Evans, S. J., Choudary, P. V., Cartagena, P., Barchas, J. D., Schatzberg, A. F., Jones, E. G., Myers, R. M., Watson, S. J., Akil, H., & Bunney, W. E. (2013). Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(24), 9950–9955.
- Liu, C., & Reppert, S. M. (2000). GABA Synchronizes Clock Cells within the Suprachiasmatic Circadian Clock. *Neuron*, *25*(1), 123–128.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1997). Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress. *Science*, *277*(5332), 1659–1662.
- Liu, X.-B., Murray, K. D., & Jones, E. G. (2004). Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(40), 8885–8895.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, *25*(4), 402–408.
- Llamosas, M. M., Huerta, J. J., Cernuda-Cernuda, R., & García-Fernández, J. M. (2000). Ontogeny of a photic response in the retina and suprachiasmatic nucleus in the mouse. *Developmental Brain Research*, *120*(1), 1–6.
- Lockley, S. W., Evans, E. E., Scheer, F. A. J. L., Brainard, G. C., Czeisler, C. A., & Aeschbach, D. (2006). Short-Wavelength Sensitivity for the Direct Effects of Light on Alertness, Vigilance, and the Waking Electroencephalogram in Humans. *Sleep*, *29*(2), 161–168.
- Logan, R. W., Edgar, N., Gillman, A. G., Hoffman, D., Zhu, X., & McClung, C. A. (2015). Chronic Stress

- Induces Brain Region-Specific Alterations of Molecular Rhythms that Correlate with Depression-like Behavior in Mice. *Biological Psychiatry*, 78(4), 249–258.
- Mason, R. (1991). The effects of continuous light exposure on Syrian hamster suprachiasmatic (SCN) neuronal discharge activity in vitro. *Neuroscience Letters*, 123(2), 160–163.
- McCarthy, M. J., Wei, H., Marnoy, Z., Darvish, R. M., McPhie, D. L., Cohen, B. M., & Welsh, D. K. (2013). Genetic and clinical factors predict lithium's effects on PER2 gene expression rhythms in cells from bipolar disorder patients. *Translational Psychiatry*, 3(10), 318–318.
- McGlashan, E. M., Poudel, G. R., Vidafar, P., Drummond, S. P. A., & Cain, S. W. (2018). Imaging Individual Differences in the Response of the Human Suprachiasmatic Area to Light. *Frontiers in Neurology*, 9, 1022.
- McNeill 4th, J. K., Walton, J. C., & Albers, H. E. (2018). Functional Significance of the Excitatory Effects of GABA in the Suprachiasmatic Nucleus. *Journal of Biological Rhythms*, 33(4), 376–387.
- Meijer, J. H., Colwell, C. S., Rohling, J. H. T., Houben, T., & Michel, S. (2012). Chapter 9 - Dynamic neuronal network organization of the circadian clock and possible deterioration in disease. In: *The Neurobiology of Circadian Timing*, Andries Kalsbeek, M. Merrow, T. Roenneberg, & R. Foster (Eds.), Progress in Brain Research, Elsevier, Vol. 199, pp 143-162
- Menet, J. S., Rodriguez, J., Abruzzi, K. C., & Rosbash, M. (2012). Nascent-Seq reveals novel features of mouse circadian transcriptional regulation. *ELife*, 1, 00011–00011.
- Miranda-Anaya, M., Bartell, P. A., & Menaker, M. (2002). Circadian Rhythm of Iguana Electroretinogram: The Role of Dopamine and Melatonin. *Journal of Biological Rhythms*, 17(6), 526–538.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., & Seeburg, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12(3), 529–540.
- Moore, R. Y., & Speh, J. C. (1993). GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neuroscience Letters*, 150(1), 112–116.
- Moore, R. Y., Speh, J. C., & Patrick Card, J. (1995). The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *Journal of Comparative Neurology*, 352(3), 351–366.
- Moravcová, S., Pačesová, D., Melkes, B., Kyclerová, H., Spišská, V., Novotný, J., & Bendová, Z. (2018). The day/night difference in the circadian clock's response to acute lipopolysaccharide and the rhythmic Stat3 expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *PLOS ONE*, 13(9), 0199405.
- Moriya, T., Yoshinobu, Y., Kouzu, Y., Katoh, A., Gomi, H., Ikeda, M., Yoshioka, T., Itohara, S., & Shibata, S. (2000). Involvement of glial fibrillary acidic protein (GFAP) expressed in astroglial cells in circadian rhythm under constant lighting conditions in mice. *Journal of Neuroscience Research*, 60(2), 212–218.
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., & Nakanishi, S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*, 354(6348), 31–37.

- Munekawa, K., Tamada, Y., Iijima, N., Hayashi, S., Ishihara, A., Inoue, K., Tanaka, M., & Ibata, Y. (2000). Development of Astroglial Elements in the Suprachiasmatic Nucleus of the Rat: With Special Reference to the Involvement of the Optic Nerve. *Experimental Neurology*, *166*(1), 44–51.
- Nagano, M., Adachi, A., Nakahama, K., Nakamura, T., Tamada, M., Meyer-Bernstein, E., Sehgal, A., & Shigeyoshi, Y. (2003). An abrupt shift in the day/night cycle causes desynchrony in the mammalian circadian center. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(14), 6141–6151.
- Nakashima, K., Wiese, S., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Yoshida, K., Kishimoto, T., Sendtner, M., & Taga, T. (1999). Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte differentiation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *19*(13), 5429–5434.
- Navarrete, E., Ortega-Bernal, J. R., Trejo-Muñoz, L., Díaz, G., Montúfar-Chaveznavá, R., & Caldeas, I. (2016). Participation of the Olfactory Bulb in Circadian Organization during Early Postnatal Life in Rabbits. *PLoS One*, *11*(6), 0156539–0156539.
- Nielsen, H. S., Hannibal, J., & Fahrenkrug, J. (2002). Vasoactive intestinal polypeptide induces per1 and per2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus late at night. *European Journal of Neuroscience*, *15*(3), 570–574.
- Nikonov, S. S., Kholodenko, R., Lem, J., & Pugh Jr, E. N. (2006). Physiological features of the S- and M-cone photoreceptors of wild-type mice from single-cell recordings. *The Journal of General Physiology*, *127*(4), 359–374.
- Nishino, H., Koizumi, K., & Brooks, C. M. (1976). The role of suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus in the production of circadian rhythm. *Brain Research*, *112*(1), 45–59.
- Ohta, H., Yamazaki, S., & McMahon, D. G. (2005). Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nature Neuroscience*, *8*, 267.
- Ota, W., Nakane, Y., Hattar, S., & Yoshimura, T. (2018). Impaired Circadian Photoentrainment in *Opn5*-Null Mice. *iScience*, *6*, 299–305.
- Pakhotin, P., Harmar, A. J., Verkhatsky, A., & Piggins, H. (2006). VIP receptors control excitability of suprachiasmatic nuclei neurones. *Pflügers Archiv*, *452*(1), 7–15.
- Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., Schultz, P. G., Kay, S. A., Takahashi, J. S., & Hogenesch, J. B. (2002A). Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock. *Cell*, *109*(3), 307–320.
- Panda, S., Sato, T. K., Castrucci, A. M., Rollag, M. D., DeGrip, W. J., Hogenesch, J. B., Provencio, I., & Kay, S. A. (2002B). Melanopsin (*Opn4*) Requirement for Normal Light-Induced Circadian Phase Shifting. *Science*, *298*(5601), 2213–2216.
- Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D. W., Maestroni, G. J. M., Zisapel, N., & Cardinali, D.

- P. (2008). Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in Neurobiology*, 85(3), 335–353.
- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 383–400.
- Park, H., & Poo, M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(1), 7–23.
- Pavlovski, I., Evans, J. A., & Mistlberger, R. E. (2018). Feeding Time Entrain the Olfactory Bulb Circadian Clock in Anosmic PER2::LUC Mice. *Neuroscience*, 393, 175–184.
- Peichl, L. (2005). Diversity of mammalian photoreceptor properties: Adaptations to habitat and lifestyle? *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 287A(1), 1001–1012.
- Perreau-Lenz, S., Kalsbeek, A., Garidou, M.-L., Wortel, J., Van Der Vliet, J., Van Heijningen, C., Simonneaux, V., Pévet, P., & Buijs, R. M. (2003). Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *European Journal of Neuroscience*, 17(2), 221–228.
- Possidente, B., Lumia, A. R., McGinnis, M. Y., Teicher, M. H., DeLemos, E., Sterner, L., & Deros, L. (1990). Olfactory bulb control of circadian activity rhythm in mice. *Brain Research*, 513(2), 325–328.
- Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., & Schibler, U. (2002). The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB α Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Cell*, 110(2), 251–260.
- Provencio, I., Rodriguez, I. R., Jiang, G., Hayes, W. P., Moreira, E. F., & Rollag, M. D. (2000). A Novel Human Opsin in the Inner Retina. *The Journal of Neuroscience*, 20(2), 600–605.
- Provencio, I., Rollag, M. D., & Castrucci, A. M. (2002). Photoreceptive net in the mammalian retina. *Nature*, 415(6871), 493.
- Rahman, S. A., Wright Jr, K. P., Lockley, S. W., Czeisler, C. A., & Gronfier, C. (2019). Characterizing the temporal Dynamics of Melatonin and Cortisol Changes in Response to Nocturnal Light Exposure. *Scientific Reports*, 9(1), 19720.
- Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C., & Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247(4945), 975–978.
- Rapp, L. M., & Williams, T. P. (1980). The role of ocular pigmentation in protecting against retinal light damage. *Vision Research*, 20(12), 1127–1131.
- Rath, M. F., Rohde, K., Fahrenkrug, J., & Möller, M. (2013). Circadian clock components in the rat neocortex: daily dynamics, localization and regulation. *Brain Structure and Function*, 218(2), 551–562.
- Rath, M. F., Rovsing, L., & Möller, M. (2014). Circadian oscillators in the mouse brain: molecular clock components in the neocortex and cerebellar cortex. *Cell and Tissue Research*, 357(3), 743–755.

- Reddy, A. B., Karp, N. A., Maywood, E. S., Sage, E. A., Deery, M., O'Neill, J. S., Wong, G. K. Y., Chesham, J., Odell, M., Lilley, K. S., Kyriacou, C. P., & Hastings, M. H. (2006). Circadian Orchestration of the Hepatic Proteome. *Current Biology*, *16*(11), 1107–1115.
- Reed, H. E., Cutler, D. J., Brown, T. M., Brown, J., Coen, C. W., & Piggins, H. D. (2002). Effects of vasoactive intestinal polypeptide on neurones of the rat suprachiasmatic nuclei in vitro. *Journal of Neuroendocrinology*, *14*(8), 639–646.
- Riva, M. A., Tascetta, F., Molteni, R., & Racagni, G. (1994). Regulation of NMDA receptor subunit mRNA expression in the rat brain during postnatal development. *Molecular Brain Research*, *25*(3), 209–216.
- Roman, E., & Karlsson, O. (2013). Increased anxiety-like behavior but no cognitive impairments in adult rats exposed to constant light conditions during perinatal development. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, *118*(4), 222–227.
- Roseboom, P. H., Coon, S. L., Baler, R., McCune, S. K., Weller, J. L., & Klein, D. C. (1996). Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology*, *137*(7), 3033–3044.
- Rosenfeld, P. J., Cowley, G. S., McGee, T. L., Sandberg, M. A., Berson, E. L., & Dryja, T. P. (1992). A Null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nature Genetics*, *1*(3), 209–213.
- Ruby, N. F., Fernandez, F., Garrett, A., Klima, J., Zhang, P., Sapolsky, R., & Heller, H. C. (2013). Spatial memory and long-term object recognition are impaired by circadian arrhythmia and restored by the GABA_AAntagonist pentylentetrazole. *PloS One*, *8*(8), 72433–72433.
- Rüger, M., St Hilaire, M. A., Brainard, G. C., Khalsa, S.-B. S., Kronauer, R. E., Czeisler, C. A., & Lockley, S. W. (2013). Human phase response curve to a single 6.5 h pulse of short-wavelength light. *The Journal of Physiology*, *591*(1), 353–363.
- Rummel, C. (2016). Inflammatory transcription factors as activation markers and functional readouts in immune-to-brain communication. *Brain, Behavior, and Immunity*, *54*, 1–14.
- Sato, T. K., Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., McNamara, P., Naik, K. A., FitzGerald, G. A., Kay, S. A., & Hogenesch, J. B. (2004). A Functional Genomics Strategy Reveals Rora as a Component of the Mammalian Circadian Clock. *Neuron*, *43*(4), 527–537.
- Schnapf, J. L., Kraft, T. W., & Baylor, D. A. (1987). Spectral sensitivity of human cone photoreceptors. *Nature*, *325*(6103), 439–441.
- Schnapf, J. L., Nunn, B. J., Meister, M., & Baylor, D. A. (1990). Visual transduction in cones of the monkey *Macaca fascicularis*. *The Journal of Physiology*, *427*, 681–713.
- Seney, M. L., Cahill, K., Enwright, J. F., Logan, R. W., Huo, Z., Zong, W., Tseng, G., & McClung, C. A. (2019). Diurnal rhythms in gene expression in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Nature Communications*, *10*(1), 3355.

- Shearman, L. P., Zylka, M. J., Weaver, D. R., Kolakowski Jr., L. F., & Reppert, S. M. (1997). Two period Homologs: Circadian Expression and Photic Regulation in the Suprachiasmatic Nuclei. *Neuron*, *19*(6), 1261–1269.
- Shepherd, J. K., Grewal, S. S., Fletcher, A., Bill, D. J., & Dourish, C. T. (1994). Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated “zero-maze” as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology*, *116*(1), 56–64.
- Shinohara, K., Funabashi, T., Mitushima, D., & Kimura, F. (2000). Effects of gap junction blocker on vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide rhythms in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neuroscience Research*, *38*(1), 43–47.
- Smith, L., & Canal, M. M. (2009). Expression of Circadian Neuropeptides in the Hypothalamus of Adult Mice is Affected by Postnatal Light Experience. *Journal of Neuroendocrinology*, *21*(11), 946–953.
- Speh, J. C., & Moore, R. Y. (1993). Retinohypothalamic tract development in the hamster and rat. *Developmental Brain Research*, *76*(2), 171–181.
- Stell, B. M., & Mody, I. (2002). Receptors with different affinities mediate phasic and tonic GABA(A) conductances in hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *22*(10), 223–223.
- Stokkan, K.-A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., & Menaker, M. (2001). Entrainment of the Circadian Clock in the Liver by Feeding. *Science*, *291*(5503), 490–493.
- Storch, K.-F., Paz, C., Signorovitch, J., Raviola, E., Pawlyk, B., Li, T., & Weitz, C. J. (2007). Intrinsic circadian clock of the mammalian retina: importance for retinal processing of visual information. *Cell*, *130*(4), 730–741.
- Strecker, G. J., Wuarin, J.-P., & Dudek, F. E. (1997). GABAA-Mediated Local Synaptic Pathways Connect Neurons in the Rat Suprachiasmatic Nucleus. *Journal of Neurophysiology*, *78*(4), 2217–2220.
- Sudo, M., Sasahara, K., Moriya, T., Akiyama, M., Hamada, T., & Shibata, S. (2003). Constant light housing attenuates circadian rhythms of mPer2 mRNA AND mPER2 protein expression in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Neuroscience*, *121*(2), 493–499.
- Taalman, H., Wallace, C., & Milev, R. (2017). Olfactory Functioning and Depression: A Systematic Review. *Frontiers in Psychiatry*, *8*, 190.
- Takeda, K., & Akira, S. (2000). STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *11*(3), 199–207.
- Tosini, G., & Menaker, M. (1996). Circadian Rhythms in Cultured Mammalian Retina. *Science*, *272*(5260), 419–421.
- Trávníčková-Bendová, Z., Cermakian, N., Reppert, S. M., & Sassone-Corsi, P. (2002). Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 99(11), 7728–7733.

- Turek, F. W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, A., Olson, S., Easton, A., Jensen, D. R., Eckel, R. H., Takahashi, J. S., & Bass, J. (2005). Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5724), 1043–1045.
- Verma, P., Hellems, K. G. C., Choi, F. Y., Yu, W., & Weinberg, J. (2010). Circadian phase and sex effects on depressive/anxiety-like behaviors and HPA axis responses to acute stress. *Physiology & Behavior*, 99(3), 276–285.
- Vimal, R. L. P., Pandey-Vimal, M.-U. C., Vimal, L.-S. P., Frederick, B. B., Stopa, E. G., Renshaw, P. F., Vimal, S. P., & Harper, D. G. (2009). Activation of suprachiasmatic nuclei and primary visual cortex depends upon time of day. *European Journal of Neuroscience*, 29(2), 399–410.
- Vujović, N., Davidson, A. J., & Menaker, M. (2008). Sympathetic input modulates, but does not determine, phase of peripheral circadian oscillators. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295(1), 355–360.
- Waddington Lamont, E., Harbour, V. L., Barry-Shaw, J., Renteria Diaz, L., Robinson, B., Stewart, J., & Amir, S. (2007). Restricted access to food, but not sucrose, saccharine, or salt, synchronizes the expression of Period2 protein in the limbic forebrain. *Neuroscience*, 144(2), 402–411.
- Walton, J. C., McNeill, J. K., Oliver, K. A., & Albers, H. E. (2017). Temporal Regulation of GABA(A) Receptor Subunit Expression: Role in Synaptic and Extrasynaptic Communication in the Suprachiasmatic Nucleus. *ENeuro*, 4(2), ENEURO.0352-16.2017.
- Wang, D., Opperhuizen, A.-L., Reznick, J., Turner, N., Su, Y., Cooney, G. J., & Kalsbeek, A. (2017A). Effects of feeding time on daily rhythms of neuropeptide and clock gene expression in the rat hypothalamus. *Brain Research*, 1671, 93–101.
- Wang, L. M., Schroeder, A., Loh, D., Smith, D., Lin, K., Han, J. H., Michel, S., Hummer, D. L., Ehlen, J. C., Albers, H. E., & Colwell, C. S. (2008). Role for the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor in mediating light input to the circadian system. *The European Journal of Neuroscience*, 27(7), 1771–1779.
- Wang, Y., Kuang, Z., Yu, X., Ruhn, K. A., Kubo, M., & Hooper, L. V. (2017B). The intestinal microbiota regulates body composition through NFIL3 and the circadian clock. *Science*, 357(6354), 912–916.
- Welsh, D. K., Logothetis, D. E., Meister, M., & Reppert, S. M. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, 14(4), 697–706.
- Wood, B., Rea, M. S., Plitnick, B., & Figueiro, M. G. (2013). Light level and duration of exposure determine the impact of self-luminous tablets on melatonin suppression. *Applied Ergonomics*, 44(2), 237–240.
- Xiang, S., Dauchy, R. T., Hoffman, A. E., Pointer, D., Frasch, T., Blask, D. E., & Hill, S. M. (2019). Epigenetic inhibition of the tumor suppressor ARHI by light at night-induced circadian melatonin disruption mediates STAT3-driven paclitaxel resistance in breast cancer. *Journal of Pineal Research*, 67(2), e12586.

- Yamamoto, S., Shigeyoshi, Y., Ishida, Y., Fukuyama, T., Yamaguchi, S., Yagita, K., Moriya, T., Shibata, S., Takashima, N., & Okamura, H. (2001). Expression of the Per1 gene in the hamster: Brain atlas and circadian characteristics in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, *430*(4), 518–532.
- Ye, R., Selby, C. P., Chiou, Y.-Y., Ozkan-Dagliyan, I., Gaddameedhi, S., & Sancar, A. (2014). Dual modes of CLOCK:BMAL1 inhibition mediated by Cryptochrome and Period proteins in the mammalian circadian clock. *Genes & Development*, *28*(18), 1989–1998.
- Zeitzer, J. M., Dijk, D. J., Kronauer, R., Brown, E., & Czeisler, C. (2000). Sensitivity of the human circadian pacemaker to nocturnal light: melatonin phase resetting and suppression. *The Journal of Physiology*, *526 Pt 3*(Pt 3), 695–702.
- Zhang, R., Lahens, N. F., Ballance, H. I., Hughes, M. E., & Hogenesch, J. B. (2014). A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(45), 16219–16224.
- Zheng, B., Albrecht, U., Kasik, K., Sage, M., Lu, W., Vaishnav, S., Li, Q., Sun, Z. S., Eichele, G., Bradley, A., & Lee, C. C. (2001). Nonredundant Roles of the mPer1 and mPer2 Genes in the Mammalian Circadian Clock. *Cell*, *105*(5), 683–694.
- Zhong, J., Carrozza, D. P., Williams, K., Pritchett, D. B., & Molinoff, P. B. (1995). Expression of mRNAs Encoding Subunits of the NMDA Receptor in Developing Rat Brain. *Journal of Neurochemistry*, *64*(2), 531–539.