

Univerzita Karlova v Praze

3. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Cirkadiánní systém v periferních hodinách u
neurodegenerativních a afektivních onemocnění
a jeho synchronizace v podmínkách stálého
světla

Kamila Weissová

Praha 2020

Doktorské studijní programy v biomedicíně

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: Neurovědy

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jan Laczó, Ph.D.

Školící pracoviště: Národní ústav duševního zdraví

Autor: Kamila Weissová

Školitel: PhDr. Jana Kopřivová, Ph.D.

Oponenti:

.....
.....
.....

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: v hod.
kde
.....

S disertací je možno se seznámit na děkanátě
..... fakulty Univerzity Karlovy v Praze

Obsah

1. ÚVOD	6
2. CÍLE PRÁCE	10
3. PROTOKOL EXPERIMENTŮ A METODIKA....	11
4. VÝSLEDKY	14
5. DISKUZE	17
6. POUŽITÁ LITERATURA	22
7. SEZNAM POUBLIKACÍ.....	26

Souhrn

Cirkadiánní systém hraje významnou roli ve fyziologii i patofyziologii člověka. Tento systém je řízen ze suprachiasmatických jader nacházející se v hypotalamu.

Narušení tohoto systému u člověka je často spojováno s rozvojem afektivních poruch či neurodegenerativních onemocnění.

V první části práce jsem se pokusila identifikovat změny cirkadiánního systému člověka v průběhu raných stadií neurodegenerativních onemocnění. První studie sledovala pacienty s Alzheimerovou nemocí, u nichž jsme zjistili úbytek noční produkce melatoninu. V druhé studii jsme sledovali pacienty s poruchou chování v REM fázi spánku, která je spojována s pozdějším rozvojem Parkinsonovy nemoci.

V další části práce jsem sledovala schopnost cirkadiánního systému člověka vyrovnat se s podmínkami polárního dne, tedy v podmínkách bez přirozeného střídání světla a tmy. Tato studie ukázala, že vlivem polárního dne došlo k fázovému zpoždění rytmické tvorby melatoninu a pohybové aktivity. Expresí hodinových genů nebyla těmito podmínkami významně ovlivněna.

Ve třetí části práce jsem se zabývala studiem cirkadiánních rytmů pacientů s bipolární poruchou v buněčných kulturách transformovaných lymfocytů a post mortem cirkadiánních oscilací v předním cingulu u pacientů s unipolární depresí. Zvolený model *in vitro* se pro studium cirkadiánních oscilací ukázal jako nevhodný.

Celotranskriptomová cirkadiánní analýza tkáně předního cingula získaná post-mortem od pacientů s unipolární depresí v porovnání se zdravými subjekty odhalila ztrátu rytmických oscilací klíčových hodinových genů v této struktuře.

Summary

The circadian system plays an important role in human physiology and pathophysiology. This system is controlled by suprachiasmatic nucleus located in the hypothalamus.

Disruption of this system in humans is often associated with the development of affective disorders or neurodegenerative diseases..

The first study was focused at patients with Alzheimer's disease, in whom we found a decrease in nocturnal melatonin production. In the second study, we studied patients with a REM behavioral disorder, which is associated with development of Parkinson's disease

In the second part of the thesis, I studied the ability of the human circadian system to cope with the conditions of the polar day. Our subjects were exposed to a day cycle lacking the natural alternation between a light and dark period. The study showed that the polar day affected melatonin onset, its production was rhythmic but significantly delayed in the same fashion as with physical activity. The clock genes expression in peripheral clocks remained unaffected.

The last part of the thesis was focused on the circadian rhythms in patients with bipolar disorder studied *in vitro* in transformed lymphocytes and post-mortem circadian oscillations in the anterior cingulate in patients with unipolar depression. Unfortunately, we found that transformed lymphocytes are not suitable for studying the circadian oscillations.

The results from the whole-transcriptom circadian analysis in anterior cingulate from unipolar patients revealed a loss of rhythmic oscillations of the core clock genes compared to healthy controls.

1. ÚVOD

Cirkadiánní systém

Cirkadiánní rytmy jsou obecně charakterizovány jako endogenní biologické cykly opakující se s přibližně 24h periodou. Mechanismus cirkadiánních rytmů je endogenní, to znamená, že běží i nezávisle na vnějších podmínkách, tedy například v podmínkách konstantní tmy. Endogenní rytmus je charakterizován vlastní periodou tau (τ), která se mírně liší od přesně 24hodinové periody solárního cyklu na Zemi. Celý cirkadiánní mechanismus je citlivý na synchronizaci s vnějším časem, která je pro jeho funkci zcela zásadní. Nesynchronizované vnitřní hodiny by měly neustálou tendenci se předbíhat nebo zpoždovat v závislosti na tom, zda je jejich vnitřní perioda kratší či delší než 24h délka dne. Silný synchronizační potenciál má především světlo, příjem potravy, fyzická aktivita nebo sociální interakce.

Centrální hodinový oscilátor

Centrum cirkadiánních hodin se nachází v suprachiasmatických jádrech (SCN) odkud jsou řízeny veškeré rytmy s denní periodou. Mezi tyto rytmy patří například rytmus spánku a bdění, rytmus tělesné teploty, sekrece některých hormonů nebo i exprese řady genů (Hastings, Maywood and Brancaccio, 2018). SCN jsou párovou strukturou tvořenou dvěma buněčnými subpopulacemi tzv. „core“ a „shell“. Do „core“ jsou vedené především vstupní dráhy synchronizující vnitřní hodiny s vnějšími podmínkami. Z „shell“ především vycházejí dráhy do další mozkových oblastí. Neurony SCN vytvářejí hustou komunikační síť, ve které důležitou úlohu hrají kromě neurotransmiterů i neuropeptidy a výstupem této sítě je jednotný robustní rytmus (Welsh *et al.*, 1995; Leak, Card and Moore, 1999).

Hodinový molekulární mechanismus

Na molekulární úrovni jsou vnitřní hodiny řízené vzájemnou interakcí zpětnovazebných transkripčně translačních smyček tzv. hodinových genů a jejich proteinových produktů. Jedná se o samoudržující se mechanismus aktivací a represí jednotlivých komponent. Mezi klíčové hodinové geny patří Period 1, 2, 3 geny, dále Cryptochrom 1 a 2, hodinový gen Clock, Bmal1, Kasein kinase 1 epsilon, transkripční faktor Rev-erba (nazývaná

těž Nr1d1) a jaderný receptor Rora (Hastings, Maywood and Brancaccio, 2019).

Hodiny v periferních strukturách

SCN není jedinou strukturou generující cirkadiánní rytmy, další cirkadiánní oscilátory se nacházejí jak v mnoha strukturách CNS, tak i ve většině periferních orgánů (srdce, plíce, střevo, játra, ledviny, kosterní sval, kůže, periferní jaderné krevní buňky aj.). Cirkadiánní rytmy nejsou tedy výstupem jedné struktury, ale jsou výsledkem kooperace celého multioscilačního systému. SCN jsou v této hierarchii ostatním oscilátorům funkčně nadřazeny a fungují jako centrální pacemaker, zajišťující především světelnou synchronizaci systému. Vnitřní synchronizace SCN s periferními oscilátory je zajišťována neurohumorálními signály (Hastings, Reddy and Maywood, 2003).

Synchronizace cirkadiánního systému

Světelná synchronizace

Výsadou centrálního oscilátoru je jeho unikátní schopnost synchronizace s vnějšími světelnými podmínkami. Střídání světla a tmy během dne a noci je vnímáno neuronální sítí SCN, která následně informuje periferní oscilátory a indukuje kompresi či dekompresi cirkadiánních rytmů tak, aby odpovídaly měnícímu se poměru délky světlé a tmavé části dne v průběhu roku. Celý synchronizační mechanismus je na světlo citlivý pouze v omezených časových úsecích, kterými je doba stmívání (raná fáze subjektivní noci) a doba rozednávání (pozdní fáze subjektivní noci). Efektivita světelné synchronizace současně závisí i na délce světelné stimulace, na spektrálním složení a na její intenzitě (Lucas *et al.*, 2014).

Nesvětelná synchronizace

Mechanismy synchronizace vnitřních hodin nesvětelnými synchronizačními podněty jsou poměrně rozsáhle popsány u řady druhů laboratorních zvířat. Přes to, že nesvětelná synchronizace hraje vedle světelné spíše druhořadou roli, není její význam zanedbatelný. Mezi významné nesvětelné synchronizátory patří především pravidelně podávaná potrava, pravidelná pohybová aktivita nebo sociální interakce.

Desynchronizace hodin a její dopad na duševní zdraví

Desynchronizace s vnějším prostředím nebo desynchronizace jednotlivých vnitřních hodin mezi sebou vede k rozvratu celkové vnitřní homeostázy a

celý hodinový komplex tvořený centrálními hodinami a řadou periferních hodin přestává plnit svoji funkci.

Desynchronizace může probíhat na 3 základních úrovních.

1) Centrální hodiny nedostávají dostatečně silné synchronizační signály, které by umožnily udržet hodiny synchronizované s vnějším prostředím. Chod hodin je následně oslabován a synchronizace systému slábne.

2) Vlivem konfliktních synchronizačních signálů dochází k odklonu synchronizace periferních hodin od hodin centrálních. Nejextrémnější případ takové desynchronizace je práce v rotačním směnném provozu, kde je synchronizační světelný signál přítomen v neadekvátní části dne. Současně tento režim bývá doprovázen příjmem potravy v nočních hodinách. Tyto konfliktní synchronizační signály vedou k rozpojení synchronizace centrálních a periferních hodin, destabilizaci systému vnitřních hodin a velmi pravděpodobně jsou příčinou řady zdravotních komplikací. Prokazatelně například zvyšují incidenci kardiovaskulárních, obezitologických a onkologických onemocnění (Davis and Mirick, 2006; Antunes *et al.*, 2010; Hermansson *et al.*, 2019)

3) Dochází k zeslabenému přenosu synchronizačních signálů z centrálních hodin k hodinám v periferních strukturách. Chod periferních hodin se pod vlivem slabých synchronizačních signálů a snižující se amplitudy cirkadiánních oscilací z centrálních hodin začne vzájemně fázově rozcházet.

Desynchronizační událost, jako je například přelet více časových pásem, práce v noci, (Inder, Crowe and Porter, 2016), spánková deprivace nebo časté narušování chodu hodin nepravidelným životním režimem, může působit jako spouštěcí signál afektivních onemocnění (Katz *et al.*, 2002).

Celá řada studií poukazuje na to, že CS hraje roli v patofyziologii některých neuropsychiatrických, neurodegenerativních a spánkových onemocnění. U těchto onemocnění jsou typicky popisovány změny v rytmu spánku a bdění, v tělesné teplotě, rytmu některých hormonů, jako např. v hladině kortizolu nebo melatoninu, ale i změny na úrovni samotného regulačního mechanismu vnitřních biologických hodin.

Desynchronizace a afektivní poruchy

SCN je centrální a hierarchicky nadřazený oscilátor, který udržuje cirkadiánní systém hodin synchronizovaný s vnějšími podmínkami. Vlivem úbytku synchronizačních stimulů či například vlivem genetických predispozic, které mohou citlivost systému k synchronizačním stimulům

snížovat, může docházet k oslabení synchronizace mezi centrálním oscilátorem a oscilátory periferními. Desynchronizace, snížení amplitudy nebo fázové posunutí rytmických oscilací bylo sledováno např. u pacientů s unipolární depresí (UD), a to i na úrovni genové exprese v několika mozkových strukturách (Li *et al.*, 2013). S cirkadiálním systémem úzce interaguje také řada léků užívaných k léčbě afektivních poruch a úspěšnost léčby často souvisí se zlepšením cirkadiálních rytmů pacienta. Na zdravotní stav pacienta má současně příznivé účinky striktní denní režim, tzv. „social rhythm therapy“, kdy pacient pravidelně vstává i uléhá ve stejnou hodinu (Leibenluft and Suppes, 1999; Wehr, 2018)

Desynchronizace a neurodegenerativní onemocnění

Narušení 24h cirkadiálního rytmu je běžným jevem, ke kterému v průběhu stárnutí dochází. Ukazuje se ovšem, že tyto projevy jsou mnohem závažnější u osob trpících neurodegenerativními onemocněními, jako je Alzheimerova nemoc, mírná kognitivní porucha nebo Parkinsonova nemoc. Nejčastěji se projevují nepravidelností spánkového rytmu, sníženou denní pohybovou aktivitou vedoucí k oslabení pravidelnosti rytmu spánku a bdění, snížením amplitudy rytmické produkce melatoninu a tendencí k fázovému předběhnutí spánkového rytmu, rytmu vnitřní tělesné teploty nebo produkce melatoninu (Naismith *et al.*, 2014; Ortiz-Tudela *et al.*, 2014; Hooghiemstra *et al.*, 2015; Weissová *et al.*, 2016). Ukazuje se, že právě narušené cirkadiální rytmy mohou být detekovány ještě před propuknutím těchto onemocnění, a mohly by tak sloužit jako první signály rozvíjejícího se neurodegenerativního onemocnění (Musiek *et al.*, 2018). Neurodegenerativní procesy narušují dráhy vedoucí ze SCN i integritu samotných SCN. Výsledkem těchto procesů je oslabování amplitudy cirkadiálních rytmů a oslabování celkové synchronizace centrálních a periferních hodin. Výsledkem narušené integrity cirkadiálního systému je destabilizovaná vnitřní homeostáza, což dále vede ke zhoršování projevů neurodegenerativních onemocnění. Naopak platí, že méně robustní cirkadiální rytmus a fragmentovanější pohybová aktivita vlivem jiných okolností, např. nedostatečnou synchronizací, jsou rizikovým faktorem pro rozvoj mírné kognitivní poruchy či demence (Tranah *et al.*, 2011).

2. CÍLE PRÁCE

1. Identifikace časných změn cirkadiánních rytmů v raných fázích neurodegenerativních onemocnění (Projekt 1, Projekt 2)

V této části jsme se věnovali dvěma nejrozšířenějším neurodegenerativním onemocněním, Alzheimerově nemoci a poruše chování v REM spánku, u které se ukazuje, že bývá časným projevem PN.

2. Synchronizace cirkadiánního systému člověka v podmínkách stálého světla (Projekt 3)

V této terénní studii jsme využili možnosti sledovat české polární výzkumníky pobývající v letním období na výzkumné stanici na Svalbardu (Špicberky), tedy v podmínkách polárního dne. Cílem práce bylo určit, zda nesvětelné synchronizační podněty (pravidelný denní režim: společenské interakce, pravidelný příjem potravy, fyzická aktivita) budou sloužit jako dostatečný synchronizační signál vnitřních hodin.

3. Oscilace hodinových genů před aplikací lithia a po ní v buněčné kultuře transformovaných lymfocytů získaných od Li-R a Li-NR BAP pacientů (Projekt 4)

Cílem tohoto projektu bylo otestovat možnost využití transformovaných lymfocytů v cirkadiánním experimentu a následně otestovat vliv lithia na molekulární hodinový mechanismus u Li-R a Li-NR BAP pacientů.

4. Cirkadiánní oscilace transkriptomu v předním cingulu pacientů s unipolární depresí (Projekt 5)

V této práci jsme sledovali cirkadiánní rytmy celého transkriptomu ve vzorku předního cingula (BA24), odebraného post mortem od pacientů s UD, a porovnávala ho s transkriptomem zdravých subjektů. Naším cílem bylo zjistit, zda u pacientů došlo ke ztrátě rytmických oscilací transkriptomu, a to především v klíčových genech zodpovědných za funkci molekulárních hodin.

3. PROTOKOL EXPERIMENTŮ A METODIKA

Projekt 1:

Studie cirkadiánního systému v rané fázi Alzheimerovy nemoci

Participantů a protokol studie

Do studie bylo zapojeno 13 zdravých kontrolních subjektů (6 žen a 7 mužů) a 13 pacientů s AN (7 žen a 6 mužů). Pacienti s AN vykazovali zhoršené výsledky v MMSE v porovnání s kontrolami.

Pacienti a kontroly si samostatně v domácí prostředí odebírali vzorky slin a bukalních stěrů. Odběry prováděli každé 2–4 h od prvního odběru v 7:00 až do následujícího dne stejného času.

Projekt 2:

Studie cirkadiánního systému pacientů s poruchou chování v REM fázi spánku

Participantů a protokol studie

Do studie bylo zařazeno 10 mužů s diagnostikovanou poruchou chování v REM ($76 \pm 3,4$ let) a 9 věkově i genderově srovnatelných kontrolních subjektů ($73 \pm 4,2$ let).

Experiment byl prováděn v kontrolovaných podmínkách spánkové laboratoře NUDZ podle protokolu tzv. semikonstantní rutiny. Subjektům byly odebírány krevní vzorky do odběrových zkumavek EDTA (VACUETTE® 4 ml K3 EDTA) po dobu 24 hodin v časech 10 h, 13 h, 16 h, 19 h, 22 h, 1 h, 4 h, 7 h a 10 h. Ze vzorku byla separována krevní plazma pro stanovení melatoninu a krevní periferní jednojaderné buňky (PBMCs), ze kterých byla izolována RNA.

Projekt 3:

Synchronizace cirkadiánního systému člověka v podmínkách stálého světla

Tato část práce byla zaměřena na vliv stálého světla na cirkadiánní systém člověka v přirozených podmínkách. Pro průběh této studie byla zvolena lokalita za polárním kruhem na souostroví Svalbard (Špicberky), kde v letních měsících panuje polární den.

Participantů a protokol studie

Studie probíhala ve dvou fázích, v každé fázi využívala stejný protokol. První fáze proběhla v České republice 14 dní před odjezdem na Svalbard. Druhá fáze probíhala od příjezdu na Svalbard a trvala také 14 dní. Do studie bylo zapojeno 5 mužů a 5 žen. Rytmus spánku a bdění byl nahráván

pomocí náramkového aktigrafu typu MotionWatch 8 (Cambridge, Neurotechnology Ltd, UK) a záznam byl doplněn o zápisy do spánkového kalendáře. Sledování spánku a pohybové aktivity probíhalo 10–14 dní před odjezdem na Svalbard. Účastníci studie v průběhu experimentu dodržovali svůj běžný denní rytmus. Odběry vzorků slin a bukalních stěrů provedly subjekty samostatně podle přesných instrukcí, proběhly 1–3 dny před odjezdem na Svalbard. Odběry vzorků začaly v 7 h ráno, další odběry následovaly vždy ve 4h intervalu po 24 h. Měření pohybové aktivity pokračovala po následující dobu 14denního pobytu na Svalbardu. Po 14dnech proběhlo opětovné odebrání vzorků slin a bukalních stěrů podle stejného protokolu jako v České republice.

Projekt 4:

Oscilace hodinových genů před aplikací lithia a po ní v buněčné kultuře transformovaných lymfocytů získaných od Li-R a Li-NR BAP pacientů **Participanti a protokol studie**

Sbírkou lymfoblastoidních linií od pacientů Li-R, Li-NR a kontrol jsme obdrželi z buněčné banky (Guy Rouleau Cell bank, University of McGill, Canada). Do pilotního experimentu byly zařazeny tři lymfoblastoidní linie od tří pacientů Li-R s BAP, tři od pacientů Li-NR a lymfoblastoidní linie od jednoho kontrolního subjektu. Buněčné kultury od jednotlivých subjektů byly rozpěstovány do dvanácti kultivačních lahví T25. V jednom časovém bodě byly všechny kultivační láhve synchronizovány pomocí sérového šoku. Každé 4 hodiny od synchronizace byly jednotlivé kultivační láhve s buňkami pravidelně sklizeny, a to v 48h časovém profilu (CT4, CT8, CT12, CT16, CT20, CT24, CT28, CT32, CT36, CT40, CT44 a CT48). Z každého časového bodu bylo následně izolováno RNA.

Projekt 5:

Cirkadiánní oscilace transkriptomu v předním cingulu pacientů s unipolární depresí

Participanti a protokol studie

Do analýzy byly zahrnuty posmrtně získané vzorky předního cingula (Brodmanova oblast 24) od 26 pacientů s unipolární depresí a 22 kontrolních jedinců. Post mortem vzorky byly získány z Douglas-Bell Canada Brain Bank (douglasbrainbank.ca). Jako časový bod sloužící k určení denní fáze transkriptomu byla vždy použita doba úmrtí subjektu.

Metody

Radioimmunologické měření melatoninu v krevní plazmě a ve slině

Hladina melatoninu v krevní plazmě byla stanovena pomocí radioimmunologického měření. K jejímu stanovení byl použit komerčně dostupný RIA melatonin kit od firmy Demeditec Diagnostic GmbH (Německo), ve slině se k jeho určení používal kit od firmy Bühlmann Laboratories, Allschwil (Švýcarsko). Při měření jsme postupovali podle firmou sestaveného standardního protokolu. Veškeré vzorky byly měřeny duplicitně. Hladina melatoninu byla vyjádřena v pg/ml. Měření bylo prováděno na counteru Beckmann.

Izolace RNA

K izolaci RNA se v závislosti na tkáni používaly 4 různé izolační kity.

Bukální stěry: Dynabeads mRNA Direct Micro Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA a Direct-zol™ RNA MikroPrep (Zymo Research Corporation)

PBMCs : Direct-zol RNA MiniPrep Plus kit (Zymo Research Corporation).

Buněčné kultury: Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research Corporation)

Post mortem mozková tkáň: RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA. Izolace byly provedeny dle instrukcí výrobce kitu.

RT-qPCR

Izolované RNA bylo následně pomocí reverzní transkripce přepsáno na cDNA a cílový gen byl kvantifikován pomocí kvantitativní PCR. V qPCR jsme u všech měření využívali technologii Taqman prób a výsledky byly vždy normalizovány k houskeepingovému genu vhodně zvolenému ke každému typu tkáně zvlášť pomocí algoritmu NormFinder. Všechny reakce qPCR byly prováděny v triplicátech a měřeny na LightCycler® 480 Instrument (Roche Life Science, Indianapolis, IN, USA). Relativní exprese byla kvantifikována pomocí metody $\Delta\Delta C_t$ (Kenneth J. Livak ; Schmittgen and Thomas, 2001).

Sekvence transkriptomu

Sekvence transkriptomu byla provedena technologií Illumina (HiSeq 2000). Před sekvenací byla provedena deplece rRNA pomocí kit Ribo-Zero Gold rRNA Removal (Illumina, MRZG12324, USA) a kit TruSeq Stranded Total RNA Library Prep pro přípravu sekvenační knihovny (Illumina, RS-122-2201, USA). Následně byla provedena kontrola kvality vzorků, jednotlivé fragmenty byly fragmenty porovnány s lidským referenčním genomem hg19 pomocí TopHat v2.1.0. (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>) a byly identifikovány jednotlivé

transkripty. Subjekty účastníci se studie byly nejprve seřazeny podle času úmrtí; tento čas představoval jeden časový bod v analýze. Následně byla data získaná z RNA sekvence podrobena celotranskriptomové cirkadiánní analýze využívající kosinorový model.

Statistika

Časové profily melatoninu, pohybové aktivity, genové exprese mezi skupinami byly porovnány dvoucestnou analýzou variance (ANOVA) pro opakované měření s Bonferroniho korekcí. Změny amplitudy, akrofáze a spánkových parametrů byly srovnávány Studentovým t-testem.

Kosinorová analýza byla použita k určení rytmického charakteru denních variací sledované proměnné. Data byla fitována na dva alternativní regresní modely: buď na horizontální čáru (nulová hypotéza) nebo na jednoduchou kosinorovou křivku (alternativní hypotéza) definovanou rovnicí: $Y = \text{mesor} + [\text{amplitude} * \cos(2 * \pi * (X - \text{acrophase}) / \text{period})]$ s konstantní délkou periody odpovídající 24 h.

4. VÝSLEDKY

Projekt 1:

Studie cirkadiánního systému v rané fázi Alzheimerovy nemoci

Denní produkce melatoninu ve slině u pacientů a jejich partnerů

Průměrný denní profil melatoninu u skupiny pacientů s AN a u kontrolní skupiny je znázorněn v grafu. Dvojná ANOVA s opakováním odhalila signifikantní efekt času ($F = 18,470$; $P < 0,0001$), nicméně rozdíl mezi skupinami neodhalila ($F = 0,026$; $P = 0,874$). Srovnání individuálních denních profilů melatoninu odhalilo vysokou variabilitu v rámci obou skupin.

Expresa hodinových genů v bukálních stěrech

Signifikantní rytmus exprese hodinového genu *Per1* a *Bmal1* v denním profilu získaného z bukálních stěrů byl identifikován jak u kontrolní skupiny, tak u pacientů s AN. Porovnání exprese mezi skupinami dvoucestnou ANOVA s opakováním odhalilo signifikantní efekt času na expresi genů (*Per1*: $F = 9,435$; $P < 0,0001$; *Bmal1*: $F = 4,637$; $P < 0,0003$), nicméně rozdíl mezi skupinami nebyl statisticky významný (*Per1*: $F = 0,537$; $P = 0,471$; *Bmal1*: $F = 1,655$; $P = 0,211$)

Projekt 2:

Studie cirkadiálního systému pacientů s poruchou chování v REM spánku

Denní produkce melatoninu v krevní plazmě u kontrol a pacientů

Jednocestná ANOVA odhalila signifikantní efekt času (kontrolní skupina: $F = 2,761$; $P = 0,0136$; RBD: $F = 4,437$; $P = 0,0002$). Dvoucestná ANOVA s opakováním neprokázala signifikantní rozdíl mezi skupinami ($P = 0,3479$). Srovnání průměrné hodnoty akrofáze nepárovým Studentovým t-testem mezi kontrolní skupinou a skupinou RBD prokázal statisticky významný rozdíl ($P = 0,0337$). Akrofáze melatoninu byla u RBD přibližně o hodinu zpožděna ve srovnání se zdravými kontrolami.

Expres hodiny genů v PBMCs pacientů a kontrol

U kontrolní skupiny byla pomocí jednocestné ANOVA potvrzena změna exprese všech hodinových genů v závislosti na čase (*Per1*: $P = 0,0076$; *Per2*: $P < 0,0001$; *Per3*: $P = 0,0454$; *Bmall*: $P = 0,0148$; *Nr1D1*: $P < 0,0001$). Ovšem u skupiny pacientů s RBD byla změna v čase popsána pouze u hodinového genu *Per3* ($P = 0,0497$). U hodinového genu *Per1*, *Per2*, *Bmall* a *Nr1D1* byla změna v čase nesignifikantní. Výsledky kosinorové analýzy prokázaly vysoce signifikantní denní rytmické oscilace u všech hodinových genů u kontrolní skupiny (*Per1*: $P < 0,0001$; *Per2*: $P < 0,0001$; *Per3*: $P < 0,0001$; *Bmall*: $P = 0,0207$; *Nr1D1*: $P < 0,0001$). U pacientů byla rytmická exprese identifikována u hodinového genu *Per1* a *Per3* (*Per1*: $P = 0,0024$ a *Per3*: $P = 0,0009$). U hodinových genů *Per2*, *Bmall* a *Nr1d1* byl výsledek kosinorové analýzy nesignifikantní (*Per2*: $P = 0,0991$; *Bmall*: $P = 0,2308$ a *Nr1d1*: $P = 0,2183$).

Projekt 3:

Synchronizace cirkadiálního systému člověka v podmínkách stálého světla

Analýzy rytmu pohybové aktivity

Dvoucestná ANOVA s opakováním s Bonferroniho korekcí odhalila signifikantní efekt času na pohybovou aktivitu u obou skupin ($F = 18,25$; $P < 0,0001$), a potvrdila tak přítomnost denní variability u obou skupin. Nicméně signifikantní rozdíl mezi skupinami zjištěn nebyl ($F = 0,9007$; $P = 0,6902$). Kosinorová analýza aplikovaná na individuální průběhy pohybové aktivity jedinců a následné srovnání akrofáze párovým Studentovým t-testem odhalily signifikantní rozdíl mezi skupinami. Aktivita na Svalbardu byla o $0,97 \pm 0,1$ h zpožděná ($P = 0,0021$).

Spánková analýza

T-test odhalil signifikantně zpožděný čas usínání na Svalbardu (Česká republika, průměr: $23,79 \pm 0,98$ h; Svalbard, průměr: $24,8 \pm 1,03$ h; $P < 0,0005$). Došlo k signifikantně zpožděnému probouzení (Česká republika, průměr: $7,51 \pm 1,4$ h; Svalbard, průměr: $8,51 \pm 0,97$ h, $P = 0,0056$). V celkové délce spánku nedošlo k žádnému signifikantnímu rozdílu mezi měřeními (Česká republika, průměr: $6,36 \pm 0,67$ h; Svalbard, průměr: $6,65 \pm 0,65$ h).

Denní hladina melatoninu ve slině

Dvoucestná ANOVA s opakováním s Bonferroniho korekcí odhalila signifikantní efekt času ($F = 12,5$; $P < 0,0001$), a potvrdila tak denní variace tvorby melatoninu u obou skupin. Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi měřeními prováděným v České republice a na Svalbardu ($F = 1,617$; $P = 0,0654$). Mnohonásobný srovnávací test odhalil signifikantně vyšší průměrnou hladinu melatoninu ve 3 h ráno ($P = 0,0355$) u měření v České republice. Provedení kosinorové analýzy u jednotlivých subjektů a jejich srovnání mezi měřeními v České republice a na Svalbardu ukázalo pomocí párového Studentova t-testu signifikantní rozdíl v akrofázi mezi měřeními ($P = 0,0030$). Noční maximum melatoninu bylo na Svalbardu o cca $1,666 \pm 1,14$ h zpožděno.

Expres hodiny genů v bukálních střezech

Dvoucestná ANOVA s opakováním s Bonferroniho korekčním mnohonásobným testem odhalila signifikantní efekt času (*Per1*: $F = 12,5$; $P < 0,0001$; *Nr1D1*: $F = 11,08$; $P < 0,0001$), potvrzující denní variace v genové expresi v obou měřeních. Nicméně rozdíl mezi skupinami prokázán nebyl (*Per1*: $F = 0,966$; $P = 0,4527$; *Nr1D1*: $F = 1,050$; $P = 0,3989$). Porovnání amplitudy pomocí párového Studentova testu odhalilo signifikantní změnu u hodinového genu *Per1* i *Nr1D1*. Ovšem párovým Studentovým t-testem nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v akrofázi (*Per1*: $P = 0,042$; *Nr1D1*: $P = 0,0244$), nicméně rozptyl mezi jednotlivými hodnotami byl na Svalbardu menší než u měření prováděného v České republice (*Per1* – CZE: $SD \pm 3,13$; SVB: $SD \pm 1,82$; *Nr1D1* – CZE: $SD \pm 4,36$; SVB: $SD \pm 2,03$; *Bmal1* – CZE: $SD \pm 6,89$; SVB: $SD \pm 6,26$).

Projekt 4:

Oscilace hodinových genů před aplikací lithia a po ní v buněčné kultuře transformovaných lymfocytů získaných od Li-R a Li-NR BAP pacientů
Identifikace rytmických oscilací hodinových genů v kultuře in vitro po synchronizaci sérovým šokem ve 48hodinovém intervalu

Výsledky kosinorové analýzy prokázaly rytmickou oscilaci pouze u hodinového genu *Per3* ve skupině BAP Li-R. U žádného dalšího měření se rytmické oscilace nepotvrdily. K ověření správnosti navrhovaného protokolu studie jsme experiment ve stejném nastavení provedli na jiném buněčném typu, konkrétně na buňkách lidských fibroblastů. Výsledky kosinorové analýzy prokázaly výrazné rytmické oscilace všech sledovaných hodinových genů v tomto buněčném typu.

Projekt 5:

Cirkadiánní oscilace transkriptomu v předním cingulu pacientů s unipolární depresí

U kontrolní skupiny bylo identifikováno 2 272 rytmicky oscilujících genů v ACC, u pacientů s UD bylo identifikováno pouze 992 rytmicky oscilujících genů. Srovnáním dat rytmicky oscilujících genů u kontrol a pacientů s UD jsme identifikovali pouze 92 genů, které byly rytmicky exprimované jak u kontrol, tak u skupiny UD.

Výsledky genové ontologické analýzy využívající Kjótskou encyklopedii genů a genomů (KEGG) prokázaly, že mezi rytmicky exprimovanými geny u kontrolní skupiny se vyskytuje několik klíčových genů zodpovídajících za funkci molekulárních hodin. V ACC tak byla identifikována exprese hodinových genů *Arntl1 (Bmal1)*, *Arntl2 (Bmal2)*, *Per1* a *Npas*. U kontrolní skupiny také bylo identifikováno 19 rytmicky oscilujících genů souvisejících se synchronizací cirkadiánního systému. U pacientů s UD byly identifikovány rytmické oscilace v molekulární dráze cirkadiánních rytmů pouze u hodinového genu *Per1*, ovšem denní maximum jeho exprese (akrofáze) bylo ve 2,96 h, což je ve srovnání s kontrolní skupinou o 7,27 h dříve. U pacientů s UD byly pomocí KEGG jako rytmicky oscilující geny účastníci se synchronizace cirkadiánního systému identifikovány pouze 2 geny.

5. DISKUZE

V první části práce jsme se ve dvou studiích zabývali cirkadiánním systémem u raných fází neurodegenerativních onemocnění. Cílem této části práce bylo popsat změny cirkadiánních rytmů a jejich souvislost s rozvojem neurodegenerativních onemocnění, konkrétně u mírné formy AN a spánkové poruchy RBD, která je nově považována za časný prodromální projev PN.

V první studii jsme se zabývali cirkadiánním systémem pacientů s mírnou formou AN, které jsme srovnávali s věkově srovnatelnými zdravými

kontrolními subjekty, které žily ve stejné domácnosti jako pacienti, a byly tudíž vystavovány stejným vlivům vnějšího prostředí a sdílely společný životní rytmus. Ve všech případech se jednalo o životní partnery. Naše výsledky ukazují, že v přirozených životních podmínkách jsou cirkadiánní regulace chování, hladiny melatoninu a exprese hodinových genů v periferních hodinách u pacientů s AN ve srovnání s kontrolní skupinou mírně pozměněny.

Průměrné hladiny melatoninu v denním profilu vykazovaly cirkadiánní rytmus jak u kontrol, tak u pacientů s AN. Pokles celkové amplitudy nebyl signifikantní, ovšem analýza jednotlivých profilů u pacientů s AN oproti kontrolním subjektům poukázala na častější výskyt cirkadiánních změn, např. absenci rytmu nebo netypický fázový posun rytmu. Nižší hladiny melatoninu byly u pacientů s rozvinutou formou AN prokázány už v předchozích studiích, a to v cerebrospinální tekutině získané posmrtně (Ferrari *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2003). Ve vzorcích bukální sliznice jsme identifikovali robustní rytmickou expresi hodinových genů. Periferní buněčný hodinový mechanismus sledovaný v bukálních stěrech nevykazoval u pacientů s AN výrazné změny, ani v jeho pozitivních komponentech prezentovaných rytmickou oscilací hodinového genu *Bmal1*, ani v expresi hodinového genu *Per1*, který je součástí tzv. negativní zpětnovazebné smyčky molekulárních hodin.

Jak ukazují další studie, zdá se, že u mírné formy AN dochází nejprve k narušení rytmu pohybové aktivity, přičemž homeostatické funkce řízené z hypotalamických jader zůstávají v tomto stadiu nemoci intaktní (Hatfield *et al.*, 2004). V některých studiích by ovšem sledované narušení pohybové aktivity mohlo spíše souviset s výskytem výrazných neurodegenerativních změn v locus coeruleus sledovaných v rané fázi AN, které se významně podílí na řízení přechodu ze spánku do bdělého stavu (Paul *et al.*, 2015). Zajímavou informací o narušení hypotalamických struktur by mohlo přinést sledování rytmu tělesné teploty, který je řízený z SCN a zároveň se jeho centrum nachází právě v hypotalamických jádrech. Narušení cirkadiánního rytmu tělesné teploty by tak mohlo lépe reflektovat, zda časné neurodegenerativní změny zasahují i tuto oblast a zda změny sledované ve výstupních rytmech souvisí s poškozenou funkcí cirkadiánního systému.

Ve studii pacientů s RBD jsme prokázali změny v expresi hodinových genů, které byly ve shodě s nálezy dvou předchozích studií sledujících expresi hodinových genů u pacientů v raných stádiích PN. Podobně jako naše studie i předchozí práce identifikovaly změnu rytmické exprese hodinového genu *Bmal1*, *Per2* a *Nr1d1*, nikoliv však *Per1* (Cai *et al.*, 2010; David P. Breen *et al.*, 2014).

Výsledky naší práce dále prokazují fázové zpoždění akrofáze rytmu melatoninu o více než 2 h oproti kontrolní skupině, nikoliv však pokles amplitudy, který je prezentován u pacientů s PN (David P Breen *et al.*, 2014). Jak dokládá řada studií, u téměř 90 % pacientů s RBD dochází v pozdějším věku k rozvoji PN, pro kterou je typický úbytek dopaminergních neuronů (Galbiati *et al.*, 2019). Domníváme se, že sledované změny cirkadiálních hodin u pacientů s RBD mohou být časným signálem počínajícího úbytku dopaminergních neuronů a dopaminergní neurotransmise v mozku včetně sítnice oka. Zpožděný nárůst melatoninu může být totiž ovlivněn změnou citlivosti ipRGCs, které převádějí synchronizační světelný signál do SCN. Buňky ipRGCs exprimují melanopsin, jehož tvorba je regulována právě dopaminem (Sakamoto *et al.*, 2005). Také samotná tvorba dopaminu má cirkadiální rytmus (Castañeda *et al.*, 2004). Biosyntéza dopaminu závisí na expresi tyrozin hydroxylázy (TH), která je zodpovědná za konverzi tyrozinu na prekurzor dopaminu L-DOPA. Její exprese je pozitivně regulována heterodimerem BMAL/CLOCK (Logan and McClung, 2019) a negativně regulována REV-ERB α (Chung *et al.*, 2014). Nízké hladiny dopaminu a TH byly zjištěny v buňkách lymfocytů v periferní krvi pacientů s PN (Caronti *et al.*, 1999). Narušení cirkadiálních oscilací klíčových komponent molekulárních hodin (*Bmal1*, *Nr1d1*, *Per2*) u pacientů s RBD tak může signalizovat i počínající změny jejich dopaminergního systému.

V druhé části práce jsme se zabývali vlivem stálého světla na cirkadiální systém člověka. Jako přirozené prostředí, kde je člověk po 24 h vystaven světlu, bylo zvoleno souostroví Svalbard, kde v průběhu letních měsíců panuje polární den. Výsledky jsme srovnávali s měřením u týchž subjektů, které proběhlo v České republice před odjezdem na Svalbard.

Výsledky hodnocení rytmu pohybové aktivity a spánku ukázaly, že nástup spánku a následně i probuzení byly na Svalbardu až o 2 h zpožděny. Tyto závěry potvrdily i výsledky spánkové analýzy, která prokázala zpožděnou dobu usínání i zpožděnou dobu probouzení. Zpožděnou akrofázi jsme zjistili i v rytmu tvorby melatoninu, kde došlo současně i ke snížení noční maximální hodnoty. U obou parametrů tedy došlo ke zpoždění, ale cirkadiální rytmus byl pravidelný jak u aktivity, tak v produkci melatoninu. Tyto výsledky jsou v souladu s předešlými pracemi (Stokkan and Reiter, 1994; Bhatt, Podder and Chokroverty, 2005; Paul *et al.*, 2015; Yoneyama, Hashimoto and Honma, 2017). Vlivem vysoké světelné intenzity ve večerních i nočních hodinách (více než 100krát vyšší než v České republice) došlo k posunu rytmu pohybové aktivity a k posunu a snížení nočního nárůstu melatoninu. Nicméně výsledky rytmických oscilací hodinových genů v periferních hodinách bukalní

sliznice výrazné změny oproti měřením prováděným v České republice nevykazovaly. Všechny sledované hodinové geny vykazovaly rytmické oscilace.

Synchronizaci v podmínkách stálého světla lze nahradit i nesvětelnými synchronizačními signály, kterými může být například pravidelný příjem potravy, pravidelná pohybová aktivita nebo i pravidelné sociální interakce (Aschoff *et al.*, 1971; Stephan, 2002; Mistlberger and Skene, 2005). Zmenšené rozptyly akrofázi u sledovaných hodinových genů na Svalbardu poukazují na to, že subjekty byly mezi sebou navzájem lépe synchronizovány než před odletem v České republice. U obdobné studie prováděné za polárním kruhem, při níž byly subjekty žádány o dodržování vlastního vnitřního režimu – nedodržovaly tedy žádný pravidelný denní režim a fungovaly nezávisle na zbytku skupiny – došlo k rozpadu rytmu pohybové aktivity i rytmické tvorby melatoninu (Kennaway and Van Dorp, 2017). Zdá se tedy, že dodržování pravidelného denního režimu vede i v podmínkách stálého světla k zachování rytmické funkce vnitřních hodin.

Ve třetí části práce jsme se zaměřili na možnosti využití *in vitro* modelu transformovaných lymfocytů pacientů s BAP, u kterých byla definována jejich odpověď na lithium. Motivací k této studii byla snaha o využití těchto buněčných linií v cirkadiálním experimentu a sledování molekulárního hodinového mechanismu *in vitro* v interakci s podáváním lithia. Experiment byl současně prováděn na dalším buněčném typu, na buňkách lidských fibroblastů, na nichž byl podobný experimentální přístup již použit v řadě předchozích cirkadiálních studií *in vitro* (Brown *et al.*, 2005; McCarthy and Welsh, 2012; Landgraf *et al.*, 2016). V buňkách lidských fibroblastů se nám podařilo prokázat robustní cirkadiální oscilace hodinových genů, v buňkách transformovaných lymfocytů se nám tyto oscilace prokázat nepodařilo. Zásadní rozdíl mezi těmito dvěma buněčnými typy je ve způsobu jejich kultivace. Zatímco fibroblasty jsou buňky rostoucí ve vysoké hustotě přisedle na dně kultivační nádoby, transformované lymfocyty rostou volně v buněčném médiu (suspenní buněčný typ). Synchronizační signál aplikovaný na začátku experimentu má za cíl synchronizovat molekulární hodinový mechanismus jednotlivých buněk. Vzájemnou synchronizaci si fibroblasty dokážou udržet dlouho dobu po synchronizačním signálu (Brown *et al.*, 2005). Výsledky našeho experimentu ukázaly, že buňky rostoucí v suspenzi pravděpodobně nejsou schopné po aplikaci synchronizačního signálu vzájemnou synchronizaci udržet. Důležitým faktorem dlouhodobého udržení synchronizace cirkadiálních oscilací v buněčné kultuře je tedy zjevně hustá síť mezibuněčných interakcí. Význam mezibuněčných interakcí pro udržení

vzájemné mezibuněčné synchronizace je velmi dobře popsán v neuronech SCN. Jednotlivé neurony SCN v disperzní buněčné kultuře po sérové synchronizaci ztrácí jednotné rytmické oscilace výrazně rychleji než kompaktní organotypické kultury SCN (Welsh *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2007).

K studiu cirkadiálních rytmů *in vitro* jsou vhodnější buňky kožních fibroblastů, které rostou ve vysoce konfluentních buněčných kulturách, vykazují robustní cirkadiální amplitudy v expresi hodinových genů a dokáží si rytmické oscilace po sérové synchronizaci dlouhodobě udržet. Ovšem sbírku fibroblastů od pacientů s BAP odpovídajících a neodpovídajících na léčbu lithiem jsme neměli k dispozici. V současné době již byly výsledky podobně navržené studie využívající fibroblasty publikovány (Mccarthy *et al.*, 2011).

Ve čtvrté, poslední části práce jsme se věnovali analýze celotranskriptomových cirkadiálních oscilací v předním cingulu, odebraného post mortem od pacientů s UD. Časový profil požadovaný pro cirkadiální analýzu byl sestaven na základě doby úmrtí subjektu. Výsledky byly srovnávány se stejně získanými daty od kontrolních subjektů bez diagnózy UD.

Jsme si vědomi toho, že námi použitý přístup, pracující s časem úmrtí jako jedním časovým bodem pro cirkadiální analýzu, má značné limity. Uvědomujeme si, že každý subjekt má jiné genetické pozadí, neznámou světelnou historii před úmrtím i synchronizaci a že všechny tyto skutečnosti mohou následně ovlivnit analýzu. I přes tyto limity nám cirkadiální analýza celého transkriptomu u kontrolní skupiny prokazatelně potvrdila rytmus u téměř 3 000 genů a u klíčových hodinových genů (*Per1*, *Bmal1*, *Bmal2*, *Npas*), což poukazuje na validitu našeho přístupu. Kromě těchto hodinových genů se prokázal cirkadiální rytmus u 18 dalších genů souvisejících s regulací a synchronizací hodinového mechanismu, jako je například *GSK3β* nebo některé podjednotky glutamátových receptorů (*GRIN1*, *GRIA1*). Na rozdíl od kontrolní skupiny byl u pacientů s UD cirkadiální rytmus potvrzen pouze u 992 genů a z hodinových genů byl jako rytmicky exprimovaný potvrzen pouze hodinový gen *Per1*. Ovšem i tento gen byl exprimován ve zcela jiné fázi (akrofáze = 2,96 h), než byl exprimován u kontrolní skupiny (akrofáze = 10,22 h). Mezi rytmicky oscilujícími geny byly u pacientů s UD identifikovány pouze dva další geny, které jsou podle KEGG zapojené v synchronizačních drahách cirkadiálního systému.

Denní oscilace nálady jsou řízeny cirkadiálními hodinami a přední cingulární kortex je funkčně spjat s regulací nálady. Snížené množství rytmicky oscilujících transkriptů, a především absence rytmicky oscilujícího setu

hodinových genů v této struktuře může u pacientů s UD poukazovat na zhoršenou funkci vnitřních hodin nebo na vzájemnou desynchronizaci cirkadiánního systému.

6. POUŽITÁ LITERATURA

Antunes, L. C. *et al.* (2010) ‘Obesity and shift work: Chronobiological aspects’, *Nutrition Research Reviews*. Cambridge University Press, 23(1), pp. 155–168. doi: 10.1017/S0954422410000016.

Aschoff, J. *et al.* (1971) ‘Human circadian rhythms in continuous darkness: Entrainment by social cues’, *Science*. doi: 10.1126/science.171.3967.213.

Bhatt, M. H., Podder, N. and Chokroverty, S. (2005) ‘Sleep and neurodegenerative diseases’, *Semin Neurol*. 2005/03/31. New York Sleep Institute, New York, NY 10016, USA., 25(1), pp. 39–51. doi: 10.1055/s-2005-867072.

Breen, David P *et al.* (2014) ‘Sleep and circadian rhythm regulation in early Parkinson disease.’, *JAMA neurology*, 71(5), pp. 589–595. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.65.

Breen, David P. *et al.* (2014) ‘Sleep and circadian rhythm regulation in early parkinson disease’, *JAMA Neurology*. American Medical Association, 71(5), pp. 589–595. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.65.

Brown, S. A. *et al.* (2005) ‘The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals’, *PLoS Biology*, 3(10). doi: 10.1371/journal.pbio.0030338.

Cai, Y. *et al.* (2010) ‘Expression of clock genes Per1 and Bmal1 in total leukocytes in health and Parkinson’s disease’, *European Journal of Neurology*, 17(4), pp. 550–554. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02848.x.

Caronti, B. *et al.* (1999) ‘Reduced dopamine in peripheral blood lymphocytes in Parkinson’s disease’, *NeuroReport*. Lippincott Williams and Wilkins, 10(14), pp. 2907–2910. doi: 10.1097/00001756-199909290-00006.

Castañeda, T. R. *et al.* (2004) ‘Circadian rhythms of dopamine, glutamate and GABA in the striatum and nucleus accumbens of the awake rat: Modulation by light’, *Journal of Pineal Research*. Blackwell Publishing Ltd, 36(3), pp. 177–185. doi: 10.1046/j.1600-079X.2003.00114.x.

Davis, S. and Mirick, D. K. (2006) ‘Circadian disruption, shift work and the risk of cancer: A summary of the evidence and studies in Seattle’, *Cancer Causes and*

Control. Springer, pp. 539–545. doi: 10.1007/s10552-005-9010-9.

Ferrari, E. *et al.* (2000) ‘Pineal and pituitary-adrenocortical function in physiological aging and in senile dementia.’, *Experimental gerontology*, 35(9–10), pp. 1239–50. doi: 10.1016/s0531-5565(00)00160-1.

Galbiati, A. *et al.* (2019) ‘The risk of neurodegeneration in REM sleep behavior disorder: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies’, *Sleep Medicine Reviews*. W.B. Saunders Ltd, pp. 37–46. doi: 10.1016/j.smrv.2018.09.008.

Hastings, M. H., Maywood, E. S. and Brancaccio, M. (2018) ‘Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus’, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, pp. 453–469. doi: 10.1038/s41583-018-0026-z.

Hastings, M. H., Maywood, E. S. and Brancaccio, M. (2019) ‘The mammalian circadian timing system and the suprachiasmatic nucleus as its pacemaker’, *Biology*. MDPI AG. doi: 10.3390/biology8010013.

Hastings, M. H., Reddy, A. B. and Maywood, E. S. (2003) ‘A clockwork web: Circadian timing in brain and periphery, in health and disease’, *Nature Reviews Neuroscience*, 4(8), pp. 649–661. doi: 10.1038/nrn1177.

Hatfield, C. F. *et al.* (2004) ‘Disrupted daily activity/rest cycles in relation to daily cortisol rhythms of home-dwelling patients with early Alzheimer’s dementia’, *Brain*, pp. 1061–1074. doi: 10.1093/brain/awh129.

Hermansson, J. *et al.* (2019) ‘Interaction between Shift Work and Established Coronary Risk Factors.’, *The international journal of occupational and environmental medicine*. NIOC Health Organization, 10(2), pp. 57–65. doi: 10.15171/ijocem.2019.1466.

Hooghiemstra, A. M. *et al.* (2015) ‘The rest-activity rhythm and physical activity in early-onset dementia’, *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 29(1), pp. 45–49. doi: 10.1097/WAD.0000000000000037.

Inder, M. L., Crowe, M. T. and Porter, R. (2016) ‘Effect of transmeridian travel and jetlag on mood disorders: evidence and implications.’, *The Australian and New Zealand journal of psychiatry*. Taylor and Francis Ltd, 50(3), pp. 220–7. doi: 10.1177/0004867415598844.

Katz, G. *et al.* (2002) ‘Time zone change and major psychiatric morbidity: The results of a 6-year study in Jerusalem’, *Comprehensive Psychiatry*, 43(1), pp. 37–40. doi: 10.1053/comp.2002.29849.

Kennaway, D. J. and Van Dorp, C. F. (2017) ‘Free-running rhythms of melatonin, cortisol, electrolytes, and sleep in humans in Antarctica’, *American Journal of*

Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. doi: 10.1152/ajpregu.1991.260.6.r1137.

Landgraf, D. *et al.* (2016) 'The mood stabilizer valproic acid opposes the effects of dopamine on circadian rhythms.', *Neuropharmacology*, 107, pp. 262–270. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.03.047.

Leak, R. K., Card, J. P. and Moore, R. Y. (1999) 'Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport', *Brain Research*. Leak, RK (reprint author), Univ Pittsburgh, Dept Psychiat, W1656 Biomed Sci Tower, Pittsburgh, PA 15261 USA Univ Pittsburgh, Dept Psychiat, Pittsburgh, PA 15261 USA Univ Pittsburgh, Dept Neurosci, Pittsburgh, PA 15261 USA Univ Pittsburgh, Dept Neurol, Pit, 819(1–2), pp. 23–32. doi: 10.1016/S0006-8993(98)01317-1.

Leibenluft, E. and Suppes, T. (1999) 'Treating bipolar illness: focus on treatment algorithms and management of the sleep-wake cycle.', *The American journal of psychiatry*, 156(12), pp. 1976–81. doi: 10.1176/ajp.156.12.1976.

Li, J. Z. *et al.* (2013) 'Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(24), pp. 9950–9955. doi: 10.1073/pnas.1305814110.

Liu, A. C. *et al.* (2007) 'Intercellular Coupling Confers Robustness against Mutations in the SCN Circadian Clock Network', *Cell*. Elsevier, 129(3), pp. 605–616. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.047.

Logan, R. W. and McClung, C. A. (2019) 'Rhythms of life: circadian disruption and brain disorders across the lifespan', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, pp. 49–65. doi: 10.1038/s41583-018-0088-y.

Lucas, R. J. *et al.* (2014) 'Measuring and using light in the melanopsin age', *Trends in Neurosciences*, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.tins.2013.10.004.

Mccarthy, M. J. *et al.* (2011) 'Functional genetic variation in the Rev-Erba pathway and lithium response in the treatment of bipolar disorder', *Genes, Brain and Behavior*, 10(8), pp. 852–861. doi: 10.1111/j.1601-183X.2011.00725.x.

McCarthy, M. J. and Welsh, D. K. (2012) 'Cellular circadian clocks in mood disorders.', *Journal of biological rhythms*, 27(5), pp. 339–52. doi: 10.1177/0748730412456367.

Mistlberger, R. E. and Skene, D. J. (2005) 'Nonphotic entrainment in humans?', *Journal of biological rhythms*, 20(4), pp. 339–52. doi: 10.1177/0748730405277982.

Musiek, E. S. *et al.* (2018) 'Circadian rest-activity pattern changes in aging and

- preclinical Alzheimer disease’, *JAMA Neurology*. American Medical Association, 75(5), pp. 582–590. doi: 10.1001/jamaneurol.2017.4719.
- Naismith, S. L. *et al.* (2014) ‘Circadian misalignment and sleep disruption in mild cognitive impairment.’, *Journal of Alzheimer’s disease : JAD*, 38(4), pp. 857–66. doi: 10.3233/JAD-131217.
- Ortiz-Tudela, E. *et al.* (2014) ‘The characterization of biological rhythms in mild cognitive impairment.’, *BioMed research international*, 2014, p. 524971. doi: 10.1155/2014/524971.
- Paul, M. A. *et al.* (2015) ‘Sleep deficits in the High Arctic summer in relation to light exposure and behaviour: use of melatonin as a countermeasure.’, *Sleep medicine*, 16(3), pp. 406–13. doi: 10.1016/j.sleep.2014.12.012.
- Sakamoto, K. *et al.* (2005) ‘Dopamine regulates melanopsin mRNA expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells’, *European Journal of Neuroscience*, 22(12), pp. 3129–3136. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04512.x.
- Stephan, F. K. (2002) ‘The “other” circadian system: food as a Zeitgeber.’, *Journal of biological rhythms*, 17(4), pp. 284–92. doi: 10.1177/074873040201700402.
- Stokkan, K. A. and Reiter, R. J. (1994) ‘Melatonin rhythms in Arctic urban residents.’, *Journal of pineal research*, 16(1), pp. 33–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8158521> (Accessed: 30 July 2019).
- Tranah, G. J. *et al.* (2011) ‘Circadian activity rhythms and risk of incident dementia and mild cognitive impairment in older women’, *Annals of Neurology*, 70(5), pp. 722–732. doi: 10.1002/ana.22468.
- Wehr, T. A. (2018) ‘Bipolar mood cycles associated with lunar entrainment of a circadian rhythm’, *Translational Psychiatry*. Nature Publishing Group, 8(1), pp. 1–6. doi: 10.1038/s41398-018-0203-x.
- Weissová, K. *et al.* (2016) ‘Moderate changes in the circadian system of Alzheimer’s disease patients detected in their home environment’, *PLoS ONE*. Public Library of Science, 11(1). doi: 10.1371/journal.pone.0146200.
- Welsh, D. K. *et al.* (1995) ‘Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms’, *Neuron*, 14(4), pp. 697–706. doi: 10.1016/0896-6273(95)90214-7.
- Yoneyama, S., Hashimoto, S. and Honma, K. (2017) ‘Seasonal changes of human circadian rhythms in Antarctica’, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 277(4), pp. R1091–R1097. doi: 10.1152/ajpregu.1999.277.4.r1091.

Zhou, J. N. *et al.* (2003) 'Early neuropathological Alzheimer's changes in aged individuals are accompanied by decreased cerebrospinal fluid melatonin levels', *Journal of Pineal Research*, 35(2), pp. 125–130. doi: 10.1034/j.1600-079X.2003.00065.x.

7. SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace, které jsou podkladem této dizertační práce

1. WEISSOVÁ, K., KOPŘIVOVÁ, J., ŠÓŠ, P., BENDOVÁ, Z., ČERVENÁ, K., PAČESOVÁ D. Od člověka k buňce: Nové poznatky a metody ve studiu cirkadiánních rytmů u pacientů s afektivními poruchami a schizofrenií. *Psychiatrie*. 2016, **20**(1), 13–22. ISSN 1211-7579.

2. WEISSOVÁ, K., BARTOŠ, A., SLÁDEK, M., NOVÁKOVÁ, M., SUMOVÁ, A. Moderate changes in the circadian system of Alzheimer's disease patients detected in their home environment. *PLoS One*. 2016, **11**(1), "e0146200". ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0146200. **IF 3.057**.

3. WEISSOVÁ, K., ŠKRABALOVÁ, J., SKÁLOVÁ, K., ČERVENÁ, K., BENDOVÁ, Z., MILETÍNOVÁ, E., KOPŘIVOVÁ, ŠONKA, K., URBACZKA DUDYSOVÁ, D., BARTOŠ, A., BUŠKOVÁ, J. Circadian rhythms of melatonin and peripheral clock gene expression in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Sleep Medicine*. 2018, **52**(December), 1–6. ISSN 1389-9457. DOI: 10.1016/j.sleep.2018.07.019. **IF 3.395**

4. WEISSOVÁ, K., ŠKRABALOVÁ J., SKÁLOVÁ K., BENDOVÁ Z., KOPŘIVOVÁ J. The Effect of a Common Daily Schedule on

Human Circadian Rhythms During the Polar Day in Svalbard: A Field Study. *Journal of Circadian Rhythms*. 2019 Oct 9;17(1). DOI: 10.5334/jcr.186. IF 2.31

Publikace, které nejsou podkladem této dizertační práce

1. Kapitola v knize: JANEČKOVÁ, D., WEISSOVÁ, K., FÁRKOVÁ, E., VELDOVÁ, K., LIŠKOVÁ, M., DUDYSOVÁ, D., ŠMOTEK, M., KOPŘIVOVÁ, J., BENDOVÁ, Z. Ranní ptáče dál doskáče... Ale co sovy?. In: Horáček, J., Kesner, L., Höschl, C., Španiel, F. *Možek a jeho člověk, mysl a její nemoc*. Praha: Galén, 2016, s. 146-152. ISBN: 978-80-7492-283-1