

Univerzita Karlova  
3. lékařská fakulta



## Dizertační práce

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

*Circadian system in peripheral clock in neurodegenerative disorder and affective disorder and their synchronization in constant light condition*

Školitel: PhDr. Jana Kopřivová, Ph.D.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. I přes to, že některé dílčí výsledky byly součástí mé diplomové práce, výsledky v této práci byly originálně zpracovány, publikovány v impaktovaném časopise v 2. ročníku mého doktorandského studia a tematicky korespondují se zaměřením této práce. Současně prohlašuji, že tato práce je originální a nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne

Kamila Weissová

Identifikační záznam:

**Pro tvorbu identifikačního záznamu se řiďte normami ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2.**

WEISSOVÁ, Kamila. *Cirkadiánní systém v periferních hodinách u neurodegenerativních a afektivních onemocnění a jeho synchronizace v podmínkách stálého světla. [Circadian system in peripheral clock in neurodegenerative disorder and affective disorder and their synchronization in constant light condition]*. Praha, 2020. 97 stran, 1 příloha. Disertační práce PhD. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta. Národní Ústav Duševního Zdraví. Školitel: PhDr. Jana Kopřivová, Ph.D.

**Klíčová slova:** Cirkadiánní rytmy, bipolární afektivní porucha, unipolární deprese, Alzheimerova nemoc, porucha chování v REM spánku, hodinové geny

**Key words:** *circadian rhythms, bipolar disorder, unipolar disorder, Alzheimer disorder, REM behavior disorder, clock genes*

## **Poděkování:**

Ráda bych zde poděkovala několika jednotlivcům, kteří vznik této práce jak přímo, tak nepřímo podpořili. Velké díky patří především doktorce Janě Kopřivové, mé školitelce, která ve mně měla od začátku důvěru a nebála se podpořit nápady, které jsem se v průběhu doktorského studia pokoušela ať úspěšně, či neúspěšně realizovat.

Významnou mentorskou roli při vzniku této práce hrála docentka Zdeňka Bendová, která byla především mým odborným dozorem a se kterou jsem mohla kdykoliv konzultovat jakékoliv vědecké otázky.

Děkuji za podporu a spolupráci na experimentech svým kolegyním. V první řadě doktorce Jitce Škrabalové, která se spolupodílela především na analýze genové exprese a bez které by moje práce vznikala výrazně složitěji. Dále pak magistře Kateřině Skálové, která se podílela na radioimunologickém stanovování melatoninu a která dokázala udržet pořádek tam, kde by jinak zavládl chaos. Děkuji oběma za jejich podporu, pomoc, spolupráci a hlavně přátelství. Jejich energie a pracovní nasazení byly po celou dobu naší spolupráce hnacím motorem a velkou motivací.

Velký dík patří také doktorce Jitce Buškové a jejímu týmu spánkové laboratoře, bez kterých by nebylo možné některé projekty realizovat.

Ráda bych také poděkovala profesorovi Martinu Aldovi, díky němuž jsem měla skvělou příležitost pracovat na části svého doktorátu v laboratoři v Douglas Hospital na University of McGill v Kanadě, kde ve spolupráci s laboratoří Nicolase Cermakiana a jeho postdoktorandky Laury Karvezee vznikla i část výsledků.

Na závěr bych chtěla poděkovat svým přátelům a rodině, především Aničce Vrbové, která měla tu energii a dohlédla na pravopis a stylistiku práce a všem ostatním za podporu.

## **SLOVO ÚVODEM:**

Člověk je jediným živočišným druhem, který soustavně nerespektuje své cirkadiánní rytmy a potřebu dostatečně spát. Chronicky nevyspalá společnost, práce ve směnném provozu, časté přelety časových pásem nebo jen běžná závislost na umělém osvětlení, kterému se každý večer vystavujeme, nutně zasahují do fyziologie našeho těla. Navzdory milionům let evoluce, která člověka předurčila především k dennímu způsobu života, se dnešní člověk za denního tvora dá považovat jen s výhradami. Tato našemu organismu nepřirozená změna si vybírá svou daň. Řada studií již prokázala, že zvyšující se výskyt duševních a jiných onemocnění souvisí s nerespektováním našich vnitřních hodin a přirozené potřeby spánku. Bylo by proto vhodné, kdyby moderní medicína při léčbě kladla větší důraz na stav cirkadiánního systému pacienta a měla nástroje, kterými ho dokáže správně diagnostikovat a využít k léčbě. Proto jsem přesvědčená, že chronobiologické studie u psychiatrických a neurodegenerativních chorob mají svůj význam a moje práce a i práce celé naší spánkové a chronobiologické skupiny v Národním ústavu duševního zdraví jsou z medicínského i společenského pohledu přínosné.

## Souhrn:

Cirkadiánní systém hraje významnou roli ve fyziologii i patofyziologii člověka. Řídí veškeré procesy, které se v našem těle opakují s 24hodinovou periodou. Jedná se o komplexní systém, který funguje od behaviorální úrovně až po úroveň molekulární. Tento systém je řízen z centrální struktury nacházející se v hypotalamu, ale jeho rytmické projevy můžeme sledovat i v jednotlivých tělních buňkách.

Narušení tohoto systému u člověka je často spojováno s rozvojem afektivních poruch či neurodegenerativních onemocnění. U pacientů s afektivními poruchami byly popsány fázové posuny cirkadiánních rytmů například v rytmu jejich pohybové aktivity i v dalších cirkadiánních parametrech. U neurodegenerativních onemocnění dochází především ke snižování amplitudy některých cirkadiánních rytmů. Terapeutické postupy zaměřené právě na stabilizaci a prohloubení cirkadiánních rytmů mají i pozitivní dlouhodobý vliv na průběh těchto onemocnění. Zajímavé také je, že studium genetické podstaty těchto onemocnění identifikovalo i polymorfismy v oblastech souvisejících s molekulárním mechanismem vnitřních hodin.

V rámci této práce jsem se snažila uchopit studium cirkadiánních rytmů člověka z několika různých úhlů. 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. U těchto pacientů jsme popsali fázové zpoždění nárůstu melatoninu a vymizení rytmických oscilací některých hodinových genů.

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, které slouží jako hlavní synchronizační signál pro naše vnitřní hodiny. Tato studie ukázala, že k rozpadu cirkadiánních rytmů nedochází, hodiny pravděpodobně k synchronizaci využívají synchronizační signály, jako je pravidelný příjem potravy nebo pevný denní režim. 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 a post mortem cirkadiánních oscilací v předním cingulu u pacientů s unipolární depresí. Zvolený model *in vitro*, ve kterém jsem využívala transformované buněčné linie lymfocytů, 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. Tyto výsledky jsou v souladu s dřívějšími pracemi poukazujícími na narušenou funkci vnitřních hodin pacientů s unipolární depresí.

**Klíčová slova:**

Cirkadiánní rytmy, bipolární afektivní porucha, unipolární deprese, Alzheimerova nemoc, porucha chování v REM spánku, hodinové geny

## Summary:

The circadian system plays an important role in human physiology and pathophysiology. It controls all processes that repeat in our body within a 24-hour period. It is a complex system that works from the behavioral level to the molecular level. This system is controlled from the central brain structure located in the hypothalamus, but its rhythmic manifestations can also be observed in almost any individual body cells.

Disruption of this system in humans is often associated with the development of affective disorders or neurodegenerative diseases. The affective disorder has often been associated with a phase shift in some of the circadian driven outputs, as for example, rhythm in their physical activity. The patients with neurodegenerative disorders are seen to have circadian amplitude damping in a series of circadian rhythms. Therapeutic approaches which aim to stabilize and strengthen the circadian rhythms have also a positive long term effect on the course of these diseases. Interestingly, in the genetic studies of these diseases, a couple of specific polymorphisms have been identified in areas related to the molecular mechanism of the internal clock.

In this thesis, I tried to look at the human circadian rhythms from several different angles. In the first part of this thesis I tried to identify changes in the human circadian system during the early stages of 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 these patients, we described a phase delay in the melatonin onset and the disappearance of rhythmic oscillations of some clock genes.

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, which serves as the main synchronization signal for our internal clock. The study showed that circadian rhythms can maintain their rhythmic oscillations and the clocks are likely to use the non-photoc synchronization cues as could be regular food intake or a fixed daily schedule. Although 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* and post-mortem circadian oscillations in the anterior cingulate in patients with unipolar depression. As with the *in vitro* model, we chose



transformed lymphocytes cell lines collected from bipolar patients. Unfortunately, we found that transformed lymphocytes are not suitable for studying the circadian oscillations. The results from the whole-transcriptome circadian analysis in anterior cingulate from unipolar patients revealed a loss of rhythmic oscillations of the core clock genes compared to healthy controls. These results are consistent with the previous studies that imply impaired internal clock function in patients with unipolar depression.

**Key words:** circadian rhythms, bipolar disorder, unipolar disorder, Alzheimer disorder, REM behavior disorder, clock genes

<b>1. Literární úvod</b> .....	<b>15</b>
1.1. Cirkadiánní systém.....	15
1.1.1. Centrální hodinový oscilátor a jeho organizace.....	15
1.1.2. Hodinový molekulární mechanismus.....	18
1.1.3. Hodiny v periferních strukturách.....	21
1.2. Synchronizace cirkadiánního systému.....	22
1.2.1. Světelná synchronizace.....	22
1.2.2. Mechanismy nesvětelné synchronizace.....	23
1.3. Melatonin jako synchronizátor a ukazatel vnitřních hodin.....	26
1.4. Desynchronizace hodin a její dopad na duševní zdraví.....	28
1.4.1. Desynchronizace a afektivní poruchy.....	29
1.4.2. Desynchronizace a neurodegenerativní onemocnění.....	30
1.4.3. Vybraná afektivní onemocnění spojená s poruchou cirkadiánního systému.....	31
1.4.3.1. Bipolární afektivní porucha.....	32
1.4.3.2. Unipolární deprese.....	35
1.4.4. Farmakoterapeutické a nefarmakoterapeutické přístupy léčby afektivních poruch a jejich interakce s cirkadiánním systémem.....	36
1.4.4.1. Lithium.....	37
1.4.4.2. Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI).....	38
1.4.4.3. Agomelatin.....	39
1.4.4.4. Ketamin.....	40
1.4.4.5. Nefarmakologické přístupy.....	40
1.4.5. Vybraná neurodegenerativní onemocnění spojená s poruchou cirkadiánního systému.....	41
1.4.5.1. Alzheimerova nemoc.....	41
1.4.5.2. Parkinsonova nemoc.....	43
1.4.5.3. Porucha chování v REM spánku.....	44
<b>2. CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>44</b>
<b>3. Metodika</b> .....	<b>45</b>
3.1. Experimenty <i>in vivo</i> a metodika.....	45
3.1.1. Studie cirkadiánního systému v rané fázi Alzheimerovy nemoci.....	45
3.1.1.1. Účastníci studie a protokol studie.....	46
3.1.1.2. Odběr vzorků slin a bukalních stěrů.....	46
3.1.2. Studie cirkadiánního systému pacientů s poruchou chování v REM fázi spánku....	47
3.1.2.1. Účastníci studie a protokol studie.....	47
3.1.2.2. Protokol studie.....	47
3.1.3. Synchronizace cirkadiánního systému člověka v podmínkách stálého světla.....	48
3.1.3.1. Účastníci studie a protokol studie.....	48
3.1.3.2. Protokol studie a odběr vzorků.....	49

3.1.3.3.	Odběr vzorků v České republice .....	49
3.1.3.4.	Odběr vzorků na Svalbardu .....	50
3.1.4.	Aktigrafický záznam pohybové aktivity, spánkových parametrů a světelné intenzity 51	
3.1.5.	Radioimunologické stanovení melatoninu ve slině a v krevní plazmě .....	51
3.1.6.	Separace periferních mononukleárních krevních buněk z celé krve.....	51
3.1.7.	Izolace RNA z bukálních stěrů a z periferních mononukleárních krevních buněk ..	52
3.1.8.	Reverzní transkripce.....	52
3.1.9.	Kvantitativní PCR .....	52
3.1.10.	Statistika.....	53
3.2.	Studie <i>in vitro</i> a metodika.....	54
3.2.1.	Oscilace hodinových genů před aplikací lithia a po ní v buněčné kultuře transformovaných lymfocytů získaných od Li-R a Li-NR BAP pacientů.....	54
3.2.1.1.	Participantů a protokol studie .....	54
3.2.1.2.	Kultivace <i>in vitro</i> .....	54
3.2.1.3.	Experimentální design.....	54
3.2.1.4.	Izolace RNA .....	55
3.2.1.5.	Reverzní transkripce a kvantitativní PCR .....	55
3.2.1.6.	Kvantitativní PCR .....	55
3.3.	Studie post mortem a metodika.....	56
3.3.1.	Cirkadiánní oscilace transkriptomu v předním cingulu pacientů s unipolární depresí 56	
3.3.1.1.	Participantů a protokol studie .....	56
3.3.1.2.	Izolace RNA .....	56
3.3.1.3.	RNA sekvenace.....	56
3.3.1.4.	Bioinformatické zpracování dat a kosinorová analýza.....	57
3.3.1.5.	KEGG genomická analýza signálních drah.....	58
<b>4.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>58</b>
4.1.	Studie cirkadiánního systému v rané fázi Alzheimerovy nemoci.....	58
4.1.1.	Denní produkce melatoninu ve slině u pacientů a jejich partnerů .....	58
4.1.2.	Expresí hodinových genů v bukálních stěrech.....	59
4.2.	Studie cirkadiánního systému pacientů s poruchou chování v REM spánku .....	60
4.2.1.	Denní produkce melatoninu v krevní plazmě u kontrol a pacientů .....	60
4.2.2.	Expresí hodinových genů v PBMCs pacientů a kontrol.....	61
4.3.	Synchronizace cirkadiánního systému člověka v podmínkách stálého světla.....	62
4.3.1.	Výsledky aktigrafického měření: Spánková analýza a analýza pohybové aktivity ..	62
4.3.1.1.	Analýzy rytmu pohybové aktivity.....	63
4.3.1.2.	Spánková analýza.....	63
4.3.2.	Denní hladina melatoninu ve slině .....	64
4.3.3.	Expresí hodinových genů v bukálních stěrech.....	65

4.4.	Oscilace hodinových genů před aplikací lithia a po ní v buněčné kultuře transformovaných lymfocytů získaných od Li-R a Li-NR BAP pacientů.....	67
4.4.1.	Identifikace rytmických oscilací hodinových genů v kultuře <i>in vitro</i> po synchronizaci sérovým šokem ve 48hodinovém intervalu .....	67
4.5.	Cirkadiánní oscilace transkriptomu v předním cingulu pacientů s unipolární depresí ....	70
<b>5.</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>72</b>
<b>6.</b>	<b>Shrnutí.....</b>	<b>76</b>
<b>7.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>77</b>
<b>8.</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>79</b>
<b>9.</b>	<b>Seznam příložených publikací.....</b>	<b>101</b>

## Seznam použitých zkratek:

AANAT	aralkylamin N-acetyltransferáza
ACC	předního cingulární kortex
AMY	amygdala
AN	Alzheimerova nemoc
AVP	arginin-vasopresin peptid
BAP	bipolární afektivní porucha
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CB	cerebellum
cGMP	cyklický guanozin monofosfát
CKI $\epsilon/\delta$	kasein kináza epsilon/delta
CNS	centrální nervová soustava
CRE	cAMP response element
CS	cirkadiálního systém
DLPFC	dorzolaterální prefrontální kortex
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GHT	genikulohypotalamický trakt
GSK3 $\beta$	glykogen systáza kináza 3 beta
Hip	hipokampus
IGL	intergenikulatní listky
ipRGCs	intrinsic photoresponsive retinal ganglion cells, vnitřně-fotosenzitivní retinální gangliové buňky
KEGG	Kjótská encyklopedie genů a genomů
LHb	laterální habenula
Li-NR	lithium neresponzivní
Li-R	lithium responzivní
MAPK	mitogen-aktivovaná protein kináza
mPFC	mediální prefrontální kortex
MRN	mediální rapheální jadra
MT1 a MT2, MT3	melatoninový receptor 1, 2, 3
Nac	nucleus accumbens
NMDA	N-metyl-D-aspartátová kyselina
NPAS2	neuronální PAS doménu obsahující protein 2
NPY	neuropeptid Y
OPN4	opsin 4/ fotopigment melanopsin

PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating peptide
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PN	Parkinsonova nemoc
PVN	paraventriculární jádra hypotalamu
RBD	REM behavior disorder, porucha chování v REM spánku
RTH	retinohypotalamický trakt
SCN	suprachiasmatická jádra
SNP	single nucleotide polymorphism
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitors
TTZS	transkripčně translační zpětnovazebná smyčka
UD	unipolární deprese
VIP	vazointestinální peptid
VTA	ventrální tegmentální oblast

# 1. Literární úvod

## 1.1. Cirkadiánní systém

Cirkadiánní rytmy jsou obecně charakterizovány jako endogenní biologické cykly opakující se s přibližně 24h periodou. Samotný název slova cirkadiánní pochází z latinského slova *circa* a *dien*, což doslova znamená „přibližně denní“. 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 ( $\tau$ ), která se mírně liší od přesně 24hodinové periody solárního cyklu na Zemi. Délka vnitřní periody je mezidruhově odlišná a vykazuje i určitou variabilitu mezi jednotlivými subjekty stejného druhu. U člověka je průměrná délka vnitřní periody 24 h 9 min  $\pm$  12 min (Duffy et al., 2011). Existence cirkadiánních rytmů byla popsána u většiny organismů, od bakterií až po savce. Široký mezidruhový výskyt cirkadiánního systému (CS) je důsledkem jeho vysoké evoluční adaptability. CS se vyvinul jako odpověď na kontinuální otáčení Země kolem své osy, jehož výsledkem je střídání dne a noci na Zemi, a umožňuje organismům předvídat rytmicky se opakující děje, které mají denní pravidelnost. Mezi nejzřetelnější cirkadiánní rytmy savců patří rytmus spánku a bdění, pravidelný příjem potravy nebo rytmus pohybové aktivity. Cirkadiánní rytmy můžeme sledovat i u řady metabolických či kognitivních procesů, celá řada hormonů vykazuje cirkadiánní rytmus ve své tvorbě a průměrně 6 % – 10 % genů lidského transkriptomu je rytmicky exprimováno (Panda et al., 2002).

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 zpožďovat 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. Vnitřní desynchronizace cirkadiánního systému, oslabená citlivost vůči synchronizačním podnětům, synchronizační podněty působící v nevhodnou dobu nebo nedostatek synchronizačních signálů mohou vést k oslabení funkce cirkadiánních hodin, což může mít za následek destabilizaci vnitřní homeostázy a přispět ke zhoršení mentální i fyzické kondice člověka. U jedinců s genetickými predispozicemi může desynchronizace vnitřních hodin vést k rozvoji některých psychiatrických, neurologických, metabolických a jiných onemocnění.

### 1.1.1. Centrální hodinový oscilátor a jeho organizace

Centrum cirkadiánních hodin se nachází v suprachiasmatických jádrech (SCN), která jsou lokalizována v oblasti předního hypotalamu nad křížením optických vláken. SCN jsou

párovou strukturou tvořenou shlukem zhruba 20 000 neuronů. Její operativní odstranění u potkana nebo její utlačení v důsledku vaskulárního onemocnění či nádoru na hypofýze člověka vede k narušení až k úplnému vymizení cirkadiánních rytmů (Bloch, Brack, & Wirz-Justice, 2005; Borgers et al., 2011; Ralph, Foster, Davis, & Menaker, 1990).

Podstatou cirkadiánní neuronální aktivity SCN je molekulární mechanismus transkripčně translačních zpětnovazebných smyček (TTZS). TTZS byly popsány nejen v neuronech SCN, ale téměř ve všech tělních buňkách. Pokud je molekulární mechanismus hodin narušen, jsou narušeny i mechanismy hodinami řízené. Jednotný výstupní rytmický signál celého SCN vzniká až na úrovni neuronálních sítí buněčných subpopulací.

SCN je tvořeno dvěma hlavními buněčnými subpopulacemi, tzv. „core“ (jádro) a „shell“ (obal), které jsou rozlišitelné svou lokalizací, vstupními a výstupními dráhami a hlavním neurotransmiterem, který jejich neurony produkují (Leak, Card, & Moore, 1999). V „core“ SCN převažují především neurony produkující vazointestinální peptid (VIP) a v „shell“ dominují neurony produkující arginin-vasopresin peptid (AVP). V obou subpopulacích se nacházejí GABAergní neurony. Receptory pro AVP, VIP a GABA se nacházejí v obou buněčných subpopulacích, zajišťují tak komunikaci mezi sebou a koordinaci jednotného výstupního signálu z SCN jako celku. Kromě těchto tří hlavních neurotransmiterů se v SCN nacházejí i neurony obsahující neuropeptid Y, enkefalin, angiotensin II nebo substanci P, které se na funkčnosti celé neuronální sítě SCN spolupodílejí (Abrahamson & Moore, 2001).

Nedávný výzkum ukázal, že stejně významnou roli jako neurony SCN hrají při udržování a generování cirkadiánních oscilací i jeho astrocyty. Neurony jsou metabolicky aktivní především během dne, ale v noci dochází ke zvýšené aktivaci astrocytů, které regulací extracelulární hladiny glutamátu potlačují aktivitu neuronů (Brancaccio, Patton, Chesham, Maywood, & Hastings, 2017).

Vstupní dráhy do SCN zajišťují synchronizaci vnitřních hodin s vnějšími podmínkami. Nejvýznamnější synchronizační potenciál má každodenní střídání světla a tmy. Kromě světelné synchronizace jsou ale vnitřní hodiny schopné využít i nesvětelné synchronizační podněty, jako je například pravidelný příjem potravy, fyzická aktivita nebo i sociální interakce (viz kap. 1.2.2).

Do „core“ SCN vedou vstupní dráhy z retiny, intergenikulárních lístků (IGL) a mediálních rapheálních jader (MRN). Do „shell“ SCN vedou především dráhy z ostatních hypotalamických oblastí, koncového mozku, limbického systému, septa a mozkového kmene.

Nejvýznamnější synchronizační dráha je monosynaptická dráha propojující retinu a SCN, tzv. retinohypotalamický trakt (RTH). Dráha RTH je tvořena axony



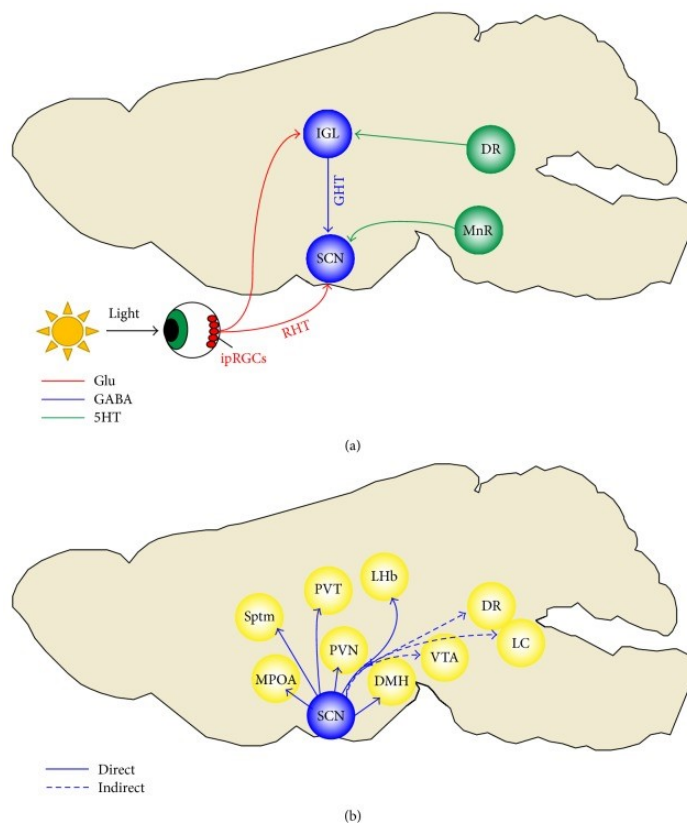
vnitřněfotosenzitivních retinálních gangliových buněk (ipRGCs, z angl. intrinsic photoresponsive retinal ganglion cells), které obsahují specifický fotopigment melanopsin (OPN4). OPN4 je citlivý převážně na světlo krátkých vlnových délek (480–500 nm), které odpovídá modré části světelného spektra. Hlavním neurotransmiterem této dráhy je glutamát. Tato vstupní dráha tak zprostředkovává světelnou synchronizaci hodin (Gooley, Lu, Chou, Scammell, & Saper, 2001).

Dráhy vedoucí do SCN z IGL a MRN hrají v regulaci a synchronizaci cirkadiálních rytmů především modulační úlohu. Přepojují do SCN jak světelné, tak i nesvětelné synchronizační signály. Dráha z IGL je označována jako genikulohypotalamický trakt (GHT) a hlavním neuropřenašečem této dráhy je GABA doprovázená neuropeptidem Y (NPY) a endorfiny.

Dráha z MRN je serotonergní. Výlev serotoninu vede k aktivaci 5-HT receptorů SCN (Morin, 2013). K aktivaci této dráhy dochází především nesvětelnými behaviorálními synchronizačními podněty (Sumova, Maywood, Selvage, Ebling, & Hastings, 1996) ( obr. 1a).

Výstupní dráhy z SCN vedou až do 15 mozkových oblastí (Morin, 2013). Byly popsány dráhy vedoucí do struktur limbického systému (laterální septum, jádra bed nucleus striae terminalis, amygdala, hippocampus, prefrontální kortex, aj.), dráhy vedoucí do struktur zodpovědných za udržení a nástup spánku (ventrální preoptická oblast, orexinergní neurony laterálního hypotalamu) (Saper, Cano, & Scammell, 2005) nebo dráhy vedoucí do dorzomediálního hypotalamu, regulujícího příjem potravy, tekutin a tělesnou hmotnost (Gooley, Schomer, & Saper, 2006) (obr. 1b).

Významnou výstupní multisynaptickou dráhou je dráha vedoucí do epifýzy, zodpovídající za regulaci rytmické tvorby melatoninu (viz kap. 1.4).



**Obr. 1 Vstupní a výstupní dráhy SCN znázorněné na mozku potkana.** a) Vstupní dráhy do SCN, RHT – retinohypotalamický trakt; GHT – genikulohypotalamický trakt; IGL – intergenikulární listek talamu, DR a MnR dorzální a mediální raphe b) Výstupní dráhy z SCN, Lhb – laterální habenula; PVN – paraventriculární jádra hypotalamu, DMH – dorzomediální hypotalamus; VTA – ventrální tegmentální oblast, DR – dorzální raphe, PVT – paraventriculární jádra talamu, Sptm – septum. Převzato z (McClung, 2007).

### 1.1.2. Hodinový molekulární mechanismus

Jelikož jsou cirkadiánní rytmy mezidruhově velmi rozšířeným a evolučně výhodným starým znakem, je zjevné, že podstata vnitřních hodin bude mít základ v konkrétních genech. Genetické komponenty molekulárních hodin byly označeny jako tzv. hodinové geny. Za odhalení funkce jednotlivých komponent hodinového mechanismu získala v roce 2017 trojice vědců Nobelovu cenu za medicínu a fyziologii (Siwicki, Hardin, & Price, 2018). Dnes je již molekulární hodinový mechanismus velmi dobře popsán, ale i tak jsou na poli tohoto výzkumu neustále objevovány nové modulační mechanismy, které funkci hodin ovlivňují.

Celý hodinový mechanismus spočívá v rytmické aktivaci exprese hodinových genů, tvorbě jejich proteinových produktů a jejich vzájemných interakcích. Za generování autonomního rytmu odpovídá mechanismus pozitivně a negativně se ovlivňujících TTZS, kterých se tyto hodinové geny účastní. Mezi pozitivní komponenty TTZS patří proteiny

CLOCK a BMAL1. Na BMAL1 se nachází strukturální proteinová doména PAS, která má dimerizační funkci, a umožňuje tak vytvoření heterodimeru CLOCK-BMAL1. V oblasti koncového mozku byl identifikován funkční homolog genu *Clock*, *neuronal PAS domain 2* (NPAS2), který je schopen vytvářet alternativní heterodimer NPAS2-BMAL1 (Reick, Garcia, Dudley, & McKnight, 2001). CLOCK-BMAL1 se pomocí bHLA (basic helix-loop-helix) DNA vazebné domény váže přímo do enhancerové oblasti zahrnující sekvenci E-box (CACGTG), která se nachází v promotorech hodinových genů *Period 1–3*, *Cryptochrom* (*Cry1* a *Cry2*) a pozitivně reguluje jejich expresi.

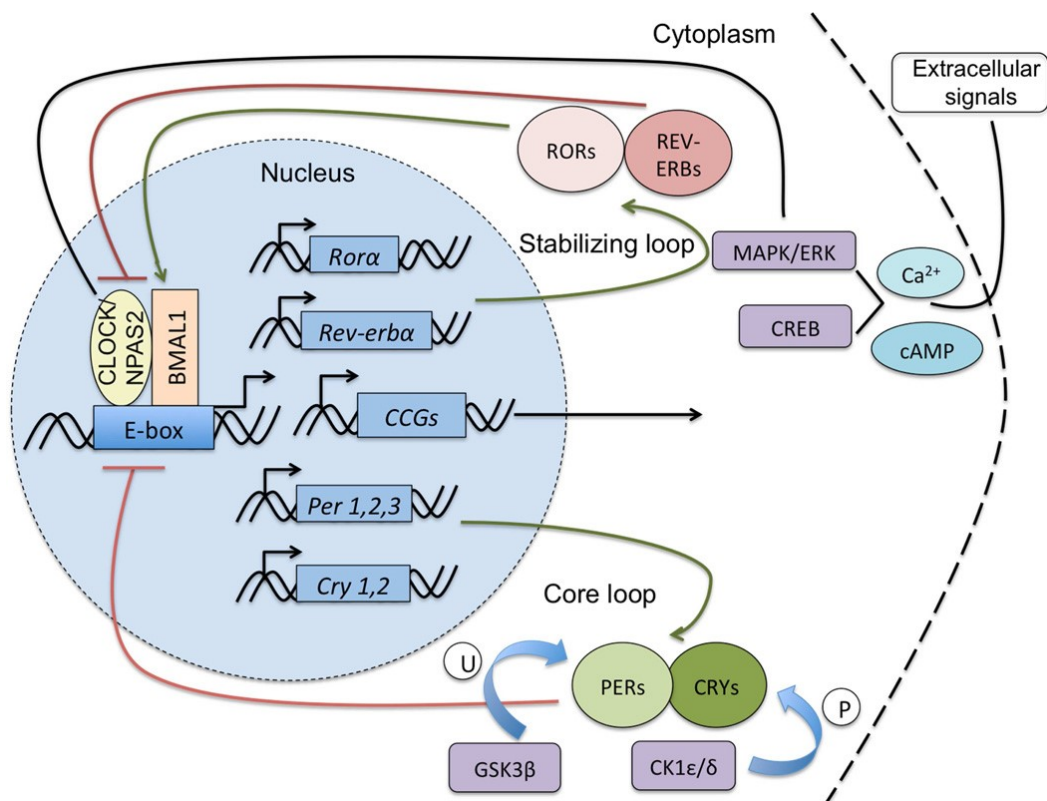
Geny *Per* a *Cry* jsou součástí tzv. negativní TTZS. mRNA genů je translokována do cytoplazmy, kde vznikají proteiny PER a CRY. Proteiny PER obsahují stejně jako BMAL1 dimerizační doménu PAS, která jim umožňuje tvořit jednak homodimery (PER-PER) a jednak také heterodimery (PER-CRY). Významnou úlohu v dynamice TTZS hrají kinázy. Kasein kináza epsilon/delta (CKI $\epsilon/\delta$ ) a glykogen-syntéza kináza 3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) svojí fosforylační aktivitou ovlivňují stabilitu proteinu, jeho ochotu dimerizovat nebo maskují jeho jaderný lokalizační signál (Harms, Young, & Saez, 2003; Iitaka, Miyazaki, Akaike, & Ishida, 2005a). Fosforylovaný PER je degradován v proteazómu, současně je ovšem jeho fosforylace nezbytná pro tvorbu heterodimeru PER-CRY. Fosforylace tak zpomaluje dimerizační proces a následnou translokaci heterodimeru do jádra. Mutace CKI $\epsilon/\delta$  má tak za následek zkrácení cirkadiánní periody svého nositele (H. Lee, Chen, Lee, Yoo, & Lee, 2009). V jádře se PER-CRY váže na BMAL1-CLOCK, čímž inhibuje jeho aktivační působení, a negativně tak ovlivňuje vlastní expresi (Hastings, Maywood, & Brancaccio, 2019).

Vedlejší regulační TTZS se podílí především na regulaci exprese hodinového genu *Bmall*. REV-ERB $\alpha$  (kódovaný genem *Nr1d1*) funguje jako transkripční faktor a váže se do RORA, regulační oblasti v promotoru *Bmall*. Tímto mechanismem expresi *Bmall* inhibuje. Současně toto vazebné místo soupeří s ROR $\alpha$ , transkripčním faktorem, který naopak expresi *Bmall* aktivuje. Promotor *Rev-erba* obsahuje sekvenci E-box, je tedy aktivován BMAL1-CLOCK a inhibován CRY-PER. Tímto mechanismem je uzavřena druhá negativní zpětnovazebná smyčka (Sato et al., 2004).

Sekvence E-box a regulační sekvence RORA byly identifikovány i v promotorech dalších genů, tyto geny jsou označovány jako hodinami řízené geny, a jejich produkce má tudíž cirkadiánní charakter (shrnutí v obr. 2).

Na regulaci a modulaci molekulárního hodinového aparátu se podílí i řada dalších posttranskripčních mechanismů. Intenzivně studovaným faktorem molekulární biologie jsou dnes nekódující RNA. Ukazuje se, že řada těchto nekódujících RNA má cirkadiánní rytmus s vysokou amplitudou. U myši bylo popsáno přes 1 000 rytmujících nekódujících

RNA, identifikovaných v řadě různých tkání (Zhang, Lahens, Ballance, Hughes, & Hogenesch, 2014). U dvou z nich, miR-219 a miR-132, již byla prokázána úzká provázanost s cirkadiálním systémem. Knockdown miR-219 vede k prodloužení vnitřní periody, miR-132 je indukována při světelné stimulaci pomocí mitogen-aktivované protein kinázy (MAPK)/cAMP response-element binding protein (CREB, z angl. cAMP response element) signalizační dráhy (Cheng et al., 2007). Roli v regulaci cirkadiálního systému budou pravděpodobně hrát i dlouhé nekódující RNA (lncRNA z angl. long non-coding RNA). U velkého množství z nich byly detekovány cirkadiální oscilace v jejich expresi a u řady z nich byla popsána přítomnost vazebné domény E-box nebo RORA, lze je tedy klasifikovat jako hodinami kontrolované geny (Fan et al., 2017; Rey et al., 2011).

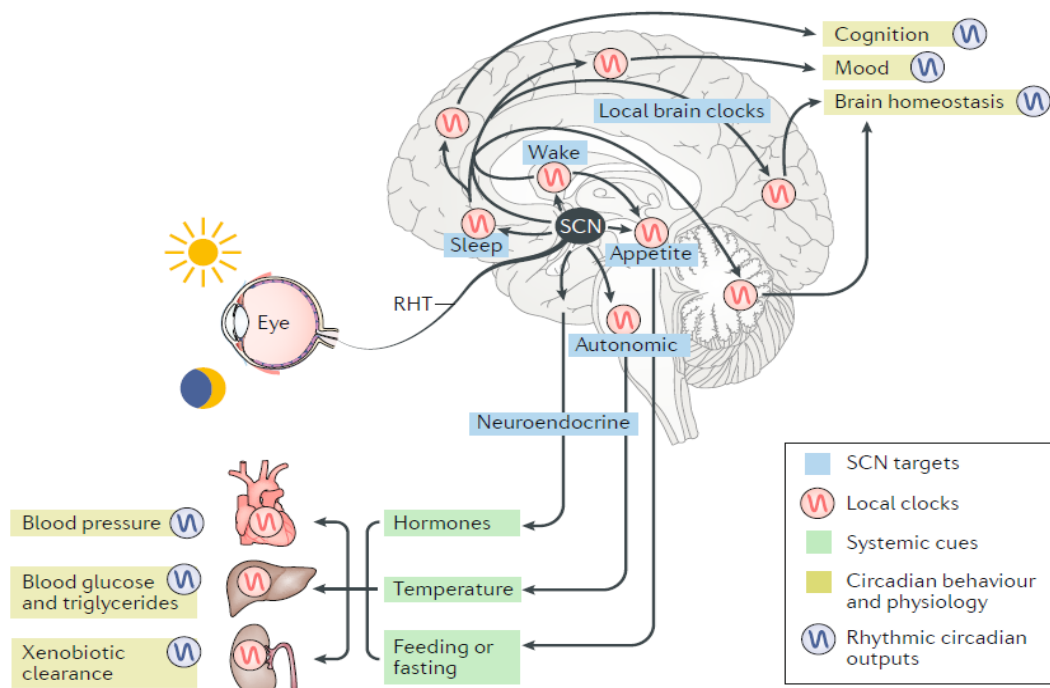


**Obr. 2 Molekulární hodinový mechanismus** Centrálním heterodimerem je CLOCK (nebo NPAS) a Bmal1, který se váže do sekvence E-Box genů Per a Cry a iniciuje jejich transkripci. Proteiny PER a CRY formují v cytoplasmě heterodimer a následně v jádře zpětně inhibují komplex CLOCK/NPAS-BMAL1. Současně v tzv. stabilizační smyčce CLOCK/NPAS-BMAL1 aktivují i Rev-erba a Rora, které potlačují či aktivují expresi Bmal1. E-box se nachází v dalších hodinami kontrolovaných genech (CCGs; z angl. clock-controlled genes) Kinázy CK1 a GSK3  $\beta$  ovlivňují dynamiku hodin pomocí fosforylace a ubikvitinace PER/CRY komplexu. Dynamiku hodin ovlivňují i vápníkové signalizační kaskády (MAP/ERK). Převzato z (Parekh, Ozburn, & McClung, 2015).

### 1.1.3. Hodiny v periferních strukturách

SCN není jedinou strukturou generující cirkadiánní rytmy, další cirkadiánní oscilátory se nacházejí jak v mnoha strukturách centrální nervové soustavy (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 multioscilátorového 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 neuro-humorálními signály (Hastings, Reddy, & Maywood, 2003) (obr. 3).

Hodiny v těchto periferních strukturách pomohly lépe popsat transgenní myši nesoucí gen *Per2* spojený s genem pro enzym luciferázu, případně potkani nesoucí s luciferázou spojený gen *Per1*. Vyjmuté orgány či tkáně těchto zvířat kultivované v růstovém médiu vykazovaly rytmické oscilace genů i nezávisle na SCN (Yamazaki et al., 2000; Yoo et al., 2004). Nezávislé rytmické oscilace hodinových genů lze sledovat i v lidských primárních buňkách. Schopnost udržet si rytmicky exprimované hodinové geny v podmínkách *in vitro* byla sledována u lidských fibroblastů transdukovaných lentivirovým cirkadiánním reportérovým konstruktem (S. A. Brown et al., 2005). Cirkadiánní rytmy na úrovni exprese genů lze sledovat i v jednotlivých buňkách. Krevní odběry prováděné ve 24h časovém profilu prokázaly rytmické oscilace hodinových genů v periferních jednojaderných krevních buňkách, rytmické oscilace genů je možné identifikovat v denním profilu buněk bukové sliznice nebo v buňkách získaných z vlasového folikulu (Akashi et al., 2010; Koshy, Cuesta, Boudreau, Cermakian, & Boivin, 2019). Mechanismus synchronizace periferních hodin s centrálními není dosud plně objasněn, jedná se zjevně o neuro-humorální signály, kdy významnou roli hraje především kortizol a melatonin (Cuesta, Cermakian, & Boivin, 2015; Dollins, Zhdanova, Wurtman, Lynch, & Deng, 1994; Oster et al., 2017; Pandi-Perumal et al., 2008).



**Obr. 3** Centrální oscilátor, periferní cirkadiánní oscilátory a jejich výstupní rytmy.

Centrální hodiny v SCN jsou přímo propojeny s retinou pomocí retinohypotalamického traktu (RHT) synchronizujícího hodiny se střídáním dne a noci. Z SCN vedou projekce do řady mozkových center, která často mají své lokální hodiny, jež řídí rytmické projevy chování (např. pravidelný příjem potravy, rytmus spánku a bdění), autonomní a neuroendokrinní cirkadiánní rytmy. Tyto systémové podněty synchronizují lokální molekulární hodiny v periferních tkáních, které následně regulují fyziologické rytmy důležité pro funkci organismu (např. kognitivní schopnosti, krevní tlak, funkce ledvin aj.) Převzato z (Hastings, Maywood, & Brancaccio, 2018).

## 1.2. Synchronizace cirkadiánního systému

### 1.2.1. 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).

Informaci o světle zprostředkovávají ipRGC obsahující melanopsin, které projektují glutamatergním RHT do SCN. Tyto buňky jsou zejména citlivé na světlo o vlnové délce 480–500 nm. Výlev glutamátu aktivuje především N-metyl-D-aspartátové (NMDA) receptory postsynaptické membrány VIP-imunoreaktivních buněk SCN. Modulační roli v signalizaci RHT hraje i výlev polypeptidu PACAP (z angl. pituitary adenylate cyclase-activating peptide) (Jagannath et al., 2013).

Světlo působící ve večerních či ranních hodinách může chod hodin zpomalit nebo urychlit. Světelná stimulace v první polovině noci vyvolá fázové zpoždění hodin v SCN. V tu dobu uvolněný glutamát indukuje zvýšení hladiny intracelulárních vápenatých iontů ( $\text{Ca}^{2+}$ ) v neuronech a tvorbu cyklického adenosin monofosfátu (cAMP). Nárůst  $\text{Ca}^{2+}$  v buňce a cAMP aktivují MAPK. MAPK fosforyluje CREB, který navázáním se na vazebný element CRE (cAMP response element) v promotorech hodinových genů *Per* indukuje jejich expresi v době, kdy přirozeně klesá. Zpožděný útlum transkripce genů *Per* tak vede ke zpoždění molekulárních hodin (Travnickova-Bendova, Cermakian, Reppert, & Sassone-Corsi, 2002).

Světlo v druhé polovině dne vyvolává fázové předběhnutí, které je způsobeno dřívější iniciací exprese *Per1* a *Per2* vedoucí k urychlení zpětnovazebných regulací TTZS. Indukce exprese genů *Per1* a *Per2* zřejmě spočívá v glutamátem indukované produkci oxidu dusnatého (NO). Ten aktivuje guanylát cyklázu, která vede k produkci cyklického guanozinmonofosfátu (cGMP) a následné aktivaci cGMP-dependentní protein kinázy a fosforylaci CREB (Shigeyoshi et al., 1997).

### **1.2.2. Mechanismy nesvětelné 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. Na popsání mechanismů nesvětelné synchronizace u laboratorních zvířat se významně podílela laboratoř Nicholase Mrosovského, publikující zejména na přelomu osmdesátých a devadesátých let. Autoři detailně popsali mechanismy nesvětelné synchronizace vzrušivými podněty, vynucenou pohybovou aktivitou nebo časovanou sociální interakcí zvířat. V podmínkách konstantní tmy vedly tyto signály k synchronizaci a fázovému posunu rytmu v pohybové aktivitě zvířat, který je nejpoužívanějším neinvazivním markerem pro popis funkčního stavu cirkadiálního pacemakeru. Na mechanismech nesvětelné synchronizace se podílí především dráha z IGL do SCN, kde je hlavním neuropřenašečem neuropeptid Y.

Doplňující modulační efekt účastníci se nesvětelné synchronizace má i rapheální serotonergní dráha vedoucí do SCN (Hut, Mrosovsky, & Daan, 1999; Mrosovsky, 1988, 1995; Reeb & Mrosovsky, 1989) (obr. 4).

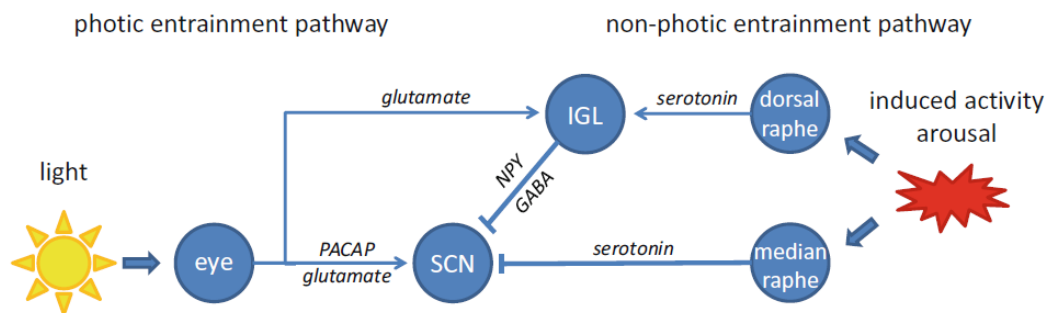
Nesvětelná synchronizace se do jisté míry podílí na synchronizaci hodin také u člověka. Silným synchronizátorem periferních hodin je pravidelný příjem potravy. Časovaný příjem potravy dokáže udržet cirkadiánní rytmy v metabolicky aktivních tkáních synchronizované i v konstantním prostředí. Dosavadní práce ovšem synchronizační efekt potravy přímo na SCN neprokázaly. Pokud dojde ke konfliktu světelného a potravního synchronizačního signálu, potrava je přijímána v neaktivní fázi dne (v animálních experimentech označováno jako „restricted feeding“), dochází k rozpojení cirkadiánního systému a centrální hodiny si udržují synchronizaci podle světelných synchronizačních podnětů a naopak periferní hodiny metabolicky aktivních tkání jsou synchronizované s rytmem příjmu potravy (Damiola et al., 2000). Zajímavé je, že aktivita zvířat v režimu „restricted feeding“ je sice synchronizovaná se světelným režimem, ale dochází u nich ke zvýšené pohybové aktivitě těsně před podáním potravy. Předpokládá se, že za toto chování je zodpovědný tzv. „food-entrainable oscilátor“, fungující nezávisle na SCN, jehož lokalizace je dosud nevyjasněná (Stephan, 2002).

Vnitřní hodiny jsou citlivé i na synchronizaci pohybovou aktivitou. Schopnost hodin posouvat nebo synchronizovat cirkadiánní rytmy pomocí pohybové aktivity prokázala řada experimentů s animálními modely. Nejčastěji tyto experimenty využívají běhací kolečko. Takto indukovaná pohybová synchronizace u některých druhů laboratorních zvířat vede až k úplnému přesunu pohybové aktivity do jejich původně neaktivní fáze dne (Kas & Edgar, 1999). Pohybová aktivita má synchronizační účinek i na lidský cirkadiánní systém. Pravidelná a správně načasovaná aktivita vede k posílení funkce cirkadiánních rytmů. Hraje důležitou roli ve stáří, kdy bývají rytmus a synchronizace vnitřních hodin oslabeny (Van Someren, Lijzenga, Mirmiran, & Swaab, 1997).

Vliv cvičení na synchronizaci vnitřních hodin velmi pěkně prokázaly dvě výzkumné skupiny, které jako marker fáze vnitřních hodin využily nástup nebo pokles melatoninu. Melatonin je hodinami přímo řízený (viz kap. 1.4), je tedy vhodným ukazatelem fázového stavu vnitřních hodin. Tyto studie ukázaly, že cvičení v druhé polovině noci vedlo u subjektů k výraznému fázovému zpoždění cirkadiánních rytmů. Podobný, ale slabší efekt mělo cvičení brzy ráno a cvičení v odpoledních hodinách vedlo k fázovému předběhnutí (Baehr et al., 2003; Buxton, Lee, L'Hermite-Baleriaux, Turek, & Van Cauter, 2003). Experiment s animálními modely nahrávající elektrickou aktivitu SCN *in vivo* potvrdil, že správné načasování cvičení vede ke zvýšení cirkadiánní amplitudy ve vnitřních hodinách (van Oosterhout et al., 2012).



Starší práce popisující sociální synchronizaci člověka v podzemních bunkrech ukázaly, že vnitřní hodiny subjektů běžely volně v čase, ale mezi subjekty byly rytmy synchronizované (Wever, 1975). Později ale tyto výsledky vyvrátila práce kolektivu Middleton et al. (1996). Rytmy subjektů v této studii běžely volně v čase nezávisle na sobě (Middleton, Arendt, & Stone, 1996). Zdá se tedy, že sociální synchronizace u člověka nebude dostatečně silná, aby rytmus vnitřních hodin seřídila sama o sobě, ovšem v kombinaci s dalšími výše zmíněnými nesvětelnými signály dokáže hodiny efektivně synchronizovat. Toto tvrzení lze velmi dobře demonstrovat studii sledujícími cirkadiální systém slepců, které poukazují na variabilitu v efektivitě jejich synchronizace. U slepců s diagnostikovanou absolutní slepotou často dochází k neschopnosti synchronizovat vnitřní hodiny s 24h délkou dne a jejich fyziologické rytmy často volně běží v čase i přes snahu udržet pravidelný denní režim. Kolektivu Klerman et al. se u některých subjektů s absolutní slepotou podařilo experimentálně prokázat schopnost synchronizace pouze pomocí nesvětelných synchronizačních podnětů, kdy subjekty v kontrolovaných podmínkách pomocí časovaného cvičení a přesného režimu spánku a bdění udržely synchronizované vnitřní rytmy s délkou vnější periody (Klerman et al., 1998). Obecně je u těchto pacientů synchronizace složitá a nejčastěji je jako synchronizační signál využíván exogenně podávaný melatoninový suplement (Lockley, Arendt, & Skene, 2007).



#### **Obr. 4 Dráhy světelné a nesvětelné synchronizace SCN**

*Přímá vstupní dráha z ipRGCs, RHT vede světelný vstup do SCN prostřednictvím excitační glutamatergní neurotransmise doprovázené PACAP. Nepřímá dráha z ipRGCs vede do IGL, kde interaguje s nesvětelnou serotonergní synchronizační dráhou, která vysílá své projekce z dorzálního raphe a vyvolává excitační odpovědi v IGL. IGL působí na SCN inhibičně skrze GABA NPY neurotransmisi. Dráha z mediálního raphe také využívá serotonergní projekce, ty ale vedou přímo do SCN a inhibují přímo jeho aktivitu. Neuronální aktivita rapheálních jader je indukována pohybovou aktivitou nebo vzrušivými podněty. Převzato z (Wams, Riede, van der Laan, ten Bulte, & Hut, 2017)*

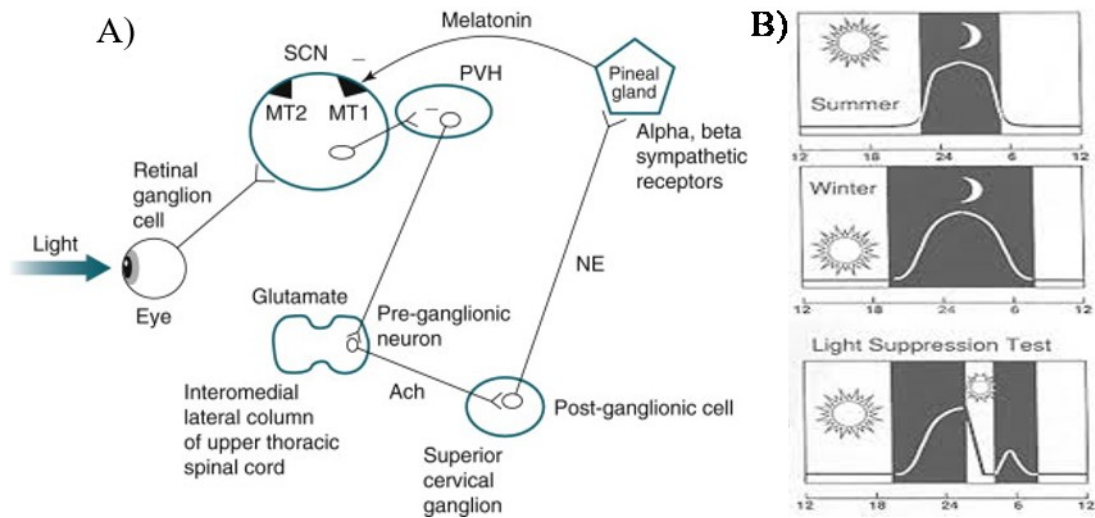
### 1.3. Melatonin jako synchronizátor a ukazatel vnitřních hodin

Melatonin produkovaný epifýzou hraje v organismu roli v řadě důležitých procesů. Je důležitý v iniciaci spánku, má silné antioxidační účinky, které mají i neuroprotektivní efekt, a v cirkadiánním systému hraje důležitou roli jednak jako synchronizátor periferních hodin řízený z SCN a jednak dokáže i zpětně seřizovat chod hodin v SCN a informovat je tak o změně délky fotoperiody. Délka melatoninového signálu u savců, ptáků, ale i u rostlin a dalších organismů souvisí i s iniciací reprodukčního chování (Masson-Pevet & Gauer, 1994).

Melatoninová produkce je přímo řízená centrálními hodinami v SCN a vykazuje robustní cirkadiánní rytmus s nízkou denní hladinou a vysokou hladinou v noci (obr. 5b). Dráha řídicí jeho tvorbu vede z SCN do PVN. V průběhu noci dojde k útlumu aktivity neuronů SCN inhibujících dráhu do PVN, což vede k aktivaci glutamatergní dráhy vedoucí z PVN do páteřní míchy, aktivaci pregangliových neuronů, výlevu acetylcholinu stimujícího postgangliové buňky cervikálního ganglionu, které vedou jako noradrenergní synaptická projekce do epifýzy. Stimulace adrenergních receptorů epifýzy vede k transkripci a aktivaci aralkylamin N-acetyltransferázy (AANAT) zodpovědné za tvorbu melatoninu (Klein and Moore, 1979; Illnerova and Vanecek, 1984). Takto produkovaný melatonin je uvolňován do mozkomíšního moku a skrze hematoencefalickou bariéru se dostává do krevního oběhu. Melatonin primárně působí přes membránové melatoninové receptory spřažené s G-proteiny MT1 a MT2, které se nacházejí i na SCN (obr. 5a). Melatonin skrze tyto receptory inhibuje elektrickou aktivitu SCN a způsobuje fázový posun hodin jak ve směru fázového zpoždění, tak i fázového předběhnutí v závislosti na době jeho účinku. Tímto mechanismem hodinám zpětně předává informaci např. o změně délky fotoperiody nebo pomáhá resynchronizovat hodiny po přeletu časových pásem aj. Fázového zpoždění i předběhnutí lze docílit i exogenně podávaným melatoninem (Burgess, Revell, Molina, & Eastman, 2010; Gillette & McArthur, 1996). Produkce melatoninu je velmi citlivá na světlo a i krátký světelný pulz o nízké světelné intenzitě (1–30 luxů) vede k okamžité inhibici jeho tvorby (Illnerova, Backström, Sääf, Wetterberg, & Vangbo, 1978; Lewy, Wehr, Goodwin, Newsome, & Markey, 1980) (obr. 5b). U některých jedinců byl supresivní efekt pozorován i při intenzitě < 3 luxy (Phillips et al., 2019). Nejeftektivnější potlačení melatoninové produkce způsobuje světlo o vlnové délce 460–480 nm (Brainard et al., 2001).

Přímé řízení produkce melatoninu z SCN umožňuje využití melatoninového signálu jako velmi přesného ukazatele fáze a vnitřního času cirkadiánních hodin člověka. Nástup a pokles melatoninu měřený v podmínkách tzv. „dim light melatonin onset“ (DMLO), tj.

při takovém světle, které nevede k inhibici jeho přirozeného, hodinami řízeného nárůstu, může poměrně přesně určovat počátek a konec subjektivní noci člověka. Hladiny melatoninu lze detekovat v krevní plazmě, ve slině nebo v moči ve formě jeho metabolitu 6-sulfoxymelatoninu (J. Arendt, 2019).



**Obr. 5 a) Dráha řídicí tvorbu melatoninu.** V průběhu dne nebo vlivem světelné expozice během noci působí SCN inhibičně na dráhu aktivující tvorbu melatoninu. Melatonin tvořený epifýzou zpětně přes MT1 a MT2 receptory inhibuje aktivitu neuronů SCN a tak zpětně potencuje vlastní produkci a přispívá k synchronizaci hodin (Berry, 2012) **b) Změna hladiny melatoninu v závislosti na délce fotoperiody a osvětlení v průběhu noci** (Sack, Blood, Hughes, & Lewy, 1998)

Lipofilní podstata melatoninu mu umožňuje i volně procházet přes plazmatickou membránu a vázat se na cytosolický receptor (MT3) a jaderné receptory (ROR/RZR $\alpha$  a RZR $\beta$ ) (Becker-André et al., 1994; Boutin, 2016).

Receptory MT1 a MT2 byly popsány i v řadě dalších periferních tkání. Kromě membránových receptorů může melatonin díky své lipofilní povaze procházet přes buněčnou membránu a působit i na cytosolický receptor (MT3) a jaderné receptory (ROR/RZR $\alpha$  a RZR $\beta$ ) (Becker-André et al., 1994; Boutin, 2016). Předpokládá se, že aktivací těchto receptorů se melatonin podílí na synchronizaci hodin v periferních strukturách. Animální studie potvrdily synchronizační účinek melatoninu na hodiny v myokardu, ve dřeni nadledvinek či v experimentech *in vitro* na hodiny v kulturách adipocytů (Alonso-Vale et al., 2008; Valenzuela et al., 2008; Zeman & Herichova, 2013). Melatonin hraje též významnou úlohu v regulaci imunitní odpovědi a je zodpovědný za cirkadiánní regulaci slezinou produkovaných lymfocytů (Drazen, Bilu, Bilbo, & Nelson, 2001).

Kromě epifyzy je melatonin v nemalé míře produkován i buňkami jiných tkání. Jeho tvorba byla například identifikována v buňkách retiny, kde hraje významnou roli v synchronizaci vlastních semiautonomních retinálních hodin i jako antioxidant (Green & Besharse, 2004; Yu, Pang, & Tang, 1981). Velké množství melatoninu je syntetizováno také ve střevě, kde se zdá, že funguje jako signální molekula střevní mikroflóry (Konturek, Konturek, Brzozowski, & Bubenik, 2007; Paulose & Cassone, 2016). Tvorba melatoninu byla také identifikována v buňkách kostní dřevě (Conti et al., 2000). Melatoninové receptory se nacházejí i na membráně mitochondrií v neuronech a ukázalo se, že melatonin produkuje samotné mitochondrie. Mitochondriální melatonin bude mít pravděpodobně výrazně neuroprotektivní účinky (Suofu et al., 2017).

#### **1.4. 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 (Antunes, Levandovski, Dantas, Caumo, & Hidalgo, 2010; Davis & Mirick, 2006; 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 cirkadiálních oscilací z centrálních hodin začne vzájemně fázově rozcházet.

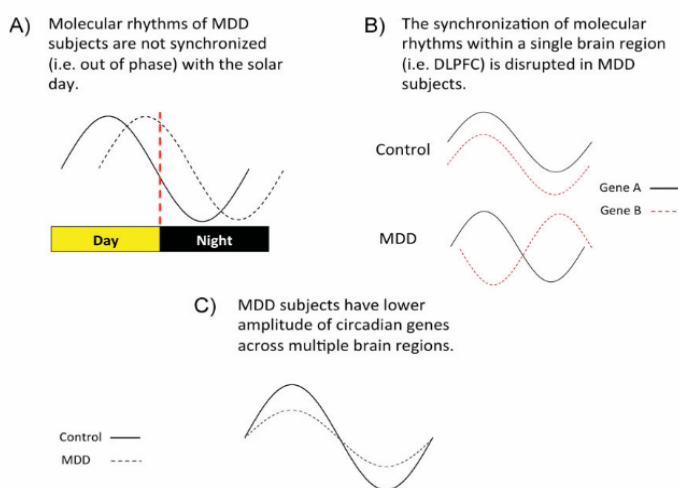
Desynchronizační událost, jako je například přelet více časových pásem, práce v noci, (Inder, Crowe, & Porter, 2016), spánková deprivace nebo časté narušování chodu

hodin nepravidelným životním režimem, může působit jako spouštěcí signál afektivních onemocnění (Katz, Knobler, Laibel, Strauss, & Durst, 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.

#### 1.4.1. 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 snižovat, 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 (J. Z. Li et al., 2013) (obr. 6). S cirkadiánním systémem úzce interaguje také řada léků užívaných k léčbě afektivních poruch a úspěšnost léčby často souvisí se zlepšením cirkadiánních 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 & Suppes, 1999; Wehr, 2018) (viz kap. 1.6.5).

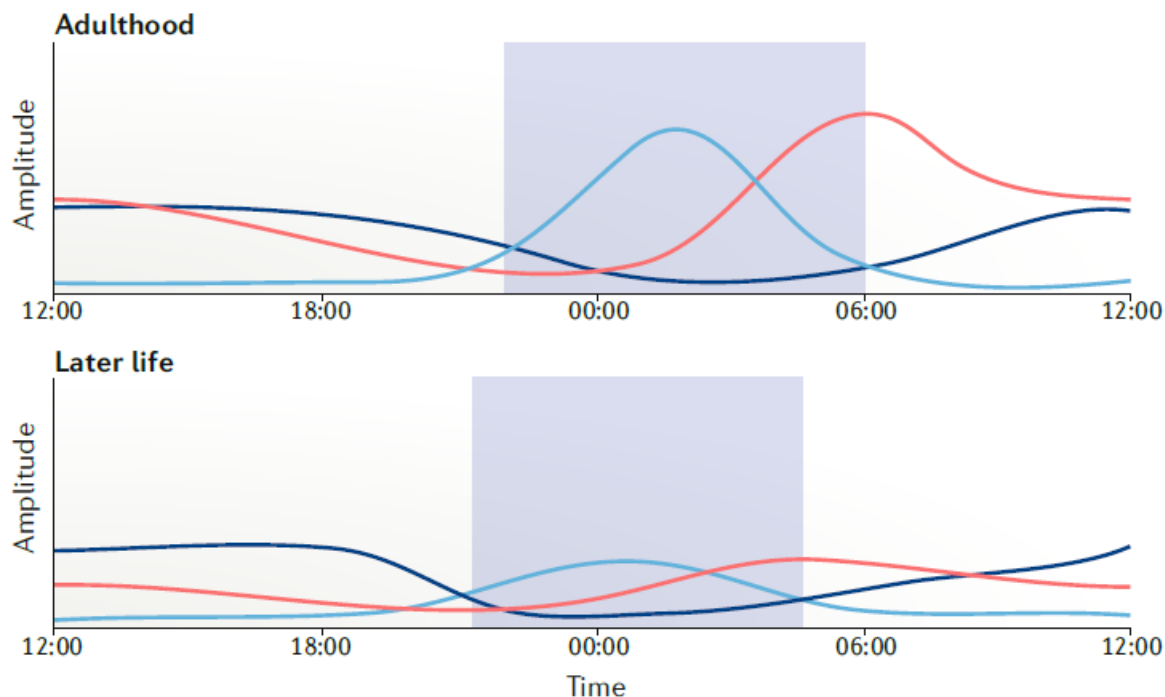


**Obr. 6. Schematické znázornění narušené cirkadiánní synchronizace genové exprese u pacientů s unipolární depresí (UD; MDD, z angl. major depressive disorder). A) Schéma znázorňující vnitřní fázovou desynchronizaci subjektu s UD (přerušovaná křivka) s délkou solárního dne. B) Schéma znázorňující synchronizovanou expresi dvou rytmických genů v rámci jedné mozkové oblasti u kontrol a narušenou synchronizaci u pacientů s UD. C)**

*Schéma znázorňující snížení amplitudy rytmu exprimovaného genu u pacientů s UD ve srovnání se zdravou kontrolou. Převzato z (N. Edgar & McClung, 2013).*

#### **1.4.2. Desynchronizace a neurodegenerativní onemocnění**

Narušení 24h cirkadiálního rytmu je běžným jevem, ke kterému v průběhu stárnutí dochází (obr. 7). 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 (Hooghiemstra, Eggermont, Scheltens, Van Der Flier, & Scherder, 2015; Naismith et al., 2014; Ortiz-Tudela et al., 2014; Weissová, Bartoš, Sládek, Nováková, & Sumová, 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).



**Obr. 7** Schematické znázornění změny amplitudy melatoninu (světle modrá), kortizolu (červená) a tělesné teploty (tmavě modrá) v dospělosti (nahore) a u stárnoucí populace (dole) v průběhu dne. Převzato z (Logan & McClung, 2019).

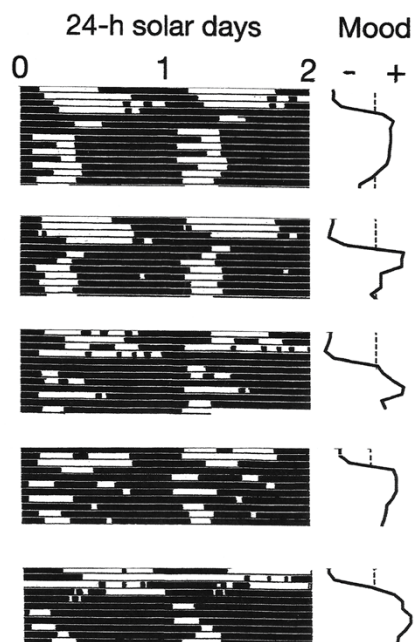
#### 1.4.3. Vybraná afektivní onemocnění spojená s poruchou cirkadiálního systému

SCN jsou zapojeny do řady neuronálních okruhů v CNS. Vycházejí z nich dráhy do přibližně 15 oblastí mozku, především pak do hypotalamických oblastí a do limbického systému. Přímé projekce vedou do amygdaly, laterálního septa a habenuly a nepřímé projekce vedou přes paraventriculární talamická jádra i do mediálního prefrontálního kortexu (mPFC) (Abrahamson & Moore, 2001; Morin, 2013). Projekce SCN do dorzomediálních jader hypotalamu je zodpovědná za cirkadiální rytmus spánku a bdění a projekce do mPFC ovlivňují rytmické oscilace nálady a kognitivních funkcí během dne. Cirkadiální systém je tedy úzce provázán s etiologií řady psychiatrických onemocnění. U zdravého člověka kolísá pravidelně v průběhu dne mentální výkon, lze sledovat i pravidelné oscilace nálady. Nepravidelné, neočekávané změny nálad a narušený rytmus spánku a bdění jsou chronobiologické markery, které mohou poukazovat na rozvoj depresivních onemocnění, jako jsou UD, bipolární afektivní porucha (BAP), nebo také schizofrenie (Boivin, 2000; Gordijn, Beersma, Bouhuys, Reinink, & Van den Hoofdakker, 1994; Wehr, 2018).

### 1.4.3.1. Bipolární afektivní porucha

BAP je chronické onemocnění, pro které je typické střídání manické a depresivní fáze, doprovázené změnami a nestabilitou spánkového rytmu. Rozšíření onemocnění v populaci dosahuje asi 1 % a jeho výskyt je geneticky podmíněný. Dědičnost tohoto onemocnění se pohybuje mezi 60–85 %. V posledních letech byla identifikována řada genů a specifických oblastí DNA, které souvisí s výskytem BAP, a to včetně genů, které jsou součástí cirkadiánní TTZS (Weber et al., 2011; Ikeda et al., 2017; Mühlisen et al., 2014, Hou et al., 2016, Cichon et al., 2011).

Typickým projevem tohoto onemocnění je pravidelné střídání nálad spojené s výraznými změnami aktivity. Tyto projevy bývají současně doprovázeny hypersomnií v průběhu depresivní fáze či insomnií během manické fáze (Harvey, 2008; Ohayon & Roth, 2003). Bylo popsáno, že právě narušení pravidelných rytmů, nejčastěji narušení rytmu spánku (například spánková deprivace), vede k iniciaci nejčastěji manické epizody nebo k velmi rychlému přepnutí z depresivní fáze do manické (obr. 8).

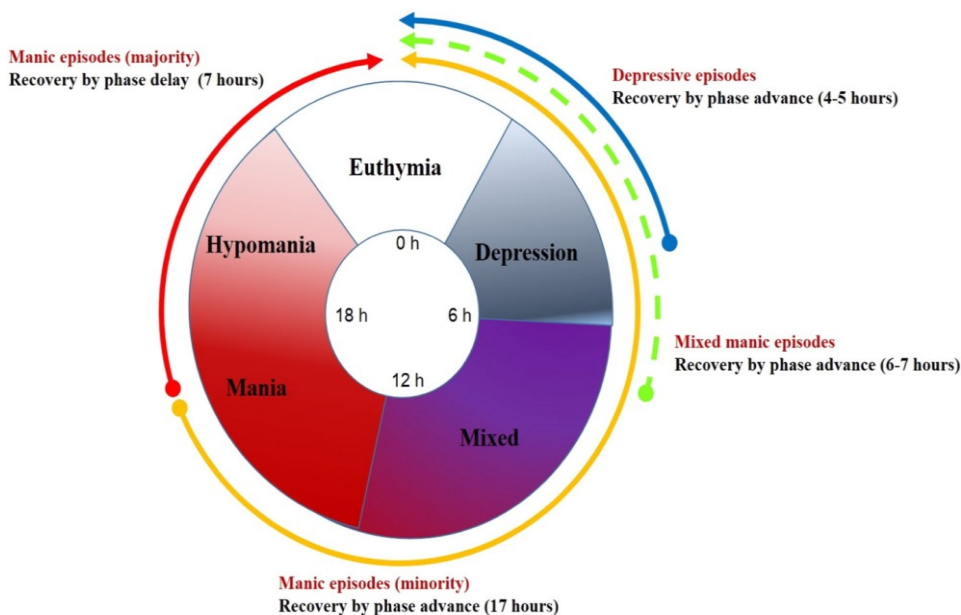


**Obr. 8** Znárodnění vlivu jednoho dne spánkové deprivace, která způsobuje převrat z depresivní do manické epizody u pacientů s BAP. Na obrázku je zachycena pohybová aktivita ve 48h intervalech. Černá oblast označuje aktivní úseky, bílá pole znázorňují spánek. Křivka po pravé straně naznačuje změnu nálady v čase, přičemž znaménko – označuje depresivní fázi a + manickou fázi. Převzato z (Wehr, 2018).

Změny behaviorálních markerů cirkadiánních rytmů byly u pacientů s BAP popsány již před lety. Bylo patrné, že během depresivní fáze dochází k fázovému zpoždění rytmu jejich pohybové aktivity oproti zdravým subjektům, což poukázalo na prodlouženou délku periody vnitřních hodin pacientů s BAP. Naopak během manické fáze se cirkadiánní cyklus



pohybové aktivity zkrátit. Tendence ke zkracování periody byly sledovány již těsně před propuknutí manické epizody (Wehr, Wirz-Justice, Goodwin, Duncan, & Christian Gillin, 1979). Rozdíly mezi manickou a depresivní fází byly sledovány i v dalších cirkadiálních parametrech. U pacientů v manické fázi byl sledován netypický nárůst denní hladiny melatoninu (Kennedy, Kutcher, Ralevski, & Brown, 1996; Nováková, Praško, Látalová, Sládek, & Sumová, 2015; Robillard et al., 2013). U pacientů v manické fázi byla amplituda rytmu v expresi hodinových genů větší ve srovnání s kontrolní skupinou a rytmus fázově předbíhal rytmus hodinových genů během depresivní epizody (Nováková et al., 2015). Fázové změny u pacientů s BAP v závislosti na manické či depresivní epizodě popsala i nedávná korejská studie (Moon et al., 2016). Tato práce sledovala rytmus kortizolu a hodinových genů a zjistila, že u pacientů v akutní manické fázi byl rytmus v těchto cirkadiálních markerech ve srovnání s kontrolní skupinou přibližně o 7 hodin fázově zpožděn a v depresivní fázi byly tyto rytmy přibližně o 6 hodin fázově předběhnuty. Po stabilizaci jejich stavu došlo i k normalizaci fázových posunů v těchto parametrech (Moon et al., 2016) (obr. 9). Zdá se tedy, že během manické a depresivní fáze onemocnění se vnitřní hodiny chovají jinak.



**Obr. 9 Schéma znázorňující hypotetický model fázového posunu u pacientů s BAP.** Navržený model podle studie Moon et al. 2016 předpokládá, že v manické fázi jsou cirkadiální rytmy pacientů s BAP fázově zpožděné (červená tečka) a po stabilizaci stavu dojde k normalizaci fáze cirkadiálních rytmů (červená šipka). V průběhu depresivní fáze jsou cirkadiální rytmy naopak fázově předběhnuté (modrá tečka) a po stabilizaci stavu pacienta též dojde k normalizaci fáze cirkadiálních rytmů (modrá šipka). Převzato z (Moon et al., 2016).

Experimenty využívající buněčné kultury *in vitro*, které nejsou citlivé na interakci s prostředím nebo na okamžité podmínky vnějšího prostředí subjektu, dobře popisují endogenní stav hodin ovlivněný pouze genetickým nebo epigenetickým pozadím. Yang et al. (2009) ve své studii využívali fibroblasty pacientů s BAP v buněčných kulturách a popsali signifikantní pokles amplitudy v rytmické expresi hodinových genů *Bmal1*, *Rev-erba*, *Dbp* (S. Yang, Van Dongen, Wang, Berrettini, & Bućan, 2009). Fibroblasty pacientů s BAP vykazovaly také signifikantně delší periodu než fibroblasty kontrolních subjektů. V kulturách lidských fibroblastů bylo také zjištěno signifikantní snížení hladiny fosforylované formy GSK3 $\beta$ , tedy zvýšení její aktivované formy (Michael J. McCarthy et al., 2019). GSK3 $\beta$  hraje důležitou roli v hodinovém molekulárním mechanismu. Za běžných podmínek aktivovaná GSK3 $\beta$  fosforyluje proteiny REV-ERB $\alpha$ , BMAL1, PER2, CRY2 i CLOCK. Fosforylace jednotlivých komponent vede ke stabilizaci proteinových produktů hodinových genů, a tím se podílí na dynamice TTZS.

Souvislost cirkadiánního systému s BAP potvrzují i genetické studie popisující přímou spojitost polymorfismů hodinových genů s výskytem BAP. U hodinového genu *Per3* byl prokázán rozdíl v počtu tandemových repetitivních sekvencí (VNTR), který souvisí s rozvojem BAP typu I. U pacientů, kteří nesou kratší, čtyřikrát se opakující repetitivní motiv homozygotně na obou alelách genu *Per3* (*Per3<sup>4/4</sup>*), se onemocnění projevuje v nižším věku než u pacientů nesoucích delší variantu v obou alelách genu *Per3* (*Per3<sup>5/5</sup>*). U genu *Per3* byla také identifikována dvojice jednonukleotidových polymorfismů (SNP, z angl. single nucleotide polymorphism) rs707467 a rs10462020, které souvisí s výskytem BAP (Benedetti et al., 2008). Dále byl sledován výskyt SNP hodinového genu *Clock* u pacientů s BAP, kde došlo k záměně thyminu za cytosin v poloze genu 3111 (3111C/T) a genu pro VIP (Soria et al., 2010). Ukázalo se, že u nositelů homozygotní alely C v genu *Clock* byla zvýšena incidence BAP (K. Y. Lee et al., 2010), nositelé vykazovali dvojnásobně častější recidivu manické či depresivní epizody a byla pozorována také častější recidiva insomnických potíží (Benedetti et al., 2003). Zajímavé je také, že jako jeden z animálních modelů pro studium manické fáze BAP se využívají myši s genetickou modifikací v genu *Clock* (*Clock $\Delta$ 19*) (Roybal et al., 2007; van Enkhuizen, Minassian, & Young, 2013).

Rozvoj BAP typu I by mohl souviset i s SNP v promotorové oblasti genu pro GSK3 $\beta$ . Dvě nezávisle běžící studie informovaly, že SNP (-50T/C) může ovlivnit klinickou odpověď na terapeutické podávání lithia. Současně některé studie naznačují, že SNP GSK3 $\beta$  v homozygotní T/T formě by mohl souviset s ontogeneticky časnějším rozvojem tohoto onemocnění (Adli et al., 2007; Michelon et al., 2006).

V europoidní populaci byl prokázán signifikantně zvýšený výskyt polymorfismu *Cry1* varianty rs8192440 a *Nr1D1* varianty rs2071427 u pacientů odpovídajících na léčbu lithiem (Mccarthy et al., 2011).

#### 1.4.3.2. Unipolární deprese

Unipolární deprese je onemocnění, jehož heritabilita se pohybuje kolem 37 % a podle nejnovějších informací Světové zdravotnické organizace (WHO) je touto nemocí postiženo kolem 264 milionů jedinců celosvětové populace. Řada klinických studií potvrdila, že tato choroba je doprovázena spánkovými obtížemi, např. insomnií, zkrácením REM fáze spánku (W. C. Duncan, Pettigrew, & Gillin, 1979), změnami rytmicity spánku a bdění, poklesem amplitudy rytmu denní pohybové aktivity (Hori et al., 2016) a dochází u nich ke změnám oscilací sekrece řady rytmicky produkováných hormonů (Posener et al., 2000; Souëtre et al., 1989).

Studie na pacientech s UD upozorňují, že u subjektů dochází ke zpoždění ukazatelů cirkadiánních rytmů. Vychází najevo, že subjekty vykazující tzv. večerní chronotyp mají vyšší pravděpodobnost rozvinutí UD a vykazují závažnější symptomy průběhu onemocnění (Müller, Kundermann, & Cabanel, 2016). K rozvoji UD často dochází také u pacientů se syndromem zpožděné spánkové fáze (Murray et al., 2017). S hypotézou fázové zpožděných hodin pracuje i terapeutický přístup využívající ranní jasné světlo, které má u pacientů indukovat fázové předběhnutí hodin. Stejně tak se ukazuje, že podobný efekt mají i antidepressiva SSRI (viz kap. 1.7) (Lam et al., 2016).

U pacientů s UD byly už v dřívějších studiích prokázány snížené hladiny melatoninu (Beck-Friis et al., 1985; R. Brown et al., 1985) či pokles amplitudy jeho rytmické tvorby (Claustrat, Chazot, Brun, Jordan, & Sassolas, 1984). Novější studie poukazuje i na fázové zpoždění v tvorbě melatoninu u pacientů s UD (Crasson et al., 2004). Zdá se, že snížené hladiny melatoninu jsou spíše typické u pacientů s melancholickými příznaky deprese (Fountoulakis et al., 2001). Ovšem vzhledem k tomu, že melatonin je velmi citlivý na světelné podmínky, že je jeho hladina u jednotlivců velmi variabilní a že s přibývajícím věkem dochází k jeho markantnímu úbytku, není melatonin úplně spolehlivým markerem.

U pacientů s UD dochází pravděpodobně i k narušení molekulárního hodinového mechanismu a synchronizace cirkadiánního systému. Studie prováděná u pacientů s UD post mortem prokázala – oproti zdravým kontrolám – desynchronizovaný rytmus exprese hodinových genů mezi šesti sledovanými mozkovými strukturami: amygdala, cerebellum, prefrontální kortex, hipokampus, cingulární kortex a nucleus accumbens. Autoři současně poukázali na to, že z 12 000 transkriptů jich přes 700 vykazovalo cirkadiánní oscilace. Ve všech sledovaných mozkových strukturách kontrolních subjektů byly mezi nejvýrazněji

rytmujícími geny identifikovány jednotlivé hodinové geny. U skupiny s UD rytmus většiny hodinových genů identifikován nebyl (J. Z. Li et al., 2013) (obr. 10).

V genetických populačních studiích pacientů s UD byly popsány i specifické polymorfismy v hodinových genech *Cry1* a *Npas2*, které souvisely s vyšší incidencí onemocnění ve sledované skupině (Soria et al., 2010).

	Control						MDD					
	DLPFC	Acg	Hip	AMY	Nac	CB	DLPFC	Acg	Hip	AMY	Nac	CB
ARNTL												
PER2												
PER3												
NR1D1												
DBP												
SFPQ												
ITIH5												
LDLR												
PER1												
INSIG1												
SLC39A14												
NFIL3												
SNTB2												
PDZRN3												
BHLHE40												
BHLHE41												

*Obr. 10 Rymicky exprimované geny v jednotlivých mozkových strukturách zdravých jedinců a pacientů s unipolární depresí. Červeně jsou označena pole signalizující rytmickou expresi genu v dané struktuře. Tučně jsou zvýrazněny geny související s molekulárním hodinovým mechanismem. AMY = amygdala, CB = cerebellum, DLPFC = dorzolaterální prefrontální kortex, Hip = hipokampus, Acg = cingulární kortex a Nac = nucleus accumbens. Převzato z (Edgar and McClung, 2013).*

#### 1.4.4. Farmakoterapeutické a nefarmakoterapeutické přístupy léčby afektivních poruch a jejich interakce s cirkadiánním systémem

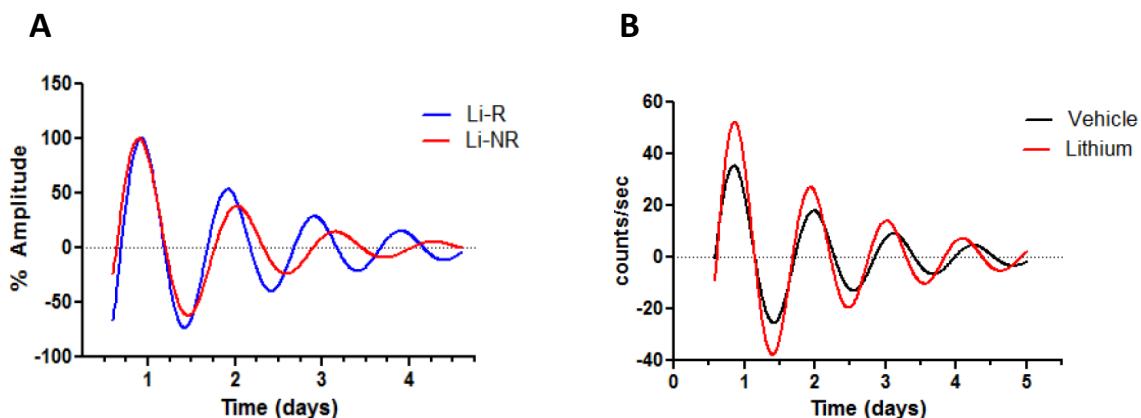
K léčbě depresivních onemocnění se v některých případech používají léky nebo terapeutické postupy, u kterých bylo prokázáno, že přímo interagují s hodinovým molekulárním mechanismem. Některé používané látky ovlivňují funkci kináz, způsobují fázové posuny rytmů nebo interferují se světelnou synchronizací. Mezi tyto látky patří lithium, z antidepresiv především SSRI (z angl. selective serotonin reuptake inhibitors) nebo agomelatin a v poslední době se ukazuje, že takto působí i ketamin známý pro svůj rychlý antidepresivní účinek.

#### 1.4.4.1. Lithium

Lithium se standardně používá ve formě chloridu lithného (LiCl) jako lék ke stabilizaci nálady a u pacientů s BAP bývá často lékem první volby. Obecně se léčba pomocí lithia považuje za velmi účinnou, ovšem 25–30 % pacientů s BAP na ni neodpovídá (Li-NR). Stejně jako BAP vykazuje vysokou míru dědičnosti, ukazuje se, že i odpověď na léčbu lithiem je geneticky determinovaná (Hou et al., 2016).

Řada studií potvrzuje, že podávání lithia při animálních, humánních i experimentech *in vitro* vede k prodloužení cirkadiánní periody. U transgenních myší PER2:LUC bylo prokázáno, že aplikace lithia vede k prodloužení periody pohybové aktivity i k prodloužení periody oscilací a nárůstu amplitudy genové exprese *Per2* v SCN organotypických kulturách i v buněčných kulturách fibroblastů (J. Li, Lu, Beesley, Loudon, & Meng, 2012). Tento efekt byl následně sledován v dalších mozkových strukturách myší PER2:LUC (Yoshikawa & Honma, 2016). U člověka bylo po podání lithia popsáno prodloužení cirkadiánní periody v rytmu tělesné teploty, rytmu pohybové aktivity a rytmu spánku a bdění (Abreu & Bragança, 2015; Johnsson, Engelmann, Pflug, & Klemke, 1983; Kripke, Mullaney, Atkinson, & Wolf, 1978).

Ovšem u pacientů s BAP je spíše pozorována tendence k fázovému zpoždování rytmu, které souvisí s delší cirkadiánní periodou. Naopak signifikantně delší cirkadiánní periodu exprese genu *Per2* v buněčných kulturách fibroblastů těchto pacientů popsala práce McCarthy et al. (M. J. McCarthy et al., 2013). V navazující studii autoři prokázali, že aplikace lithia k těmto buněčným kulturám vedla ke zkrácení cirkadiánní periody a k nárůstu amplitudy. Tento efekt byl však sledován pouze u pacientů, kteří pozitivně odpovídali na léčbu lithiem. Buněčné kultury fibroblastů pacientů Li-NR vykazovaly delší periodu a přidání lithia do média nemělo na cirkadiánní parametry žádný významný vliv (Michael J. McCarthy et al., 2019) (obr. 11). Tato studie, na rozdíl od předchozích experimentů *in vitro*, používala koncentrace lithia, které jsou podobné plazmatickým hladinám u pacientů. Ovšem experimentálně celá řada *in vitro* studií publikuje výsledky pracující s až 100krát vyššími koncentracemi.



**Obr. 11 Rytmičká exprese genu *Per2* v transdukované kultuře *Per2:luc* fibroblastů u pacientů s BAP LiR a Li-NR v několikadenním časovém profilu. A) Délka periody u Li-R (modře) a Li-NR (červeně) B) Efekt lithia na amplitudu oscilace genu *Per2* ve fibroblastech Li-R pacientů. Převzato z (Michael J. McCarthy et al., 2019).**

Komplexní mechanismus účinku lithia není zcela znám, ovšem jedním z popsaných efektů je jeho interakce s GSK3 $\beta$  kinázou, která hraje roli i v regulaci molekulárních hodin. Lithium působí jako inhibitor GSK3 $\beta$  kinázy, kde se váže do vazebného místa pro hořčík. Inhibicí GSK3 $\beta$  způsobenou lithiem nedochází ke stabilizující fosforylaci REV-ERB $\alpha$ , což vede k okamžité proteozomální degradaci REV-ERB $\alpha$ , která může mít za následek zkrácení cirkadiánní periody (Yin, Wang, Klein, & Lazar, 2006). Podobný efekt inhibované GSK3 $\beta$  lithiem je popsán pro PER2. Inhibice fosforylační aktivity GSK3 $\beta$  vedla ke zpožděné translokaci PER2 do jádra, což způsobilo fázové zpoždění jeho exprese (Iitaka, Miyazaki, Akaike, & Ishida, 2005b). Změny fosforylace a jiných posttranslačních úprav proteinových produktů hodinových genů jsou důležité právě v dynamice molekulárního mechanismu a jsou zásadní komponentou dobře fungujících molekulárních hodin.

#### 1.4.4.2. Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI)

Léčba pomocí antidepresiv SSRI vede k nárůstu extracelulárních hladin serotoninu, což má za následek zvýšení serotonergní signalizace neuronů. Užívání antidepresiv SSRI vede kromě redukování depresivních symptomů pacienta i ke stabilizaci jeho cirkadiánních rytmů.

Serotonergní signalizace hraje v CS významnou roli především při nesvětelné synchronizaci. Do SCN vedou přímé vstupní dráhy ze serotonergních rapheálních jader a v SCN byla identifikována řada serotonergních receptorů (Moore & Speh, 2004). U experimentálních hlodavců bylo prokázáno, že aplikace serotonergních agonistů vyvolává výrazné fázové předběhnutí v pohybové aktivitě a naopak vybuzení zvířete vzrušivými

podněty (např. umístěním běhacího kolečka nebo manipulací se zvířetem), které je považováno za nesvětelný synchronizační podnět, kombinované s podáním antagonisty vedlo ke snížení behaviorálně indukovaného fázového předběhnutí (D. M. Edgar, Dean, Dement, Miller, & Prosser, 1993; Sumova et al., 1996).

Experimenty testující fluoxetin, jednu z účinných látek typu SSRI, prokázaly jeho vliv na cirkadiánní rytmy. Aplikace fluoxetinu do organotypických kultur SCN vedla k fázovému předběhnutí rytmu neuronální aktivity i k fázovému předběhnutí elektrické aktivity (Sprouse, Braselton, & Reynolds, 2006). Kromě fluoxetinu byly na tkáňových kulturách fibroblastů testovány i další zástupci SSRI (sertralin, fluvoxamin, citalopram, paroxetin) a jejich aplikace vedla také ke zkrácení vnitřní cirkadiánní periody molekulárních hodin (Nomura, Castanon-Cervantes, Davidson, & Fukuhara, 2008). Stejně tak systémové podání fluoxetinu potkanům vedlo k fázovému předběhnutí jejich pohybové aktivity a zároveň vedlo ke zvýšené citlivosti zvířete na světelnou synchronizaci (Cuesta, Mendoza, Clesse, Pévet, & Challet, 2008). Zvýšená citlivost na světelnou synchronizaci po podání SSRI (citalopram) byla sledována i v humánní studii McGlashan et al. (2018). Dá se tedy předpokládat, že by se SSRI mohly účastnit resynchronizace zpožděné vnitřní fáze hodin pacientů s UD světelnými i nesvětelnými podněty.

Mechanismus účinku SSRI na hodinový mechanismus není dosud zcela objasněn, ovšem částečně by ho mohla objasnit teorie neuronální plasticity vyvolané SSRI. Řada animálních i humánních studií prokázala, že dlouhodobé užívání SSRI způsobilo nárůst BDNF (z angl. brain-derived neurotrophic factor). BDNF se váže na receptory TrkB a aktivuje tak signální kaskádu stimulující neuronální růst a neuronální plasticitu (Duman & Voleti, 2012). Receptory TrkB se nacházejí i v SCN a jsou zapojené do světelné synchronizace hodin (Allen, Qu, & Earnest, 2005; Liang, Allen, & Earnest, 2000). Je tak možné, že mechanismus účinku SSRI na cirkadiánní hodiny bude souviset se signalizací BDNF-TrkB.

#### **1.4.4.3. Agomelatin**

Agomelatin byl schválen v roce 2009 jako nové léčivo pro pacienty s UD. Látka je syntetickým analogem melatoninu a působí jako agonista obou melatoninových receptorů (MT1/MT2) a současně i jako agonista 5HT<sub>2C</sub>. Animální experimenty prokázaly jeho přímý vliv na SCN, a to jak prostřednictvím jeho vazby k 5HT<sub>2C</sub>, tak k MT1/MT2 receptorům (J. Yang et al., 2016). Ukazuje se, že má resynchronizační efekt na rytmus tělesné teploty, na rytmus kortizolu a na některé další hormony. A ve srovnání s jinými antidepresivními léky nenarušuje spánkovou architekturu (Leproult, Van Onderbergen, L'Hermite-Balériaux, Van Cauter, & Copinschi, 2005).

Jeho antidepresivní účinek je ovšem výrazně slabší než účinek běžně užívaných antidepresiv. Zdá se tedy, že hlavní efekt tkví spíše ve zlepšení kvality narušeného spánku depresivních pacientů (Gahr, 2014).

#### 1.4.4.4. Ketamin

V posledních letech je jako lék na rezistentní depresi využíván i ketamin. Zlepšení nálady vykazovali pacienti už po 40 minutách od podání ketaminu, ovšem délka antidepresivního účinku u většiny pacientů nepřesáhla 1–2 týdny (Berman *et al.*, 2000). Podobně jako u SSRI či lithia, i u ketaminu se očekává farmakologická interakce s cirkadiánním systémem pacienta. Podání ketaminu u pacientů responzivních na ketamin vedlo k nárůstu amplitudy rytmu jejich pohybové aktivity a jeho fázovému předběhnutí ve srovnání s rytmicitou měřenou před léčbou (Wallace C Duncan *et al.*, 2017). Mechanismus tohoto rychlého, avšak přechodného antidepresivního účinku ketaminu není dosud zcela objasněn. Ketamin je farmakologicky definován jako nekompetitivní antagonist NMDA glutamátových receptorů, který se váže do fencyklidinového vazebného místa a blokuje tak funkci NMDA receptorů. Světelná synchronizace SCN je závislá na glutamatergní signalizaci z RHT. Účinek ketaminu tedy logicky snižuje odpověď hodin na světelný stimul, a snižuje tak i glutamátem aktivovaný nárůst hladin mRNA hodinových genů *Per1* a *Per2* (Abe *et al.*, 1992, Paul *et al.*, 2003). V neuronálních buněčných kulturách (NG108-15) bylo prokázáno, že ketamin inhibuje cirkadiánní remodelaci chromatinu v oblasti sekvence E-box, nacházející se v promotorech řady hodinových genů, a tím snižuje schopnost vazby aktivačního komplexu CLOCK/BMAL1 (Bellet, Vawter, Bunney, Bunney, & Sassone-Corsi, 2011). Ketamin tak může modulovat expresi hodinových genů indukovanou jak heterodimerem CLOCK-BMAL1, tak světlem, respektive glutamátem uvolněným z RHT. Zdá se, že v mechanismu účinku ketaminu na cirkadiánní systém je zapojena i GSK3 $\beta$ . Specifickým zablokováním její aktivity dojde ke snížení účinku ketaminu na expresi hodinových genů (Bellet *et al.*, 2011; Beurel, Song, & Jope, 2011). Interakce ketaminu s molekulárním hodinovým mechanismem v podmínkách *in vitro* i *in vivo* ukazuje na jeho potenciál v regulaci CS. Správné načasování jeho podání by mohlo napomoci resynchronizaci narušeného CS u depresivních pacientů. Je možné, že harmonizace CS by mohla prodloužit dobu jeho působení v organismu a zesílit jeho antidepresivní účinek.

#### 1.4.4.5. Nefarmakologické přístupy

Na provázanost afektivních poruch a cirkadiánního systému poukazují nefarmakoterapeutické postupy vedoucí ke stabilizaci pacientů. Kromě farmakologické léčby je pacientům doporučována stabilizace denních rytmů posilující cirkadiánní oscilace jak na principu světelné, tak i nesvětelné synchronizace. Na principech světelné



synchronizace staví tzv. fototerapie, která využívá synchronizační účinky světla o vysoké intenzitě (2 000–3 000 luxů). Tento přístup se aplikuje spíše na unipolární či sezónní deprese. U pacientů s BAP s manickými fázemi může vést ke spouštění manické epizody (Colombo, Benedetti, Barbini, Campori, & Smeraldi, 1999). Pravidelná expozice světlu ve vhodnou denní dobu udržuje vnitřní rytmy stabilní a synchronizované s vnějšími podmínkami. Některé studie spekulují o změně citlivosti cirkadiálního systému pacientů s BAP na světlenou synchronizaci, či o vyšší míře suprese melatoninu vyvolané expozicí světlu, ale výsledky dosavadních prací nejsou v tomto ohledu zcela jednoznačné (Nurnberger Jr et al., 2000; Terman & Terman, 1999).

K udržení vnitřní synchronizace systému přispívají i nesvětelné synchronizační podněty, jako je pravidelný příjem potravy, pravidelná pohybová aktivita a stabilní sociální interakce. Mechanismy nesvětelné synchronizace cirkadiálního systému založené právě na stabilizaci cirkadiálních rytmů pomocí nesvětelných synchronizačních podnětů využívá tzv. „social rhythm therapy“ (Frank, Swartz, & Kupfer, 2000). Tento přístup cílí zejména na ty pacienty s BAP, u kterých bylo zjištěno, že narušení pravidelného rytmu spánku a bdění nebo složitější společenská událost fungují jako hlavní spouštěcí signály, a to především manické fáze onemocnění (Wehr, 2018).

#### **1.4.5. Vybraná neurodegenerativní onemocnění spojená s poruchou cirkadiálního systému**

##### **1.4.5.1. Alzheimerova nemoc**

Alzheimerova nemoc (AN) patří mezi nejčastěji se vyskytující neurodegenerativní onemocnění. Prevalence jejího výskytu po 65. roce dosahuje zhruba 1 % a každých pět let se zdvojnásobuje. U AN dochází ke zvýšené extracelulární agregaci  $\beta$ -amyloidu a ke zvyšování intracelulárních inkluzí hyperfosforylovaného proteinu tau. Postižené neurony vytvářejí dystrofické dendrity a později axony, které vedou k zániku synapsí i celých neuronů.

Neurodegenerativní procesy jsou u stárnoucího organismu běžný jev, ovšem u pacientů s AN jsou tyto projevy výraznější, stejně jako další příznaky, které s nimi souvisí. S věkem dochází ke změnám řady spánkových parametrů, jako je fragmentace cirkadiálního rytmu spánku a bdění, častější denní spavost a delší spánková latence. U pacientů s AN se tyto změny projevují ve významně větší míře než u stejně starých zdravých subjektů (Hatfield, Herbert, Van Someren, Hodges, & Hastings, 2004; La Morgia et al., 2016; Liguori et al., 2014; Wang et al., 2015). Tyto příznaky se objevují i u velmi raných stádií onemocnění (Musiek et al., 2018). Narušení rytmu spánku a bdění by tak

mohlo sloužit jako časný ukazatel rizika rozvinutí AN v pozdějším věku (Tranah et al., 2011).

K neurodegenerativním změnám dochází i v SCN. Bylo prokázáno, že dochází k úbytku VIP neuronů v SCN, který koreluje i s poklesem amplitudy pohybové aktivity (Wang et al., 2015). Úbytek AVP a GABAergních subtypů neuronů tvořících SCN u pacientů s AN byl popsán i ve starších studiích (Swaab, Fliers, & Partiman, 1985; Zhou, Hofman, & Swaab, 1995).

U pacientů s AN byla v SCN identifikována i přítomnost amyloidních plaků (Stopa et al., 1999). Výskyt amyloidních plaků byl prokázán i v oblasti retinálních gangliových buněk, které jsou zodpovědné za světelnou synchronizaci SCN. U pacientů byl popsán úbytek těchto buněk a nižší stupeň jejich axonálního větvení. Poškozené iRGCs tak mohou ovlivňovat přenos synchronizačního světelného signálu do SCN, a narušovat tak funkci cirkadiálního systému (La Morgia et al., 2016).

S věkem také dochází k výraznému poklesu tvorby melatoninu i snížení amplitudy jeho rytmu. U pacientů s AN se projevují už v mladším věku a tyto změny jsou výraznější než u zdravých subjektů (Skene & Swaab, 2003). Nižší hladiny melatoninu byly sledovány už v raných fázích onemocnění ještě před tím, než se projevil kognitivní deficit (Zhou, Liu, Kamphorst, Hofman, & Swaab, 2003). Jakým mechanismem přesně dochází k těmto změnám, není zcela jasné. Bylo popsáno, že s věkem dochází ke kalcifikaci epifýzy, která může ovlivňovat snižující se produkci melatoninu (Gusek, 1983). Současně tento mechanismus může souviset s neurodegenerací jak na úrovni SCN, tak i na úrovni výstupních drah propojujících epifýzu a SCN.

Celkový úbytek melatoninu může současně i potencovat tvorbu amyloidních fibril a souviset tak s rychlejší progresí onemocnění. Experimenty *in vitro* prokázaly, že aplikace melatoninu vede k inhibici tvorby amyloidních fibril a hyperfosforylovaného tau proteinu (Alvarez et al., 1998; Shi et al., 2018). U animálního transgenního modelu AN vedlo preventivní podávání melatoninu u starých zvířat ke snížení počtu amyloidních plaků ve srovnání s kontrolními mladšími zvířaty (Matsubara et al., 2003).

Dalším výrazným patofyziologickým projevem AN je rozsáhlá atrofie mozku, a to především v oblasti hipokampu. Animální experimenty ukazují, že hipokampus i další mozkové struktury mají vlastní hodiny, jejichž rytmické oscilace jsou seřizovány neurohumorálními signály z SCN (Chaudhury, Wang, & Colwell, 2005). Oslabení rytmu generovaného SCN může vést k oslabení mezioscilačové synchronizace funkčně podřízených hodin v dalších strukturách. Ukázalo se, že časté přelety více časových pásem bez dostatečného času na synchronizaci organismu s novým časovým pásmem, např. u posádek letadel, můžou vést ke zvýšenému úbytku mozkové hmoty v hipokampální oblasti

(Cho, 2001). Desynchronizované rytmy mezi jednotlivými mozgovými strukturami v genové expresi hodinových genů byly popsány i v post mortem studii porovnávající AN se zdravými jedinci (Cermakian, Lamont, Boudreau, & Boivin, 2011).

V rozsáhlé populační studii se prokázalo, že nositelé SNP v hodinovém genu *Clock* (rs 4580704 C/G) s cytosinem v této pozici vykazují zvýšenou prevalenci AN (Chen, Huang, You, Wang, & Si-qing, 2013).

#### 1.4.5.2. Parkinsonova nemoc

Parkinsonova nemoc (PN) je po AN druhé nejrozšířenější neurodegenerativní onemocnění. Projevuje se jednak motorickými příznaky, mezi které patří rigidita, bradykineze, třes a zhoršená schopnost udržet rovnováhu. Typické jsou pro ni ale i nemotorické projevy, kam patří spánkové obtíže, kognitivní deficit nebo deprese. Hlavním patofyziologickým rysem tohoto onemocnění je úbytek dopaminergních neuronů především v substantia nigra pars compacta a tvorba Lewyho tělísek, tvořených  $\alpha$ -synukleinovými inkluzemi.

Narušený cirkadiánní rytmus spánku a pohybové aktivity či narušený spánek hraje významnou roli v diagnostice i v progresi onemocnění (Gros & Videnovic, 2020). Byla zjištěna vyšší míra spánkových obtíží, vyšší fragmentace spánku, snížená amplituda cirkadiánního rytmu pohybové aktivity a vyšší míra denního pospávání. U 30–90 % byla diagnostikována i porucha chování v REM (RBD) spánku (Galbiati, Verga, Giora, Zucconi, & Ferini-Strambi, 2019). Tyto příznaky už byly pozorovány i v raných stádiích onemocnění (Breen et al., 2014). Rozvoj onemocnění zároveň vede ke zhoršující se pohyblivosti pacienta, a tím i k úbytku synchronizačních signálů cirkadiánních hodin.

Recentní studie prokázaly, že u pacientů v počáteční fázi PN bez dopaminergní léčby došlo ke snížení produkce melatoninu, snížení amplitudy exprese hodinového genu *Bmall* a k nárůstu hladiny kortizolu (Breen et al., 2014). Dopaminergní léčba naopak vedla u pacientů ke zvýšené produkci melatoninu a zároveň docházelo k fázovému předběhnutí tvorby melatoninu oproti běžnému nástupu spánku (Bolitho et al., 2014).

Dopamin hraje v cirkadiánním systému významnou roli. Zprv je syntéza dopaminu cirkadiánním systémem regulovaná. Genová exprese tyrosin hydroxylázy, dopaminového transportéru a dopaminového receptoru 1 jsou hodinami přímo regulované. Geny těchto proteinů mají ve své promotorové oblasti sekvenci E-box, která je aktivována jedním z hlavních hodinových genů, genem *Clock* (Imbesi et al., 2009; Kawarai, Kawakami, Yamamura, & Nakamura, 1997; McClung et al., 2005). Zadruhé je dopaminem modulována sama funkce molekulárního hodinového mechanismu. Aktivace receptoru D2 v dorzálním striatu inhibuje expresi genu *Per2*, na druhou stranu aktivace receptoru D1 posiluje expresi *Per1*, *Npas* a *Bmall* (Kawarai et al., 1997). Dopamin je produkován i

buňkami retiny, která funguje také jako periferní oscilátor (Cameron et al., 2009; Tosini & Menaker, 1996). V experimentu *in vitro* bylo prokázáno, že dopamin v retině vede k fázovým posunům oscilací hodinového genu *Per2* (Ruan, Allen, Yamazaki, & McMahon, 2008). Dále dopamin posiluje expresi melanopsinu ve ipRGC zodpovědných za světelnou synchronizaci SCN (Van Hook, Wong, & Berson, 2012). S výskytem PN je asociován i výskyt specifických SNP v klíčových hodinových genech *Bmal1* a *Per1* (Gu et al., 2015).

#### **1.4.5.3. Porucha chování v REM spánku**

Ukazuje se, že diagnóze PN až v 95 % sledovaných případů předchází výskyt idiopatické formy RBD (Galbiati et al., 2019). U RBD dochází k poruchám svalové atonie během REM fáze spánku, jejímž výsledkem jsou prudké pohyby, kopání, vokalizace a výrazné emotivní sny. První incidence RBD jsou mezi 40.–70. rokem života (Šonka, 2014). Příčina ani mechanismus vzniku RBD nejsou dosud známé. Současné hypotézy naznačují, že důležitou roli zde budou hrát inhibiční neurotransmitery GABA a glycin. Transgenní myši s mutací v podjednotce glycinového receptoru, která také vede ke zhoršené inhibiční funkci receptoru GABA<sub>A</sub>, vykazovaly příznaky shodné s příznaky doprovázejícími RBD (Brooks & Peever, 2011). Lékem první volby u pacientů s RBD je nejčastěji klonazepam, který dokáže efektivně tlumit projevy onemocnění. Jeho užívání bývá ovšem často doprovázeno řadou vedlejších účinků (Anderson & Shneerson, 2009; McCarter et al., 2013). Alternativním léčivem je podávání melatoninu. Melatoninová léčba vykazuje velmi slibné výsledky a nese s sebou téměř žádné vedlejší účinky. Mechanismus tohoto účinku není zatím znám (McGrane, Leung, St. Louis, & Boeve, 2015).

## **2. CÍLE PRÁCE**

V dizertační práci jsem se soustředila na 4 hlavní témata:

### **1. Identifikace časných změn cirkadiálních rytmů v raných fázích neurodegenerativních onemocnění**

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.

První studie byla zaměřená na pacienty s lehkou formou AN, kteří nevyžadovali hospitalizaci a žili v domácím prostředí pouze se svým životním partnerem.

Druhá studie byla zaměřená na pacienty, u kterých byla ve spánkové laboratoři diagnostikována idiopatická RBD.

## **2. Synchronizace cirkadiálního systému člověka v podmínkách stálého světla**

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**

Cílem tohoto projektu bylo otestovat možnost využití transformovaných lymfocytů v cirkadiálním experimentu. Cirkadiální experimenty jsou pro účastníka náročné a vyžadují minimálně 24hodinovou spolupráci. BAP je významně dědičná a je doprovázena cirkadiálními deregulacemi. Ke stabilizaci projevů onemocnění se často používá lithium, jehož mechanismus účinku není přesně znám. Určitá skupina pacientů na tuto léčbu ovšem neodpovídá. Využívání navrhovaného modelu by umožnilo přenesení genetické informace subjektu do experimentu *in vitro* s cílem sledovat oscilace hodinových genů subjektu a interakce molekulárního hodinového mechanismu s lithiem přidávaným do buněčného média.

## **4. Cirkadiální oscilace transkriptomu v předním cingulu pacientů s unipolární depresí**

V této práci jsme sledovali cirkadiální rytmy celého transkriptomu ve vzorku předního cingula (BA24), odebraného post mortem od pacientů s UD, a porovnávali ho s transkriptomem zdravých subjektů. Jako časový bod sloužící k určení denní fáze transkriptomu byla vždy použita doba úmrtí subjektu. 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. Metodika**

### **3.1. Experimenty *in vivo* a metodika**

#### **3.1.1. Studie cirkadiálního systému v rané fázi Alzheimerovy nemoci**

Cirkadiální rytmy jsme sledovali u pacientů s AN a jejich partnerů, kteří byli vystaveni stejným vlivům prostředí jako pacienti, a mohli tak sloužit jako ideální kontrola. U obou

párů subjektů jsme vždy sledovali 24h profil melatoninu ve slině, expresi hodinových genů v bukálních stěrech a pohybovou aktivitu pomocí náramkových aktigrafů.

#### **3.1.1.1. Účastníci studie 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). Kontrolní a experimentální skupina byla věkově porovnatelná, průměrný věk kontrol byl  $78,1 \pm 2$  roky a pacientů s AN  $78,9 \pm 1,9$  let. Obě skupiny dosáhly srovnatelného vzdělání, kontrolní skupina absolvovala  $14,5 \pm 2$  roky studia a AN skupina  $14 \pm 3$  roky studia. Mezi vylučovací kritéria studie patřilo cestování napříč časovými pásmy během jednoho měsíce před vstupem do studie, práce ve směnném provozu nebo noční směny méně než měsíc před účastí ve studii. Kritériem pro zařazení byla ochota životních partnerů spolupracovat na studii.

Pacienti byli rekrutováni z Poradny pro poruchy paměti AD Centra Karlovy univerzity, vedeného profesorem MUDr. Bartošem, kde byli také diagnostikováni. Všichni účastníci byli vyšetřeni pomocí MMSE (Mini Mental State Examination). Pacienti s AN v tomto testu vykazovali výrazně zhoršené výsledky v porovnání s kontrolami ( $21 \pm 3$ ;  $29 \pm 1$ ). Všichni pacienti po dobu experimentu užívali memantin (inhibitor acetylcholinesterázy). Pacienti ani kontrolní subjekty neužívali po dobu experimentu žádné léky ovlivňující spánek. Kontroly byly bez další medikace a netrpěly žádnými závažnými spánkovými problémy.

Pacienti žili ve stejné domácnosti se svým kontrolním subjektem, byli tudíž vystavováni stejným světelným i nesvětelným synchronizačním podmínkám.

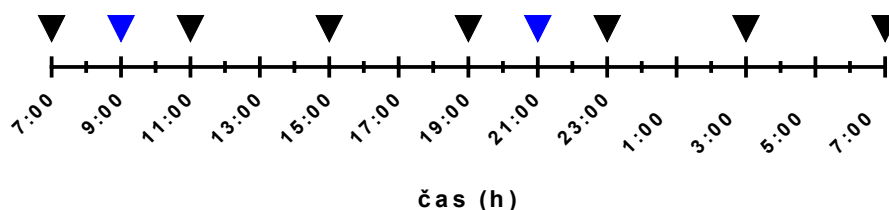
#### **3.1.1.2. Odběr vzorků slin a bukálních stěrů**

Tato studie měla za cíl sledovat cirkadiánní rytmy subjektů v přirozených podmínkách jejich domácího prostředí. Před začátkem celé studie byli účastníci instruováni, jak vzorky samostatně odebírat a jak je následně skladovat. Během instruktážní schůzky byl zvláště kladen důraz na noční odběry, kdy je nutné vyhnout se jakékoliv světelné expozici. Pacienti byli také požádáni, aby po dobu experimentu dodržovali svůj běžný denní režim. Celá studie proběhla na přelomu dubna a května. V den odběrů bylo subjektům zakázáno pít alkohol, kofeinové nápoje, žvýkat žvýkačku, čistit si zuby a jíst banány. Hodinu před odběrem pacientovi nebylo dovoleno nic jíst ani pít.

Vzorky slin a bukálních stěrů byly odbírány každé 2–4 h od prvního odběru v 7:00 až do následujícího dne stejného času (obr. 12). Vzorky slin byly odebírány přímo do odběrových zkumavek a následně uchovány v  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ihned po odběru slin následoval odběr vzorků bukální sliznice. K odběru byl použit cytologický kartáček, kterým byla lehce

setřena vrchní vrstva buněk bukální sliznice zvláště z pravé a zvláště z levé vnitřní strany tváře.

Studie byla v souladu s Helsinskou deklarací a protokol studie byl schválen etickou komisí Univerzitní nemocnice Královské Vinohrady 3. lékařské fakulty v Praze.



**Obr. 12** Časový profil odběru bukálních stěrů a slin. Černé šipky znázorňují odběrové časy bukálních stěrů a slin (4hodinový interval) a modré šipky znázorňují časové body, kdy byly odebrány pouze sliny.

### 3.1.2. Studie cirkadiánního systému pacientů s poruchou chování v REM fázi spánku

Cirkadiánní rytmy byly u pacientů s RBD sledovány v kontrolovaných podmínkách spánkové laboratoře a srovnávané s věkově i genderově shodnými kontrolními subjekty.

U subjektů byly sledovány hladiny melatoninu v krevní plazmě a exprese hodinových genů v periferních mononukleárních krevních buňkách po dobu 24 hodin.

#### 3.1.2.1. Účastníci studie 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). Všechny osoby podstoupily neurologická, kognitivní a polysomnografická vyšetření, prováděná ve spánkové laboratoři Národního ústavu duševního zdraví. Ze studie byly vyřazeny veškeré subjekty vykazující symptomy parkinsonismu nebo jiné neurodegenerativní poruchy. Žádný z účastníků neužíval melatonin, klonazepam ani jiné psychoaktivní léky. Diagnostiku prováděla spánková lékařka MUDr. J. Bušková. Studie byla schválena etickou komisí NUDZ.

#### 3.1.2.2. Protokol studie

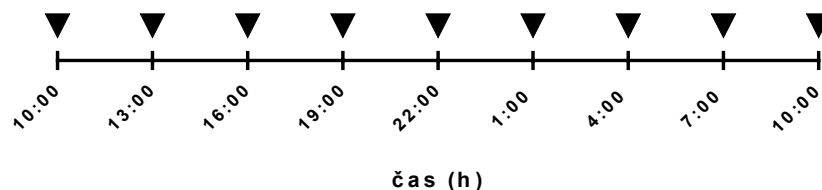
Experiment byl prováděn v kontrolovaných podmínkách spánkové laboratoře NUDZ podle protokolu tzv. semikonstantní rutiny. Dvě hodiny před odběrem prvního vzorku byl subjekt ubytován ve spánkovém pokoji, kde mu byla do předloktí zavedena odběrová kanyla. Každé tři hodiny byl odebírán vzorek krve (11 ml). Po dobu experimentu subjekt neopouštěl prostory spánkového pokoje, ve kterém byly kontrolované světelné podmínky.

Po celou dobu experimentu, tj. od 8 h do 22 h, byl subjekt v pokoji se světelnou intenzitou přibližně 200 luxů. Po 22. hodině byl pokoj zcela zatemněn. V průběhu dne neměl subjekt povoleno pospávat, konzumovat kofeinové či jiné povzbuzovací nápoje. Veškerá strava byla poskytována z jídelny NUDZ.

Noční odběry prováděl zdravotnický personál pouze s použitím červeného světla, aby při odběru nedošlo k nežádoucímu osvětlení subjektu, který by narušil přirozenou noční tvorbu melatoninu. Spánek subjektu tak byl nočními odběry rušený jen minimálně. Krevní vzorky byly odebírány 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 (obr. 13). Krev byla okamžitě po odběru zpracována následujícími postupy.

Přibližně 4 ml odebraného vzorku sloužily ke stanovení hladiny melatoninu měřeného v krevní plazmě. Odebraný vzorek byl ihned po odběru stočen při 1 500 g. Oddělená horní vrstva krevní plazmy byla odebrána a uchována ve zkumavkách obalených vrstvou alobalu, který fotolabilní melatonin chrání před předčasnou degradací. Takto ošetřené vzorky byly následně zamrazeny při  $-20^{\circ}\text{C}$  a do 1 měsíce od odběru zpracovány.

Z druhé části krevního vzorku byly izolovány periferní mononukleární krevní buňky, ve kterých byla stanovena exprese hodinových genů.



**Obr. 13** Časový profil odběru krevních vzorků. Černé šipky označují odběr krve ve 3hodinovém časovém intervalu.

### 3.1.3. 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, kde v letních měsících panuje polární den.

#### 3.1.3.1. Účastníci studie a protokol studie

Účastníci studie byli vybráni z řad českých výzkumníků navštěvujících tuto lokalitu za účelem vlastních arktických výzkumných projektů. Byla vybrána skupina 10 výzkumníků (5 žen a 5 mužů). Věkový průměr skupiny byl  $34,6 \pm 8,5$  let. Vylučovacími kritérii pro



zařazení do studie byly 1) přelet více než 4 časových pásem v měsíci uplynulém před zahájením studie, 2) práce ve směnném provozu a 3) užívání léků ovlivňujících spánek.

Před začátkem studie byli všichni účastníci seznámeni s výzkumnými záměry studie a podrobně informováni o jejím průběhu. Každý účastník obdržel vlastní odběrovou sadu zkumavek sloužící k odběru vzorků a instrukce o jejich uchovávání. Součástí setu na jeden odběr bylo devět černých 5ml odběrových zkumavek na sliny; každá zkumavka byla označena číslem odpovídajícím hodině, kdy měl být odběr uskutečněn. Dále set obsahoval 14 ks zkumavek (1,5 ml) s RNA stabilizačním roztokem a 14 ks cytologických kartáčků, sloužících k odběru bukálních stěrů. Každý subjekt také obdržel náramkový aktigraf. Všichni zúčastnění museli souhlasit s účastí v obou částech studie a zavázali se dodržovat veškeré instrukce související především s odběry a manipulací se vzorky v průběhu samostatných odběrů. Účastníci studie podepsali informovaný souhlas. Tento dokument byl v souladu s Helsinskou deklarací a byl schválen Etickou komisí 3. lékařské fakulty Karlovy univerzity.

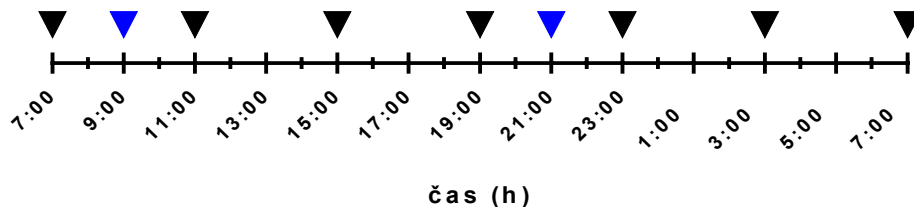
### **3.1.3.2. Protokol studie a odběr vzorků**

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.

### **3.1.3.3. Odběr vzorků v České republice**

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 bukálních 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. U odběrů vzorků slin byly přidány dva časové body v 9 h a ve 21 h z důvodu získání přesnějších informací o nárůstu a poklesu melatoninu (obr. 14).

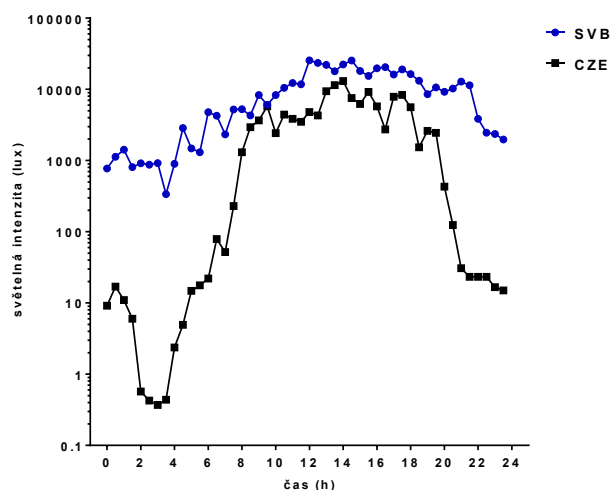
Vzorky slin byly hned po odběru přemístěny do  $-20^{\circ}\text{C}$  a zpracovány do měsíce od odběru. Bukální stěry byly prováděny zvlášť z levé a pravé strany tváře. K odběrům byl použit vždy čistý cytologický kartáček. Vzorek bukální sliznice byl uchován ve zkumavkách obsahujících RNA stabilizační roztok (RNAlater, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) a uložen do  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**Obr. 14** Časový profil odběru bukálních stěrů a slin v České republice a na Svalbardu. Černé šipky znázorňují odběrové časy bukálních stěrů a slin (4hodinový interval) a modré šipky znázorňují časové body, kdy byly odebrány pouze sliny.

### 3.1.3.4. Odběr vzorků na Svalbardu

Expedice probíhala v české polární terénní stanici Nostoc, která se nachází ve fjordu Billefjorden v zátocě Petuniabukta. Od 7. května do 24. září je v této oblasti polární den. Světelná intenzita je po dobu polárního dne konstantní a závisí především na oblačnosti. Nicméně světelné senzory náramků Actiwatch ve světelné intenzitě odhalily denní variace. Nižší noční intenzita byla pravděpodobně způsobena tím, že účastníci studie spali v kontejnerech s malými okny, což částečně omezovalo vstup světla, a současně tím, že náramkové aktigrafy většinou zůstávaly na ruce pod příkrývkou. I tak byla noční světelná intenzita až 100krát vyšší než v České republice (obr. 15). Třináctý den expedice proběhl odběr vzorků stejným způsobem jako odběry v České republice. Získané vzorky byly následně převezeny do České republiky, kde byly zpracovány.



**Obr. 15** Světelné podmínky v České republice a na Svalbardu měřené pomocí aktigrafů. Průměrná světelná intenzita během 24 h v České republice (černá spojnice) a na Svalbardu (modrá spojnice). Světelná intenzita je vynesena v logaritmickém měřítku.

### **3.1.4. Aktigrafický záznam pohybové aktivity, spánkových parametrů a světelné intenzity**

K měření pohybové aktivity byly použity dva typy náramkových aktigrafů od firmy Cambridge Neurotechnology Ltd, UK. Původní starší model Actiwatch AWD 4 byl použit ve studii s pacienty s AN. Ve studii sledující vliv konstantního světla na Svalbardu byl použit nový model MotionWatch 8. Softwary obou přístrojů umožňovaly analýzu celkové aktivity, analýzu některých spánkových parametrů, analýzu denního prospávání a záznam světelné intenzity.

Všichni účastníci nosili aktigrafický přístroj na nedominantní ruce a byli instruováni, aby přístroj sundávali pouze při saunování. Přístroj nahrával pohyb a světelnou intenzitu každých 30 s. Aktivita byla následně vyjádřena jako průměr z 30minutových intervalů.

Spánková analýza byla provedena v softwaru od firmy Cambridge Neurotechnology (MotionWare / Actiwatch aktivity & Sleep analysis software). Spánková analýza byla zaměřena na tyto spánkové parametry: celková délka spánku, čas probuzení a čas usnutí. U subjektu s AN a jejich kontrol jsme pomocí softwaru prováděli i analýzu tzv. denního zdřímnutí, sledující počet denních spánkových epizod. Ke zpřesnění aktigrafických záznamů sloužily současně i spánkové deníky, které si účastníci studie vedli po celou dobu experimentu. Spánkové deníky sloužily především k odlišení periody, kdy se subjekt nepohyboval, od spánkové periody.

### **3.1.5. Radioimunologické stanovení melatoninu ve slině a v krevní plazmě**

Hladina melatoninu v krevní plazmě byla stanovena pomocí radioimunologického 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.

### **3.1.6. Separace periferních mononukleárních krevních buněk z celé krve**

Odebraná krev (7 ml) byla naředěna 3 ml PBS. Naředěná krev byla opatrně navrstvena na histopaque 1077 medium (Sigma-Aldrich, St. Luis, MI, USA) a následně stočena po 30 min na 250 g. Ve střední části se oddělila vrstva periferních mononukleárních krevních buněk (PBMCs), které byly poté několikrát promyty ve fyziologickém roztoku, lyzovány v 700  $\mu$ l RNA izolačního roztoku (TRI Reagent; Zymo Research Corporation, CA, USA) a nakonec zamraženy při  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.1.7. Izolace RNA z bukálních stěrů a z periferních mononukleárních krevních buněk**

K izolaci RNA ze vzorku byl v každém experimentu použit jiný izolační kit, který byl vybírán podle očekávaného výtěžku RNA. Při izolaci bylo postupováno podle výrobcem standardizovaného protokolu.

Na izolaci RNA ze vzorků z bukálních stěrů od pacientů s AN a jejich kontrol byl použit izolační kit Dynabeads mRNA Direct Micro Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Na izolaci RNA ze vzorků z bukálních stěrů od subjektů na Svalbardu a v České republice byl použit izolační kit Direct-zol RNA MikroPrep kit (Zymo Research Corporation).

Na izolaci RNA ze vzorků z PBMCs od pacientů s RBD a jejich kontrol byl použit izolační kit Direct-zol RNA MiniPrep Plus kit (Zymo Research Corporation).

### **3.1.8. Reverzní transkripce**

K reverzní transkripci byly použity dva různé kity. Při reverzní transkripci bylo postupováno podle standardizovaného protokolu výrobce.

K reverzní transkripci RNA získané z bukálních stěrů pacientů s AN a jejich kontrol i RNA z PBMC pacientů s RBD a jejich kontrol byl použit SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), využívající k přepisu náhodné RNA primery. Přepis z RNA na cDNA probíhal ve 20 $\mu$ l reakci v termocykleru: 10 min 25°C, 60 min 42°C, 5 min 85°C. Získaná cDNA byla následně zředěna v poměru 1:2 s RNA-free vodou.

K reverzní transkripci RNA získané z bukálních stěrů subjektů na Svalbardu a v České republice byl použit kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (LifeTechnologies, Applied biotechnologies). Přepis z RNA na cDNA probíhal ve 20 $\mu$ l reakci v termocykleru: 10 min 25°C, 120 min 42°C, 5 min 85°C. Získaná cDNA byla následně zředěna v poměru 1:2 s RNA-free vodou.

### **3.1.9. Kvantitativní PCR**

PCR reakce byly prováděny v 16  $\mu$ l. Každá reakční směs obsahovala 10,3  $\mu$ l PCR čisté vody, 3,1  $\mu$ l HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Estonia) a 0,6  $\mu$ l próby TaqMan Gene Expression Human FAM-MGB (Life Technologies, CA, USA). V této práci byly pro detekci exprese hodinových genů použity následující próby: Period 1 (PER1, NM 002616, kat. číslo: Hs01092603\_m1), aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (ARNTL. syn. BMAL1, NM 001178, kat. číslo: Hs00154147\_m1), nuclear receptor subfamily 1 group D member 1 (NR1D1, NM 021724, kat. číslo: Hs00253876\_m1), Period

circadian clock 2 (PER2, NM022817, kat. číslo: Hs00256143\_m1), Period circadian clock 3 (PER3, NM016831, kat. číslo: Hs00213466\_m1) a D-box binding PAR bZIP transcription factor (DBP, NM\_001352.4, kat. číslo: Hs00897004\_m1). V této práci byly jako endogenní kontrolní geny použity následující próby: Ribosomal protein large P0 (RPLP0, NM\_001002, kat. číslo: Hs99999902\_m1), beta glukuronidáza (GUSB, NM\_000181.1 kat. číslo: Hs99999908\_m1), beta-2-microglobulin (B2M NM\_004048, kat. číslo: Hs00187842\_m1) a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH NM\_002046, kat. číslo: Hs99999905\_m1).

Ve vzorcích z bukálních stěrů byly jako endogenní kontrolní geny zvoleny geny B2M a RPLP0.

Ve vzorcích PBMCs byl použit B2M a u lymfoblastoidních buněk byl použit GUSB. Tyto geny byly pomocí algoritmu NormFinder (<https://moma.dk/normfinder-software>) identifikovány jako geny s nejvyšší stabilitou v daném vzorku.

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).

### **3.1.10. Statistika**

#### **Aktivita:**

Aktivita byla vynesena jako průměrná hodnota  $\pm$  SEM v 30min intervalech ve 24h profilech z celého období měření. Profily aktivity 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.

#### **Melatonin:**

Vynesené hladiny melatoninu v čase znázorňují průměrnou hodnotu  $\pm$  SEM pro každou sledovanou skupinu. Denní profily jsou porovnávány dvoucestnou ANOVA pro opakované měření s Bonferroniho korekcí. Změny amplitudy a akrofáze byly srovnávány Studentovým t-testem.

#### **Rytmická exprese hodinových genů:**

Kosinorová analýza: Analýza genové exprese byla prováděna pomocí kosinorové analýzy. 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. Analýzy byly zpracovány v softwaru Prism 8 (GraphPad, La Jolla, USA).

Výsledky porovnávací rozdíly mezi skupinami jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM. Akrofáze a amplituda mezi skupinami je srovnána pomocí Studentova t-testu. Expresní profily mezi skupinami jsou porovnávány dvoucestnou ANOVA pro opakované měření s Bonferroniho korekcí. A změna v čase je porovnávána jednocestnou ANOVA pro každou skupinu jednotlivě.

## **3.2. Studie *in vitro* a metodika**

### **3.2.1. Oscilace hodinových genů před aplikací lithia a po ní v buněčné kultuře transformovaných lymfocytů získaných od Li-R a Li-NR BAP pacientů**

#### **3.2.1.1. Participanti a protokol studie**

Do studie byly vybrány vzorky lymfoblastoidních buněčných linií získané transformací B-lymfocytů z periferní krve virem Epstein-Barové, které byly odebrané od pacientů s diagnostikovanou BAP prvního nebo druhého typu na Psychiatrické klinice University of Dalhousie. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin podle tzv. Aldovy škály na pacienty Li-R a pacienty Li-NR. Skupina dále byla klasifikována podle cirkadiálních preferencí na večerní, ranní a nevyhraněný chronotyp.

Sbíрку 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. Všechny zařazené subjekty byly klasifikovány jako nevyhraněný chronotyp (Basic Language Morningness scale, BALM).

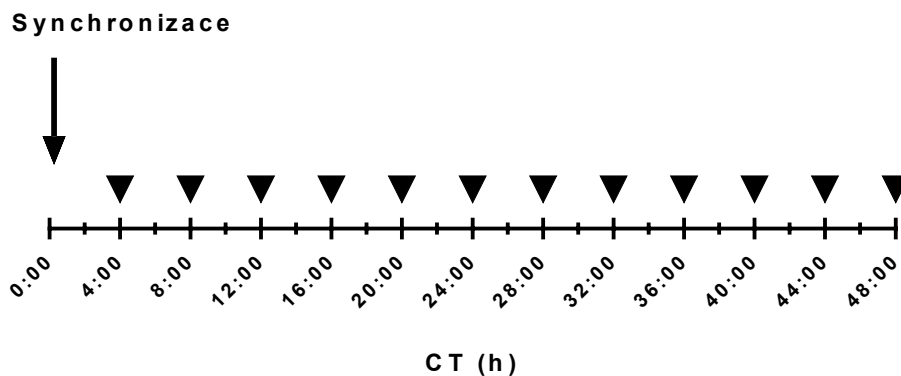
#### **3.2.1.2. Kultivace *in vitro***

Lymfoblastoidní buňky byly kultivovány v suspenzních buněčných kulturách. Jednotlivé buňky měly tendence vytvářet drobné shluky, volně se vznášející v buněčném mediu. Jako kultivační medium bylo použito Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco; Life Technologies) s 10% fetálním hovězím sérem a 1% antibiotikem Penicilin/Streptomycin.

#### **3.2.1.3. Experimentální design**

Buněčné kultury od jednotlivých subjektů byly rozpěstovány do dvanácti kultivačních lahví T25. V jednom časovém bodě byly všechny kultivační lahve synchronizovány pomocí sérového šoku. Sérový šok slouží jako synchronizační signál pro molekulární hodiny běžící v jednotlivých buňkách (Balsalobre, Damiola, & Schibler, 1998). Sérový šok

byl proveden výměnou růstového média za médium s 50% obsahem fetálního hovězího séra. Po 1 hodině byly buňky opět přemístěny do standardního růstového média. Doba synchronizace byla označena jako cirkadiánní čas 0 (CT0). Každé 4 hodiny od synchronizace byly jednotlivé kultivační lahve s buňkami pravidelně sklizeny, a to v 48h časovém profilu (CT4, CT8, CT12, CT16, CT20, CT24, CT28, CT32, CT36, CT40, CT44 a CT48) (obr. 16). Počet buněk se v době odběru pohyboval v rozmezí 6–9\*10<sup>6</sup> buněk/ml. Sklizené buňky byly vždy opláchnuty v PBS, lyzovány v RNA lyzačním roztoku (TRI reagent) a uloženy do –80°C.



*Obr. 16 Časový profil odběru buněk po synchronizačním signálu. CT označuje cirkadiánní čas uplynulý od synchronizačního signálu.*

#### **3.2.1.4. Izolace RNA**

RNA byla izolována z buněčného lyzátu pomocí izolačního kitu Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research Corporation). Integrita RNA byla testována na RNA bioanalyzáru (Agilent TapeStation analysis).

#### **3.2.1.5. Reverzní transkripce a kvantitativní PCR**

K reverzní transkripci RNA izolované z buněk byla použita reverzní transkriptáza M-MLT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a Oligo(dT) primery. 1 µg vzorku RNA o objemu 10 µl byl nejprve inkubován 5 min při 65°C s oligo(dT) primery a 2 µl 10 mM NTP. Poté 3 min ochlazen na ledu. Ke směsi byla následně přidána transkriptáza M-MLT, DDT a FS pufr. Přepis z RNA na cDNA probíhal ve 40µl reakci v termocykleru: 75 min 37°C a 15 min 70°C. Získaná cDNA byla následně zředěna v poměru 1:10 RNA free-vodou.

#### **3.2.1.6. Kvantitativní PCR**

Jako endogenní kontrolní gen byl pomocí algoritmu NormFinder zvolen gen *gusb*, který v našem souboru dat vykazoval nevyšší míru stability.

Reakce PCR byly prováděny v 10 µl. Každá reakční směs obsahovala 6 µl TaqMan™ OpenArray™ Real-Time PCR Master Mix, 1 µl TaqMan próby, 3 µl H<sub>2</sub>O a 2 µl cDNA. Relativní exprese byla kvantifikována pomocí metody  $\Delta\Delta C_t$ .

### 3.3. Studie post mortem a metodika

#### 3.3.1. Cirkadiánní oscilace transkriptomu v předním cingulu pacientů s unipolární depresí

##### 3.3.1.1. 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. Všechny subjekty obou skupin byly charakterizovány jako europoidní rasa a mezi skupinami nebyly vysledovány žádné signifikantní rozdíly v základních parametrech (tabulka 1). Z oblasti předního cingula byl vyříznut bloček o tloušťce přibližně 0,5 cm, jehož hmotnost odpovídala zhruba 200 mg. Vzorky byly získány z Douglas-Bell Canada Brain Bank (douglasbrainbank.ca). Všichni pacienti s UD spáchali sebevraždu, kontrolní subjekty zemřely při nehodě nebo přirozenou smrtí a nebyla u nich zjištěná žádná psychopatologická historie. U všech subjektů byla známa doba úmrtí.

přední cingulární kortex (BA24)			
charakteristika	kontroly	unipolární deprese	p-hodnota
<b>N</b>	22	26	n/a
<b>věk</b>	46.75	42.23	0.389
<b>PMI (h)</b>	22.13	25.21	0.563
<b>pH mozku</b>	6.47	6.61	0.114
<b>RIN</b>	6.86	6.83	0.859
<b>muži/ženy</b>	17/5	19/7	0.614

*Tabulka 1 Charakteristika a porovnání kontrolní skupiny a skupiny pacientů s unipolární depresí a příslušných vzorků z předního cingula. N = počet, PMI = interval post mortem, RIN = RNA integrity number.*

##### 3.3.1.2. Izolace RNA

K izolaci RNA ze vzorku mozkové tkáně byl použit RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Kvalita a integrita byla následně testována na Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Germany). Na RNA sekvenaci byly použity pouze vzorky s hodnotou RIN vyšší než 5.

##### 3.3.1.3. RNA sekvenace

Kompletní sekvenace transkriptomu byla provedena v Inovačním centru University McGill. Při sekvenaci byl použit kit Ribo-Zero Gold rRNA Removal sloužící k depleci rRNA z izolované RNA (Illumina, MRZG12324, USA) a kit TruSeq Stranded Total RNA

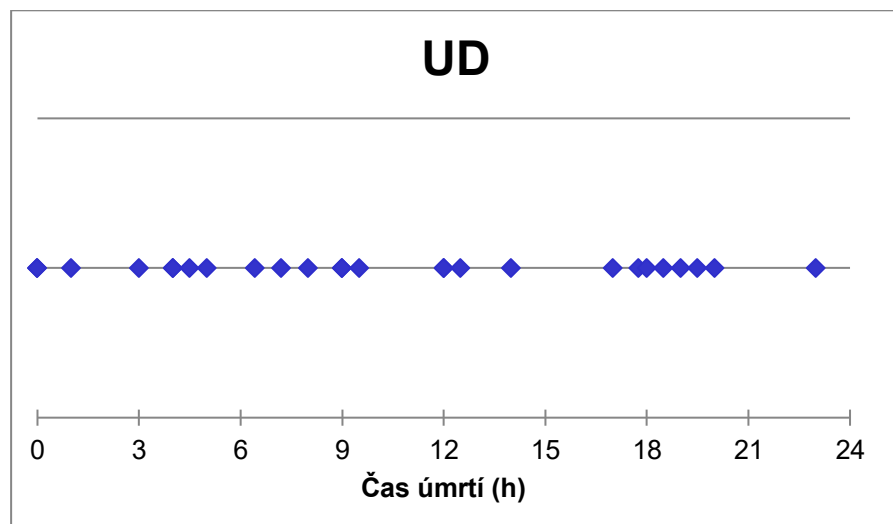


Library Prep pro přípravu sekvenační knihovny (Illumina, RS-122-2201, USA). Sekvenování bylo provedeno na Illumina HiSeq 2000 (Illumina, USA) za vzniku 100bp dlouhých čtení (paired-end reads).

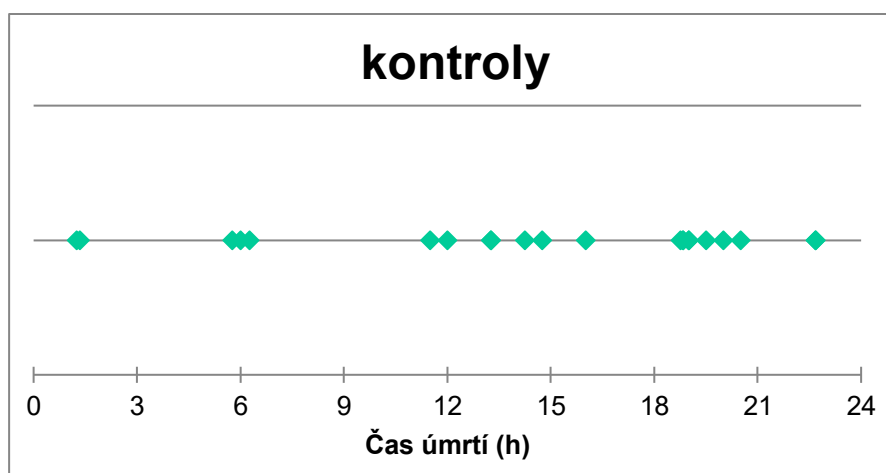
#### 3.3.1.4. Bioinformatické zpracování dat a kosinorová analýza

Ze získaných sekvenčních úseků byly nejprve odstraněny umělé sekvence a byl proveden test kvality vzorků. Následně byly fragmenty porovnány s lidským referenčním genomem hg19 pomocí TopHat v2.1.0. (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>) a byly identifikovány jednotlivé transkripty. Kvantifikace byla vyjádřena jako počet fragmentů na kilobázi transkriptu na milion mapovaných čtení (FPKM, z angl. fragments per kilobase of transcript length per milion of mapped reads). Data byla normalizována a korigována na délku posmrtného intervalu, na věk subjektu a na integritu izolované RNA (RIN). Subjekty účastníci se studie byly nejprve seřazeny podle času úmrtí; tento čas představoval jeden časový bod v analýze (obr. 17a, obr. 17b). Následně byla data získaná z RNA sekvence podrobena celotranskriptomové cirkadiální analýze využívající kosinorový model s fixní periodou dlouhou 24 h. Data byla zpracována s využitím programovacího jazyka R za pomoci bioinformaticky Laury Kervezee podle skriptu popsaného v práci Kervezee, Cuesta, Cermakian, & Boivin, 2018.

A



## B



Obr. 17 Časový profil doby úmrtí A) pacientů s UD a B) kontrolních subjektů.

### 3.3.1.5. KEGG genomická analýza signalizačních drah

S využitím elektronické databáze Kjótské encyklopedie genů a genomu (KEGG) (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) jsme identifikovali signalizační dráhy, ve kterých jsou zapojeny rytmicky oscilující geny identifikované v celotranskriptomové kosinorové analýze.

## 4. Výsledky

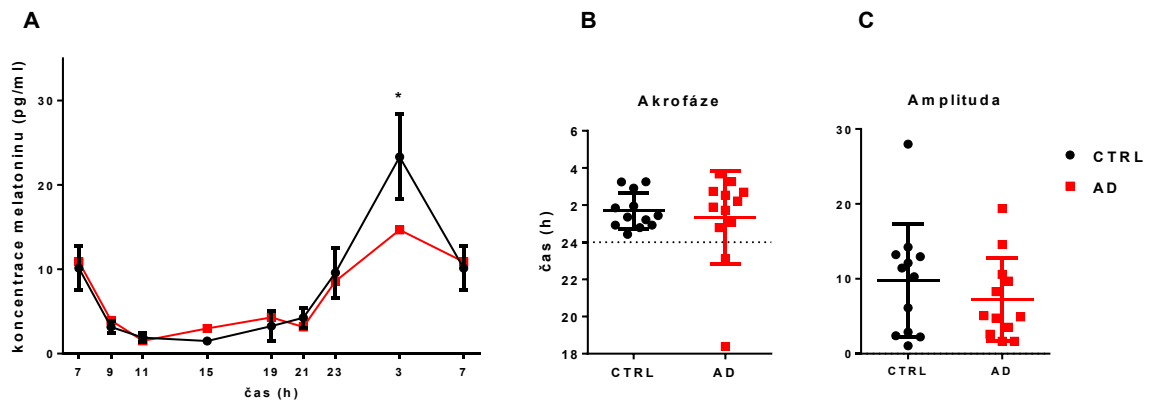
### 1. Identifikace časných změn cirkadiánních rytmů v raných fázích neurodegenerativních onemocnění

#### 4.1. Studie cirkadiánního systému v rané fázi Alzheimerovy nemoci

##### 4.1.1. Denní produkce melatoninu ve slině u pacientů a jejich partnerů

Denní hladina melatoninu byla u každého subjektu určena ze vzorků slin odebraných v 9 časových bodech. Průměrný denní profil melatoninu u skupiny pacientů s AN a u kontrolní skupiny je znázorněn v grafu (obr. 18). Dvojná ANOVA s opakováním odhalila signifikantní efekt času ( $F = 18,470$ ;  $P < 0,0001$ ), nicméně rozdíl mezi skupinami neodhalila ( $F = 0,026$ ;  $P = 0,874$ ). Rozdíl mezi skupinami nebyl odhalen ani při porovnání oblasti pod křivkou (AUC, z angl. area under curve) počítaným pro každý profil. Průměrné hodnoty vypočítané z jednotlivých profilů melatoninových křivek byly srovnány Studentovým t-testem ( $P = 0,585$ ). Rozdíly nebyly nalezeny ani u akrofáze a amplitudy (obr. 18b, 18c). Srovnání individuálních denních profilů melatoninu odhalilo vysokou variabilitu v rámci obou skupin. Ze 13 kontrolních subjektů vykazovalo typický průběh

melatoninu 8 subjektů (u 7 z nich se amplituda pohybovala mezi 20–40 pg/ml a jeden subjekt měl amplitudu až 60 pg/ml). U 4 kontrolních subjektů nedocházelo téměř k žádnému nočnímu nárůstu (noční maximum nepřesahovalo 5 pg/ml), nebyl u nich tedy identifikován cirkadiánní rytmus v produkci melatoninu. Jeden kontrolní subjekt vykazoval fázově předběhnutý cirkadiánní rytmus s nízkou amplitudou (maximum dosahovalo 20 pg/ml mezi 21.–23. hodinou). Z třináctičlenné skupiny pacientů s AN nebyl prokázán cirkadiánní rytmus v tvorbě melatoninu u 6 subjektů (hladina nepřesáhla 5 pg/ml) nebo byl rytmus velmi slabý a s velmi nízkou amplitudou (pod 10 pg/ml). U čtyř pacientů byl zjištěn typický průběh denní tvorby melatoninu s maximem kolem 3. hodiny a amplitudou mezi 20–40 pg/ml. U tří pacientů bylo popsáno fázové předběhnutí, v jednom případě dosáhla produkce melatoninu svého maxima v 19 h (20–30 pg/ml) a ve dvou ostatních případech ve 23 h (10–20 pg/ml).

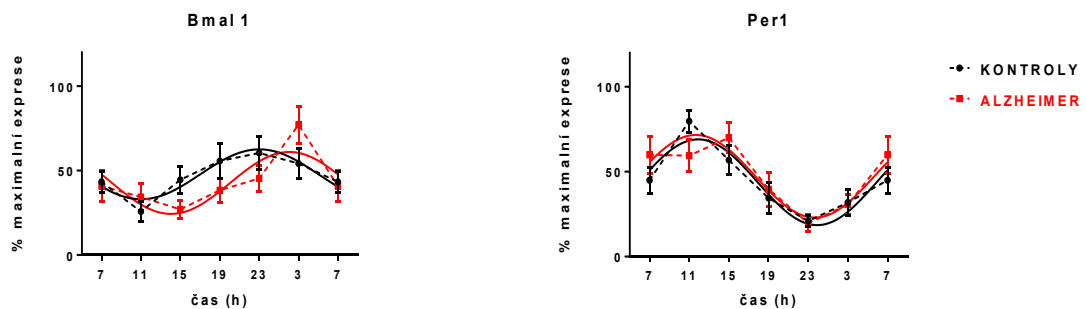


**Obr. 18** Hladiny melatoninu ve slině pacientů s AN ( $n = 13$ ; červené čtverce) a kontrolních subjektů ( $n = 13$ ; černá kolečka). A) Průměrný denní profil melatoninu pacientů s AN a kontrolních subjektů. B) Akrofáze jednotlivých profilů melatoninu pacientů s AN ( $1,3 \text{ h} \pm 2,51$ ) a kontrol ( $1,7 \text{ h} \pm 0,97$ ). C) Amplituda jednotlivých profilů melatoninu pacientů s AN ( $7,2 \text{ h} \pm 5,50$ ) a kontrol ( $9,7 \text{ h} \pm 7,56$ ).

#### 4.1.2. Expresse hodinových genů v bukálních stěrech

Signifikantní rytmus exprese hodinového genu *Per1* a *Bmall* v denním profilu získaného z bukálních stěrů byl identifikován jak u kontrolní skupiny, tak u pacientů s AN (obr. 19). U pacientů a kontrol rytmus exprese hodinového genu *Per1* dosáhl akrofáze během dne a svého minima v průběhu noci. Rytmičká exprese hodinového genu *Bmall* byla v obou studovaných skupinách v protifázi k hodinovému genu *Per1*. Zatímco rytmus hodinového genu *Per1* se proložením kosinorové křivky ukázal být ve stejné fázi u obou skupin, rytmus *Bmall* pacientů s AN byl oproti rytmu kontrolní skupiny fázově zpožděn. 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*:  $F = 1,655$ ;  $P = 0,211$ ). Rozdíl v akrofázi mezi skupinami neodhalil ani nepárový Studentův t-test (*Per1*:  $P = 0,953$ ; *Bmal1*:  $P = 0,278$ ).

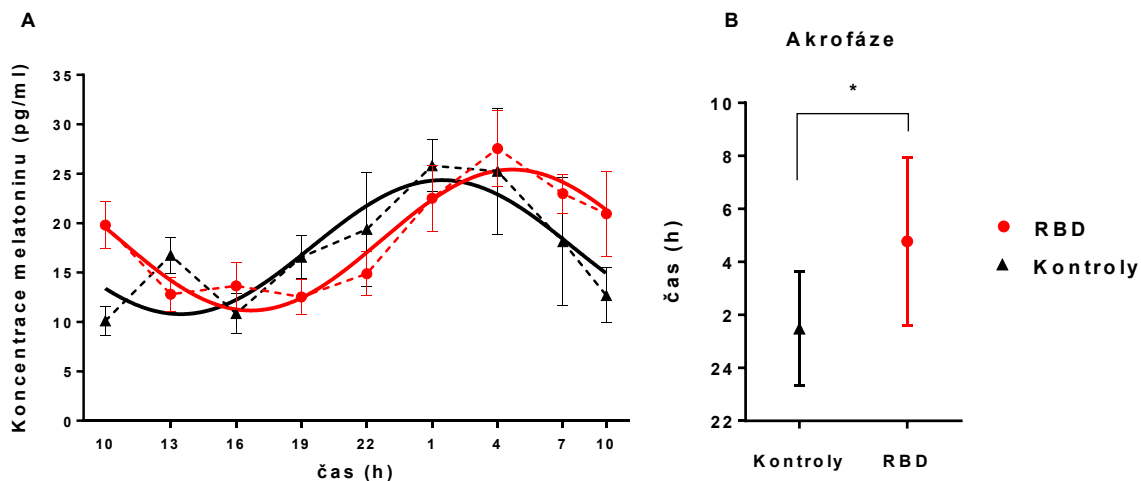


**Obr. 19** Expres hodiny genů *Bmal1* a *Per1* v bukálním stěru u pacientů s AN (červené čtverce) a kontrol (černá kolečka) v denním profilu. Přerušovaná spojnice znázorňuje průměrné hodnoty  $\pm$  SEM exprese genu a plná čára znázorňuje jejich fit na kosinorovou křivku.

## 4.2. Studie cirkadiálního systému pacientů s poruchou chování v REM spánku

### 4.2.1. Denní produkce melatoninu v krevní plazmě u kontrol a pacientů

Průměrný denní profil melatoninu u kontrolní skupiny a skupiny pacientů s RBD je vyobrazen na obr. 20. 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 akrofázi nepárovým Studentovým t-testem mezi kontrolní skupinou a skupinou RBD prokázal statisticky významný rozdíl ( $P = 0,0337$ ). Akrofáze pacientů s RBD byla až o 3 hodiny zpožděna ve srovnání s kontrolami (obr. 20). Srovnání průměrné hodnoty AUC měřených v jednotlivých profilech neprokázalo signifikantní rozdíl mezi skupinami (RBD:  $AUC = 389, 54 \pm 25, 1$ ; kontroly:  $AUC = 355, 75 \pm 43, 2$ ).



**Obr. 20** Denní hladiny melatoninu v krevním séru u pacientů s RBD (červená kolečka) a u kontrolních subjektů (černé trojúhelníčky). A) Rytmičtý profil melatoninu u pacientů s RBD a kontrolní skupiny. Data jsou vynesena jako průměrné hodnoty  $\pm$  SEM. Přerušovaná čára znázorňuje spojnici průměrných denních hodnot. Plná čára znázorňuje fit těchto bodů na kosinorovou křivku. B) Porovnání akrofáze melatoninového rytmu u kontrol (1,5 h  $\pm$  2,15) a RBD (4,8 h  $\pm$  3,16), Studentův t-test  $P = 0,0337$ .

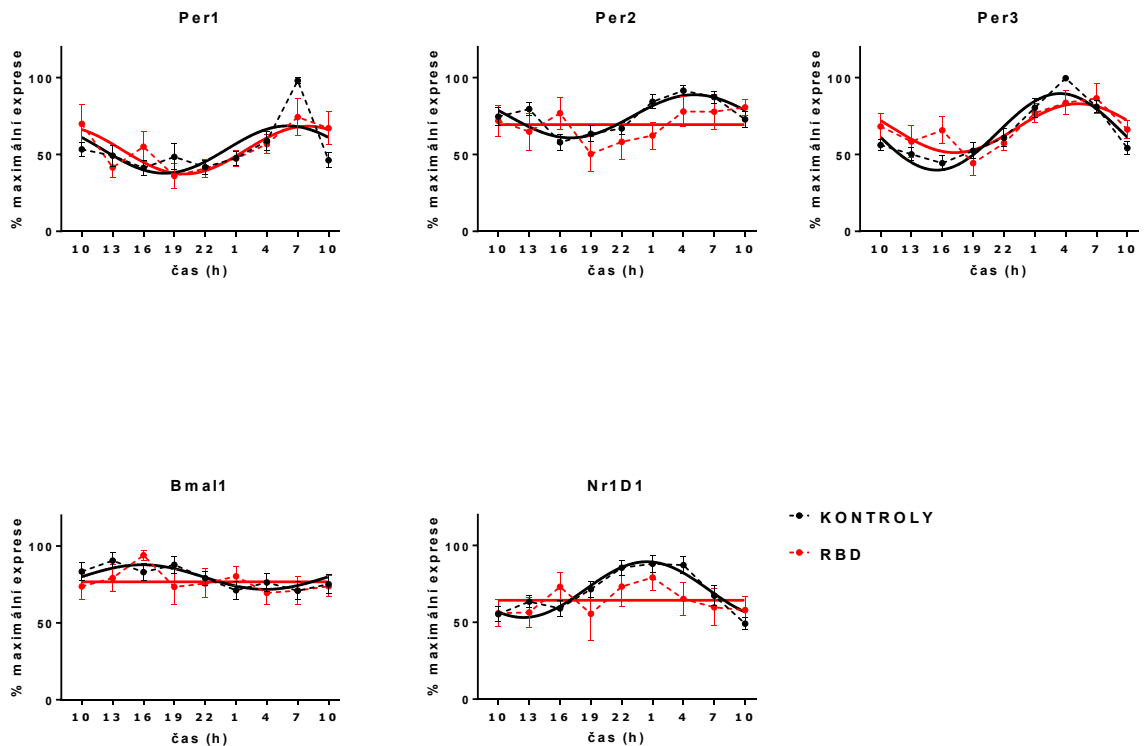
#### 4.2.2. Expresce hodinových genů v PBMCs pacientů a kontrol

Expresce hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Bmall* a *Nr1D1* byla měřena v periferních hodinách mononukleárních krevních buněk u subjektů s RBD a u zdravých kontrol (obr. 21).

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*:  $P = 0,2183$ ). U hodinového genu *Per3* došlo u pacientů s RBD k signifikantnímu poklesu jeho amplitudy ( $P = 0,0322$ ).

Výsledky dvoucestné ANOVA neodhalily signifikantní rozdíl mezi skupinami v expresi sledovaného hodinového genu (*Per1*:  $F = 0,02135$ ,  $P = 0,8841$ ; *Per2*:  $F = 3,521$ ,

$P = 0,0631$ ;  $Per3$ :  $F = 1,214$ ,  $P = 0,2729$ ;  $Bmal1$ :  $F = 0,883$ ,  $P = 0,3492$ ;  $Nr1d1$ :  $F = 2,301$ ,  $P = 0,1321$ ).



**Obr. 21** Exprese hodinových genů pacientů s RBD (červeně) a zdravých kontrol (černě), měřené v PBMCs v denním profilu. Přerušovaná spojnice znázorňuje průměrné hodnoty  $\pm$  SEM exprese genu a plná čára znázorňuje jejich fit na kosinorovou křivku. Horizontální plná čára u genu *Bmal1*, *Nr1D1* a *Per2* znázorňuje výsledek kosinorové analýzy, který nepotvrdil jejich rytmickou expresi (*Per2*:  $P = 0,0991$ ; *Bmal1*:  $P = 0,2308$  a *Nr1d1*:  $P = 0,2183$ ).

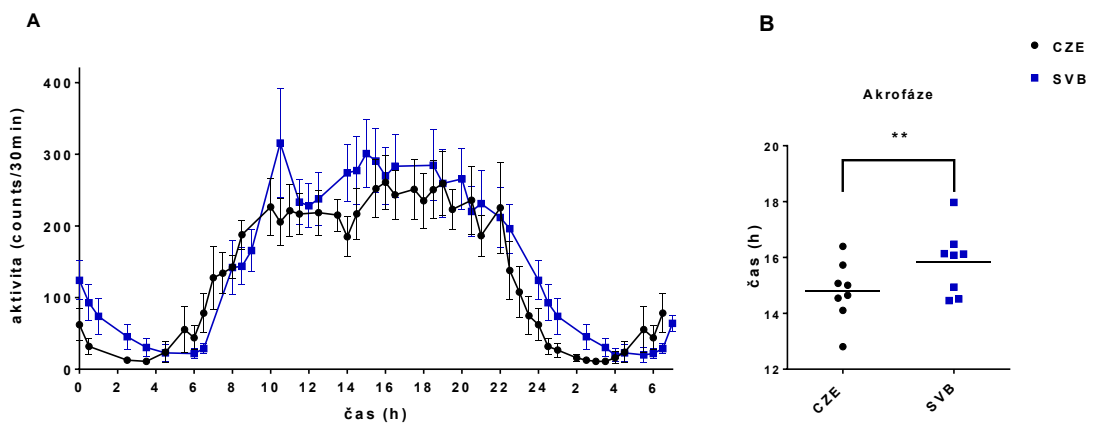
#### 4.3. Synchronizace cirkadiálního systému člověka v podmínkách stálého světla

##### 4.3.1. Výsledky aktigrafického měření: Spánková analýza a analýza pohybové aktivity

Výsledky aktigrafického měření srovnávají rozdíly v denním rytmu pohybové aktivity a ve spánkových parametrech u 8 subjektů (2 záznamy byly vyřazeny z důvodů závady na MotionWatch), které vyplynuly z měření probíhajícího v České republice a na Svalbardu.

#### 4.3.1.1. Analýzy rytmu pohybové aktivity

Záznam pohybové aktivity je zobrazen jako průměr z měření všech subjektů za den. Jednotlivé body představují průměrnou pohybovou aktivitu v 30minutových intervalech. 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 ( $F = 0,9007$ ;  $P = 0,6902$ ) (obr. 22a). 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 ( $P = 0,0021$ , obr. 22b).



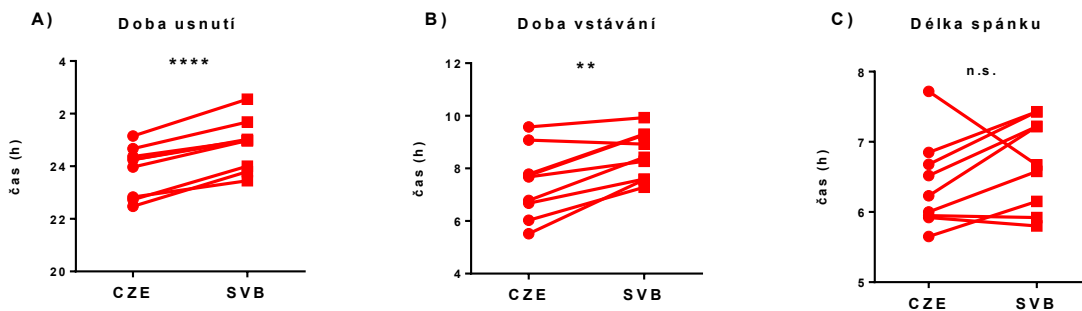
**Obr. 22 Rytmus pohybové aktivity v České republice (CZE) a na Svalbardu (SVB)**

A) Průměrná denní aktivita osmi subjektů v České republice (černá kolečka) a na Svalbardu (modré kostičky). Aktivita je vynesena jako průměrná hodnota  $\pm$  SEM ze 12 dnů měření, z průměru 30minutových intervalů od všech sledovaných subjektů. Pro větší názornost jsou hodnoty 00:00 až 7:00 vyneseny duplicitně. B) Akrofáze pohybové aktivity je vynesena pro každý subjekt na Svalbardu a v České republice.

#### 4.3.1.2. Spánková analýza

Spánková analýza byla provedena pomocí softwaru MotionWare. Zaměřili jsme se na sledování tří parametrů, a to času usnutí, času vstávání a celkové délky spánku.

Jednotlivé parametry byly analyzovány pro každý den měření u všech sledovaných subjektů. Průměrné hodnoty z měření na Svalbardu a v České republice byly následně srovnány párovým Studentovým t-testem. 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;  $P < 0,0005$ ; obr. 23a). Došlo k signifikantně zpožděnému probouzení (Česká republika, průměr:  $7,51 \pm 1,4$  h; Svalbard, průměr:  $8,51 \pm 0,97$  h,  $P = 0,0056$ ; obr. 23b). 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; obr. 23c).

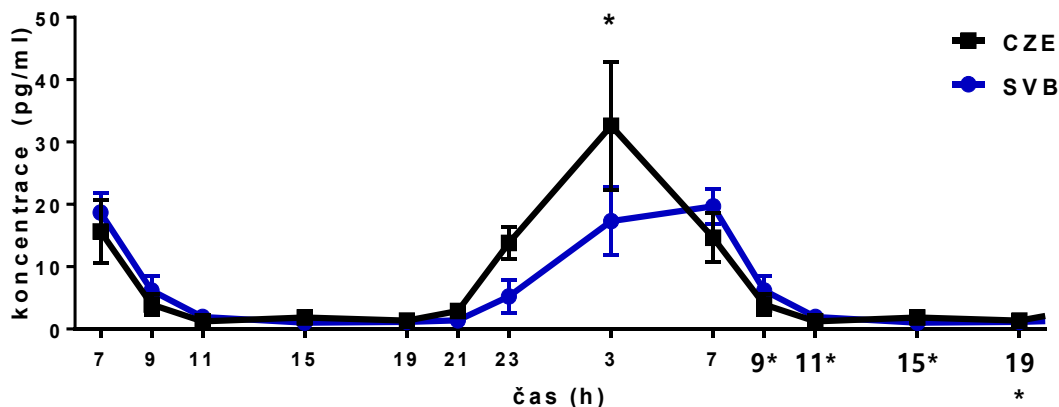


**Obr. 23 Spánkové parametry v České republice (CZE) a na Svalbardu (SVB).** A) Doba usnutí, B) Doba vstávání, C) Délka spánku. Jednotlivé parametry jsou vyneseny pro každého jednotlivce v České republice (kolečko) a na Svalbardu (čtvereček). Spojnice mezi body vyznačuje změnu parametru u každého jednotlivce.

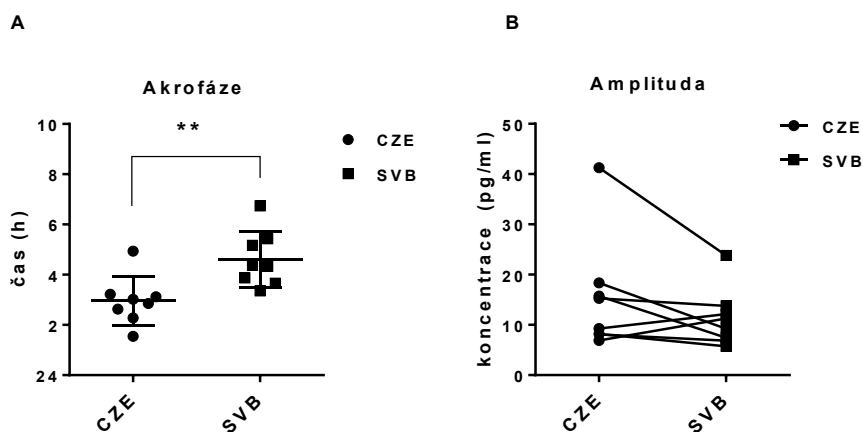
#### 4.3.2. Denní hladina melatoninu ve slině

Hladiny melatoninu byly měřeny ve vzorcích slin odebíraných v devíti časových bodech v průběhu 24 hodin. Denní produkce melatoninu je prezentována jako průměrné hodnoty ve 32h periodě, kdy 9.\*, 11.\*, 15.\* a 19.\* hodina jsou pouze znovu vynesené hodnoty pro lepší grafické znázornění výsledku (obr. 24). Dvoucestná ANOVA s opakovaním 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 prováděnými 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 ( $P = 0,0030$ ; obr. 25a). Noční maximum melatoninu bylo na Svalbardu o cca  $1,666 \pm 1,14$  h zpožděno. Rozdíl v amplitudě mezi měřeními na Svalbardu a v České republice nebyl signifikantní (obr. 25b).





Obr. 24 Denní profily hladiny melatoninu ve slině v České republice (CZE) a na Svalbardu (SVB). Hladiny melatoninu vyjádřené jako průměrné hodnoty  $\pm$  SEM měřené v České republice (černé čtverečky) a na Svalbardu (modrá kolečka).



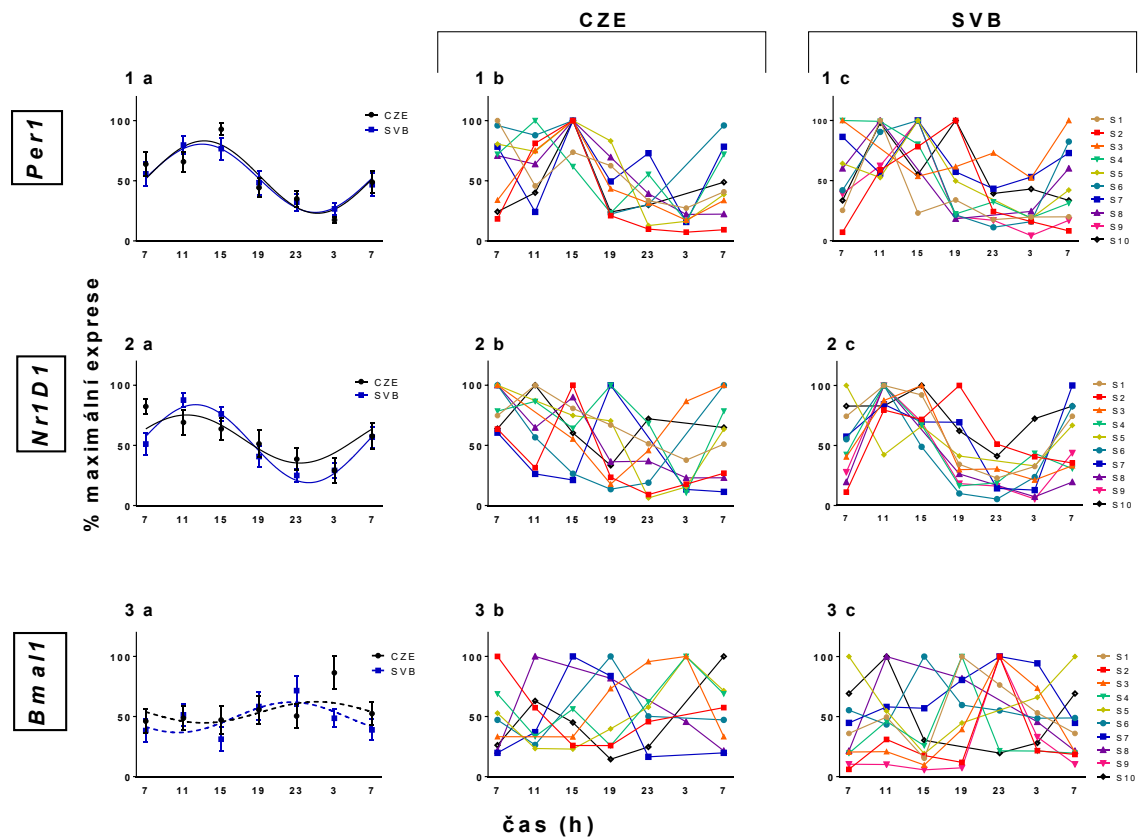
Obr. 25 Změna akrofáze a amplitudy melatoninu v České republice (CZE) a na Svalbardu (SVB). A) Akrofáze melatoninového rytmu vynesena jednotlivě pro každý subjekt v České republice (kolečka) a srovnána s hodnotami na Svalbardu (čtverečky). B) Amplituda melatoninu vynesena jednotlivě pro každý subjekt v České republice (kolečka) a srovnána s hodnotami na Svalbardu (čtverečky). Spojnice mezi body vyznačuje změnu amplitudy u jednotlivého subjektu.

#### 4.3.3. Expresse hodinových genů v bukálních stěrech

Expresse hodinových genů *Per1*, *Nr1D1* a *Bmal1* byla analyzována ze vzorků bukálních stěrů v denním profilu s využitím kosinorové analýzy. Geny *Per1* a *Nr1D1* ve své expresi vykazovaly signifikantní cirkadiánní rytmus (obr. 26, 1 a 2). Expresse hodinového genu *Bmal1* nevykazovala cirkadiánní rytmus ani ve vzorcích z České republiky, ani ze Svalbardu (obr. 26, 3).

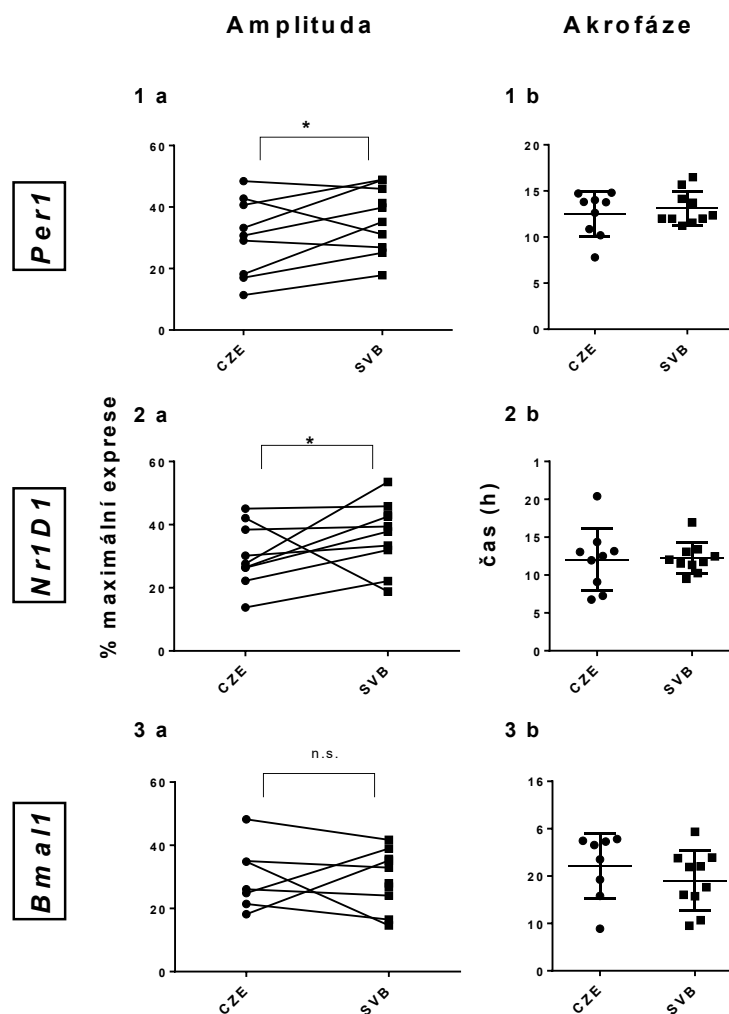
Dvojná ANOVA s opakováním s Bonferroniho korekčním mnohanásobným testem odhalila signifikantní efekt času (*Per1*:  $F = 12,5$ ;  $P < 0,0001$ ; *Nr1D1*:  $F = 11,08$ ;  $P <$

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*:  $P = 0,0244$ ) (obr. 27, 1a, 2a), 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:  $SD \pm 6,26$ ) (obr. 27, 2a, 2b, 2c).



**Obr. 26** Expresa hodinových genů v bukálních stěrech v denním profilu

1) *Per1*, 2) *Nr1D1*, a 3) *Bmal1*. a) Kosinorová analýza srovnávající průměrné hodnoty genové exprese  $\pm SEM$  u hodinových genů *Per1*, *Bmal1* a *Nr1D1*. b) Individuálně vynesené profily exprese hodinových genů v České republice. c) Individuálně vynesené exprese hodinových genů na Svalbardu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako relativní genová exprese v procentech jejich maximální exprese. Signifikantní rytmus ( $P < 0,05$  pro *Per1*, *Nr1D1*) je znázorněn v grafu plnou čarou, nesignifikantní rytmus je vyjádřen přerušovanou čarou.



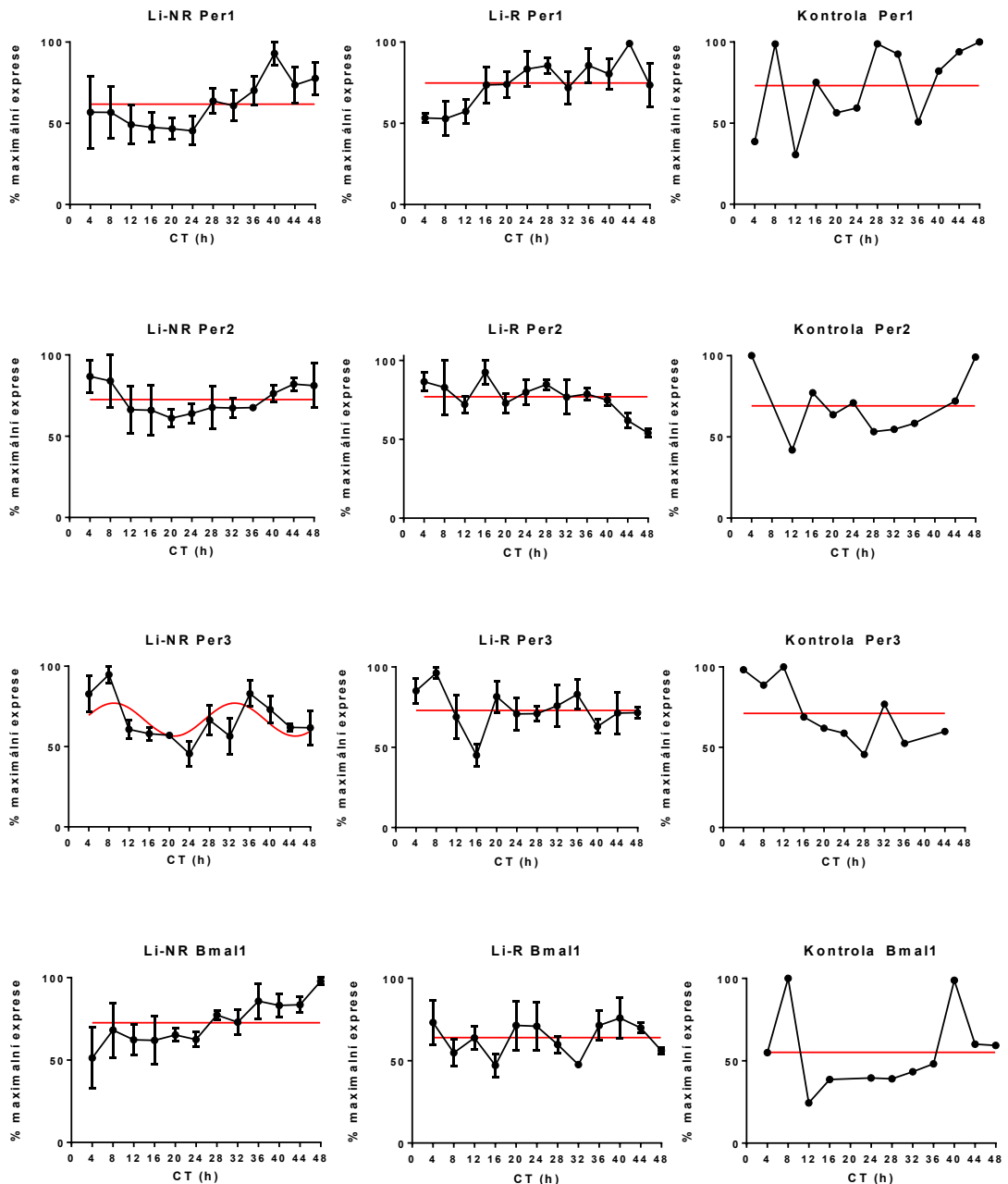
**Obr. 27** Změna amplitudy a akrofáze hodinových genů v České republice a na Svalbardu  
 1) *Per1*, 2) *Nr1D1*, a 3) *Bmal1*. a) Hodnoty amplitudy jednotlivých subjektů naměřené v České republice a na Svalbardu porovnané párovým Studentovým *t*-testem; b) Hodnoty akrofáze jednotlivých subjektů naměřené v České republice a na Svalbardu porovnané párovým Studentovým *t*-testem. Tečky znázorňují hodnoty naměřené v České republice, čtverečky hodnoty na Svalbardu. Spojnice propojují body jednotlivých subjektů.

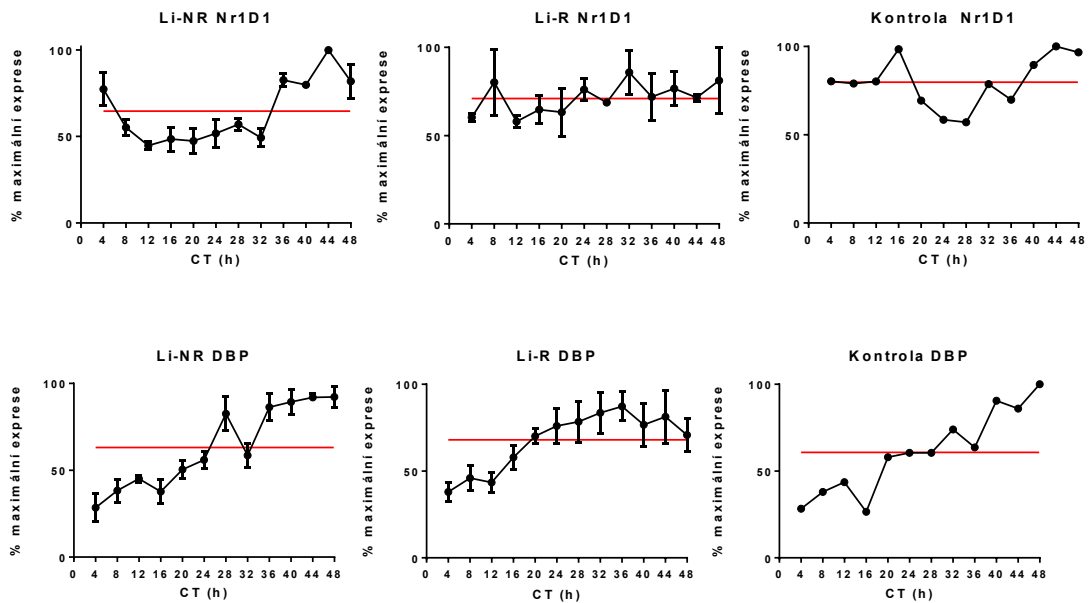
#### 4.4. Oscilace hodinových genů před aplikací lithia a po ní v buněčné kultuře transformovaných lymfocytů získaných od Li-R a Li-NR BAP pacientů

##### 4.4.1. Identifikace rytmických oscilací hodinových genů v kultuře *in vitro* po synchronizaci sérovým šokem ve 48hodinovém intervalu

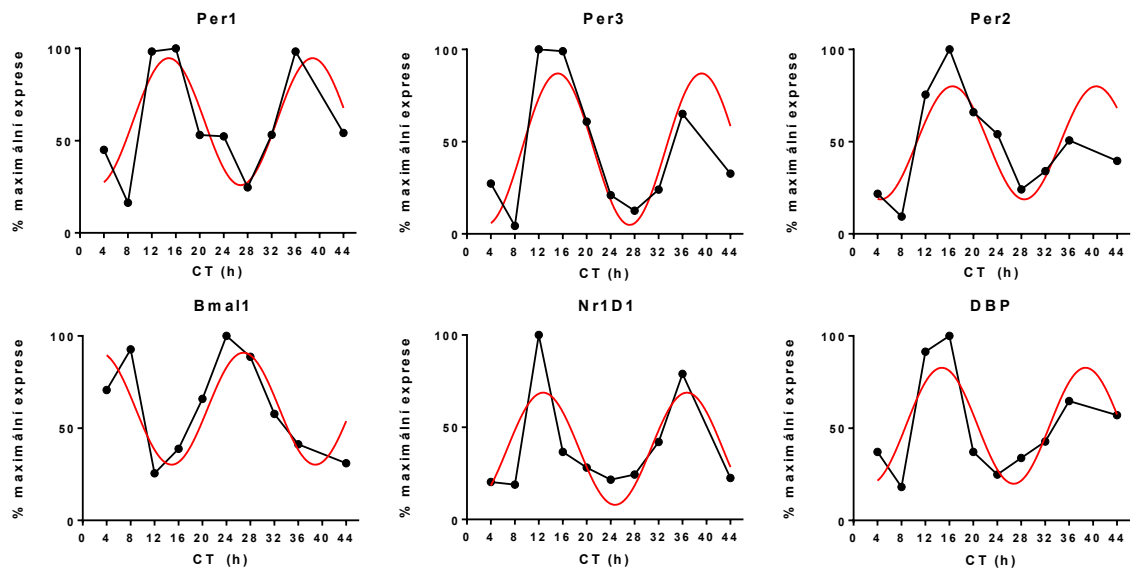
Expresce hodinových genů v kultuře *in vitro* buněk transformovaných lidských lymfocytů nevykazovala rytmické oscilace v žádné ze sledovaných skupin s výjimkou genu *Per3*. K analýze rytmických oscilací byla použita kosinorová analýza. Výsledky kosinorové analýzy prokázaly rytmickou oscilaci pouze u hodinového genu *Per3* ve skupině BAP Li-R. U žádného dalšího měření se rytmické oscilace nepotvrdily (obr. 28).

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 (obr. 29). Tyto výsledky potvrdily správnost našeho experimentálního protokolu, ovšem transformované lymfocyty se ukázaly jako nevhodný model *in vitro* pro studium cirkadiálních oscilací hodinových genů.





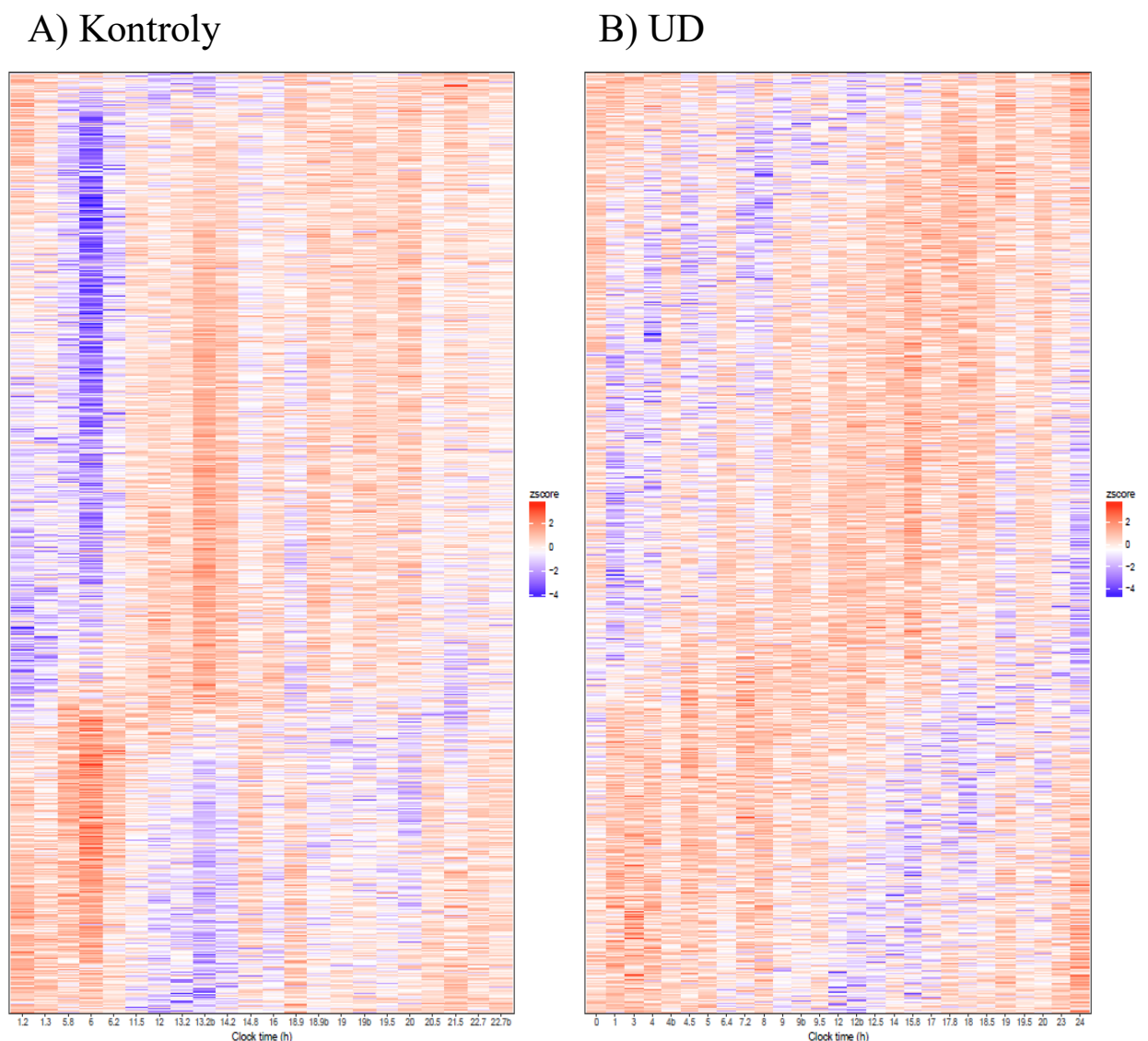
**Obr. 28** *Expresa hodinových genů a kosinorová analýza v buněčných kulturách lymfoblastoidních linií od bipolárních pacientů Li-R, Li-NR a kontrolní skupiny. Na ose x je vynesena čas (h) od synchronizace buněčné kultury. Jednotlivé body znázorňují průměrnou hodnotu procenta maximální exprese ± SEM (Li-NR: n = 3; Li-R: n = 3; kontrola: n = 1). Červená čára znázorňuje výsledek kosinorové analýzy (horizontála = nerytmická exprese, kosinorová křivka = rytmická exprese).*



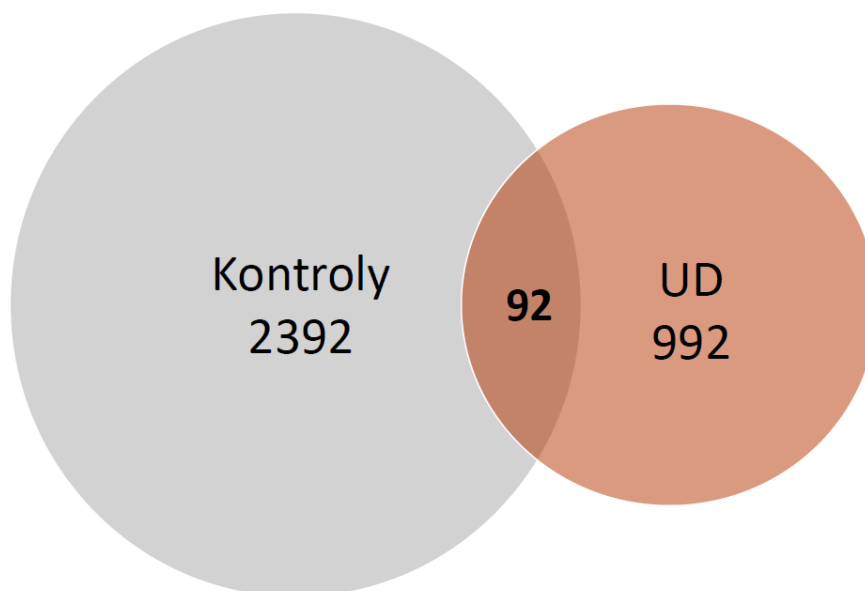
**Obr. 29** *Expresa hodinových genů a kosinorová analýza v buněčných kulturách lidských fibroblastů. Na ose x je vynesena čas (h) od synchronizace buněčné kultury. Jednotlivé body znázorňují hodnotu procenta maximální exprese (n = 1). Červená čára znázorňuje výsledek kosinorové analýzy (kosinorová křivka = rytmická exprese).*

#### 4.5. Cirkadiánní oscilace transkriptomu v předním cingulu pacientů s unipolární depresí

V sekvenční analýze RNA jsme identifikovali více než 55 000 transkriptů ve vzorcích předního cingula (ACC). Tzv. „heat map“ (obr. 30a, 30b) zobrazuje geny, u kterých byl pomocí kosinorové analýzy prokázán cirkadiánní rytmus. Geny jsou v obrázku seřazené podle času akrofáze a měřené vzorky jsou seřazené v cirkadiánním čase podle doby úmrtí subjektu (viz metodika, kap. 3.3.1.4). 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 (obr. 31).



**Obr. 30 A, B Heat map znázorňující rytmicky oscilující transkriptom kontrol a pacientů s UD. Body na časové ose znázorňují dobu úmrtí jednotlivých subjektů. Řádky představují jednotlivé rytmické transkripty, které jsou seřazené podle fáze exprese jednotlivých genů.**



**Obr. 31 Vennův diagram znázorňující počet rytmických genů transkriptomu u kontrol a u skupiny pacientů s UD. Překryv udává počet stejných genů, u kterých byl v obou skupinách identifikován cirkadiánní rytmus.**

Porovnání nalezených genů s rytmickou expresní aktivitou s genovou ontologií využívající Kjótskou encyklopedii genů a genomů (KEGG) prokázalo, že mezi těmito geny se u kontrolní skupiny vyskytuje několik klíčových genů zodpovídajících za funkci molekulárních hodin. V ACC tak byla identifikována exprese hodinových genů *Arntl1* (*Bmal1*), *Arntl2* (*Bmal2*), *Per1* a *Npas*. *Arntl1* a *Arntl2* jsou svými vlastními funkčními homology. *Npas* je paralog hodinového genu *Clock*. Geny *Npas* a *Arntl* jsou tak geny negativní zpětnovazebné smyčky molekulárních hodin. *Per1* je komponenta pozitivní zpětnovazebné smyčky. 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 ostatních hodinových genů rytmické oscilace zjištěny nebyly. U kontrolní skupiny také bylo identifikováno 19 rytmicky oscilujících genů souvisejících se synchronizací cirkadiánního systému. Konkrétně se jedná o geny *Gsk3β*, *Grin1*, *Gria1*, *Itp1*, *Gng3*, *Adcy4*, *Cacna1d*, *Gnb5*, *Hlf*, *Adcy1*, *Prkcg*, *Noslap*, *Adcy6*, *Cacna1i*, *Cacna1c*, *Cacna1h*, *Cacna1d*, *Rasd1* a *Ryr2*. U pacientů s UD byly pomocí KEGG jako rytmicky oscilující geny účastníci se synchronizace cirkadiánního systému identifikovány pouze 2 geny, a to *Cacna1g* a *Kcnj9*.

## 5. Diskuze

V první části práce jsme se ve dvou studiích zabývali cirkadiálním systémem u raných fází neurodegenerativních onemocnění. Cílem této části práce bylo popsat změny cirkadiálních 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 cirkadiálním 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 cirkadiální 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 cirkadiální 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 cirkadiálních 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; R.-Y. Liu, Zhou, van Heerikhuize, Hofman, & Swaab, 1999). 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 (T. Arendt, Brückner, Morawski, Jäger, & Gertz, 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 cirkadiálního rytmu tělesné teploty by tak mohlo lépe reflektovat, zda časně neurodegenerativní změny zasahují



i tuto oblast a zda změny sledované ve výstupních rytmech souvisí s poškozenou funkcí cirkadiálního 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* (Breen et al., 2014; Cai, Liu, Sothorn, Xu, & Chan, 2010).

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 (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, Marquez De Prado, Prieto, & Mora, 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 et al., 2019) a negativně regulována REV-ERB $\alpha$  (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 genové exprese 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

cirkadiánní rytmus byl pravidelný jak u aktivity, tak v produkci melatoninu. Tyto výsledky jsou v souladu s předešlými pracemi (Bhatt, Podder, & Chokroverty, 2005; Paul et al., 2015; Stokkan & Reiter, 1994; Yoneyama, Hashimoto, & 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 buňky 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; Mistlberger & Skene, 2005; Friedrich K. Stephan, 2002). Zmenšené rozptyly akrofázi u sledovaných hodinových genů na Svalbardu (obr. 27b) 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 & 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* (S. A. Brown et al., 2005; Landgraf et al., 2016; Michael J McCarthy & Welsh, 2012). V buňkách lidských fibroblastů se nám podařilo prokázat robustní cirkadiánní 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 dlouhou dobu po synchronizačním signálu (S. A. 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 cirkadiánních 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 (A. C. Liu et al., 2007; Welsh, Logothetis, Meister, & Reppert, 1995).

K studiu cirkadiánních rytmů *in vitro* jsou vhodnější buňky kožních fibroblastů, které rostou ve vysoce konfluentních buněčných kulturách, vykazují robustní cirkadiánní 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 (Michael J. McCarthy et al., 2019).

Ve čtvrté, poslední části práce jsme se věnovali analýze celotranskriptomových cirkadiánních oscilací v předním cingulu, odebraného post mortem od pacientů s UD. Časový profil požadovaný pro cirkadiánní 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 cirkadiánní 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 cirkadiánní 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 cirkadiánní rytmus u 18 dalších genů souvisejících s regulací a synchronizací hodinového mechanismu, jako je například  $GSK3\beta$  nebo některé podjednotky glutamátových receptorů (GRIN1, GRIA1). Na rozdíl od kontrolní skupiny byl u pacientů s UD cirkadiánní 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 dráhách cirkadiánního systému.

Denní oscilace nálady jsou řízeny cirkadiánními 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. Shrnutí**

### **1. Identifikace časných změn cirkadiánních rytmů v raných fázích neurodegenerativních onemocnění**

U pacientů s AN jsme identifikovali mírné změny v některých parametrech cirkadiánního systému. Došlo u nich celkově k mírnému snížení noční maximální produkce melatoninu, ovšem jeho rytmická produkce byla stabilní. Nicméně při bližším přezkoumání individuálních denních profilů melatoninu pacientů s AN se ukázalo, že u 5 ze 13 subjektů byla amplituda extrémně nízká nebo vykazovala netypickou fázi. Expresí hodinových genů v periferních buňkách vykazovaly jak u pacientů, tak u kontrolních subjektů robustní oscilace v obou sledovaných genech.

U pacientů s RBD došlo k fázově zpožděnému nárůstu melatoninu oproti kontrolám, celková hladina změněna nebyla. Kosinorová analýza neidentifikovala rytmickou expresi u hodinových genů *Per2*, *Bmal1* a *Nr1d1* v periferních mononukleárních krevních buňkách, zato u kontrol kosinorová analýza prokázala rytmus ve všech sledovaných genech.

### **2. Synchronizace cirkadiánního systému člověka v podmínkách stálého světla**

V této studii jsme prokázali, že vlivem stálého světla v přirozených podmínkách došlo u člověka k posunu akrofáze v rytmické tvorbě melatoninu i v rytmu pohybové aktivity, ale rytmické cirkadiánní oscilace hodinových genů byly téměř beze změny. Naše výsledky tak poukazují na schopnost vnitřních hodin využít k vlastní efektivní synchronizaci i nesvětelné synchronizační podněty, jako je pravidelná pohybová aktivita, pravidelný příjem potravy či pravidelné sociální interakce.

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

Výsledky této části práce ukazují, že transformované lymfocyty nejsou vhodným modelem pro studium cirkadiánních oscilací. Pravděpodobně proto, že buňky kultivované v suspenzních buněčných kulturách není možné udržet po synchronizačním signálu

vzájemně synchronizované. Zdá se, že k udržení vzájemné dlouhodobé mezibuněčné synchronizace jsou důležité intenzivní buněčné interakce. Vhodnější by k takovéto studii byly například lidské fibroblasty.

#### **4. Cirkadiánní oscilace transkriptomu v předním cingulu pacientů s unipolární depresí**

Výsledky této práce identifikovaly téměř 3 000 rytmicky oscilujících transkriptů v předním cingulu zdravých kontrol. Mezi rytmicky oscilujícími geny byly i klíčové hodinové geny, které představují podstatu molekulárního hodinového mechanismu. U pacientů s UD bylo popsáno pouze 992 rytmicky oscilujících transkriptů. Ze skupiny hodinových genů byly rytmické oscilace naměřeny pouze u genu *Per1*. Jeho akrofáze byla ovšem výrazně předběhnuta oproti jeho akrofázi u kontrol, která odpovídala akrofázi publikované v jiných studiích. Ztráta rytmicity u velkého množství genů v předním cingulu může poukazovat na deregulaci cirkadiánního systému u pacientů s UD.

## **7. Závěr**

Poruchy cirkadiánního systému se jednoznačně podílejí na rozvoji řady onemocnění a je důležité tomuto tématu věnovat pozornost. U onemocnění, jejichž etiologie vzniku je zřejmá, lze k výzkumným účelům využívat snadno dostupné animální modely. Zato u neuropsychiatrických onemocnění, jejichž etiologie dosud jednoznačná není a genetika těchto onemocnění je nejasná, není snadné vytvořit vhodný animální model. Studium cirkadiánního systému u neuropsychiatrických onemocnění je proto metodicky složité a sledování přímé interakce těchto onemocnění s centrálními hodinami v SCN je u člověka prakticky nemožné. V této práci jsem se snažila využít široký metodický přístup, který umožňuje studium různých aspektů lidského cirkadiánního systému a pokrývá jeho behaviorální, fyziologické i genetické výstupy.

Ke studiu behaviorálních výstupů jsme používali aktigrafickou metodu, která umožňuje dlouhodobé zaznamenávání pohybu a následnou analýzu rytmu aktivity a spánku. Využili jsme možnosti sledovat expresi hodinových genů v buňkách získaných odběrem buňek sliznice nebo PBMCs, které nám dávají informaci o stavu molekulárních hodin subjektu v jeho periferních oscilátorech. Sledovali jsme celodenní hladiny melatoninu, jehož koncentraci lze efektivně měřit ve slině či v krevní plazmě a který je centrálními hodinami přímo řízen. Pracovala jsem také s několika experimentálními paradigmaty. Jednak se studiem cirkadiánního systému v domácím prostředí, které lépe popisuje funkci cirkadiánních hodin v přirozených podmínkách, a

především je pro starší subjekty méně zatěžující. Nevýhodou tohoto přístupu je nemožnost přímé kontroly podmínek studie. Využila jsem i kontrolované podmínky spánkové laboratoře a účastnila jsem se terénního výzkumu za polárním kruhem, který umožnil přirozené studium efektu polárního dne na cirkadiánní systém člověka. Věnovala jsem i velké úsilí zavedení buněčného modelu *in vitro*, vhodného ke studiu molekulárního hodinového mechanismu člověka, který by měl sloužit ke studiu geneticky podmíněných změn cirkadiánních hodin nebo interakce molekulárních hodinových mechanismů s farmaky. V neposlední řadě jsem se v této práci věnovala analýze rytmických oscilací v celém transkriptomu mozkové tkáně člověka odebrané post mortem.

Výsledky ukazují, že tyto rozdílné metodické přístupy jsou validní a každý má svou výpovědní hodnotu. Molekulární hodiny v periferních strukturách jak v buňkách stěrech, tak v PBMCs, prokazatelně vykazují rytmické oscilace hodinových genů a v našich studiích jsme doložili mírné změny u pacientů ve srovnání se zdravými kontrolami. Je však patrné, že mezi jednotlivci panuje výrazná variabilita v jednotlivých parametrech, a je tedy nutné tato data interpretovat jako výsledek větších souborů dat. Tyto metodiky zatím není vhodné vztahovat k diagnostické interpretaci stavu jednotlivého pacienta. Ukázala jsem také, že hodiny jsou dobře synchronizovatelné i v podmínkách stálého světla, pokud je dodržován pravidelný denní režim. Tento výsledek podporuje i terapeutické postupy zaměřené na udržení pravidelného rytmu jakožto stabilizátoru cirkadiánních rytmů u pacientů s afektivními poruchami, což slouží ke zlepšení stavu pacienta.

Zajímavý vhled do cirkadiánních studií přinášejí analýzy prováděné post mortem. Ty sice uměle zavádějí časové body podle doby úmrtí subjektu a na základě těchto dat popisují denní změny exprese, ale zdá se, že při dostatečném počtu subjektů a dobrém celodenním pokrytí časových bodů jsou jejich výstupy validní. Post mortem práce tak mohou odkrýt i desynchronizaci mezi jednotlivými mozkovými strukturami sledovaných subjektů.

Zdá se, že problematičtější bude u pacientů především zhoršená míra synchronizace cirkadiánního systému mezi jednotlivými strukturami, jejichž rytmy musejí být dobře řízeny centrálními hodinami, aby správně plnily svou funkci.

Novou výzvu pro studie cirkadiánních rytmů rozhodně představují indukované pluripotentní buňky, které by mohly umožnit studium molekulárních cirkadiánních mechanismů v neuronálních buňkách generovaných přímo od konkrétních pacientů a sledovat tak například přímý efekt antideresiv na cirkadiánní parametry neuronů.

Studium cirkadiánního systému člověka bude mít vždy své limity, ale využití komplexního metodického přístupu nám umožňuje odhalit některé jeho důležité aspekty, které mohou vést k lepšímu porozumění systému i léčbě onemocnění souvisejících s narušenou funkcí vnitřních hodin.

## 8. Použitá literatura

- Abrahamson, E. E., & Moore, R. Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research*, 916(1–2), 172–191. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02890-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02890-6)
- Abreu, T., & Bragança, M. (2015). The bipolarity of light and dark: A review on Bipolar Disorder and circadian cycles. *Journal of Affective Disorders*. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.07.017>
- Adli, M., Hollinde, D. L., Stamm, T., Wiethoff, K., Tshauridu, M., Kirchheiner, J., ... Bauer, M. (2007). Response to Lithium Augmentation in Depression is Associated with the Glycogen Synthase Kinase 3-Beta -50T/C Single Nucleotide Polymorphism. *Biological Psychiatry*, 62(11), 1295–1302. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.03.023>
- Akashi, M., Soma, H., Yamamoto, T., Tsugitomi, A., Yamashita, S., Yamamoto, T., ... Node, K. (2010). Noninvasive method for assessing the human circadian clock using hair follicle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), 15643–15648. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003878107>
- Allen, G. C., Qu, X., & Earnest, D. J. (2005). TrkB-deficient mice show diminished phase shifts of the circadian activity rhythm in response to light. *Neuroscience Letters*, 378(3), 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.12.023>
- Alonso-Vale, M. I. C., Andreotti, S., Mukai, P. Y., Borges-Silva, C. das N., Peres, S. B., Cipolla-Neto, J., & Lima, F. B. (2008). Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes. *Journal of Pineal Research*, 45(4), 422–429. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00610.x>
- Alvarez, A., Alarcón, R., Opazo, C., Campos, E. O., Muñoz, F. J., Calderón, F. H., ... Inestrosa, N. C. (1998). Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid-beta peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(9), 3213–3223. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9547230>
- Anderson, K. N., & Shneerson, J. M. (2009). Drug treatment of REM sleep behavior disorder: The use of drug therapies other than clonazepam. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 5(3), 235–239.
- Antunes, L. C., Levandovski, R., Dantas, G., Caumo, W., & Hidalgo, M. P. (2010). Obesity and shift work: Chronobiological aspects. *Nutrition Research Reviews*, 23(1), 155–168. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000016>
- Arendt, J. (2019). Melatonin: Countering Chaotic Time Cues. *Frontiers in Endocrinology*,

10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00391>

- Arendt, T., Brückner, M. K., Morawski, M., Jäger, C., & Gertz, H. J. (2015). Early neurone loss in Alzheimer's disease: cortical or subcortical? *Acta Neuropathologica Communications*, 3(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0187-1>
- Aschoff, J., Fatranská, M., Giedke, H., Doerr, P., Stamm, D., & Wisser, H. (1971). Human circadian rhythms in continuous darkness: Entrainment by social cues. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.171.3967.213>
- Baehr, E. K., Eastman, C. I., Revelle, W., Olson, S. H. L., Wolfe, L. F., & Zee, P. C. (2003). Circadian phase-shifting effects of nocturnal exercise in older compared with young adults. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 284(6), R1542-50. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00761.2002>
- Balsalobre, A., Damiola, F., & Schibler, U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 93(6), 929–937. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81199-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81199-x)
- Beck-Friis, J., Kjellman, B. F., Aperia, B., Unden, F., von Rosen, D., Ljunggren, J. -G, & Wetterberg, L. (1985). Serum melatonin in relation to clinical variables in patients with major depressive disorder and a hypothesis of a low melatonin syndrome. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 71(4), 319–330. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1985.tb02531.x>
- Becker-André, M., Wiesenberg, I., Schaeren-Wiemers, N., André, E., Missbach, M., Saurat, J. H., & Carlberg, C. (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 269(46), 28531–28534. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.26.16707>
- Bellet, M. M., Vawter, M. P., Bunney, B. G., Bunney, W. E., & Sassone-Corsi, P. (2011). Ketamine influences CLOCK:BMAL1 function leading to altered circadian gene expression. *PLoS ONE*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023982>
- Benedetti, F., Dallaspezia, S., Colombo, C., Pirovano, A., Marino, E., & Smeraldi, E. (2008). A length polymorphism in the circadian clock gene Per3 influences age at onset of bipolar disorder. *Neuroscience Letters*, 445(2), 184–187. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.09.002>
- Benedetti, F., Serretti, A., Colombo, C., Barbini, B., Lorenzi, C., Campori, E., & Smeraldi, E. (2003). Influence of CLOCK gene polymorphism on circadian mood fluctuation and illness recurrence in bipolar depression. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 123B(1), 23–26.



<https://doi.org/10.1002/ajmg.b.20038>

- Berry, R. B. (2012). Circadian Rhythm Sleep Disorders. In *Fundamentals of Sleep Medicine* (pp. 515–543). <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0326-9.00026-9>
- Beurel, E., Song, L., & Jope, R. S. (2011, November). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 is necessary for the rapid antidepressant effect of ketamine in mice. *Molecular Psychiatry*, Vol. 16, pp. 1068–1070. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.47>
- Bhatt, M. H., Podder, N., & Chokroverty, S. (2005). Sleep and neurodegenerative diseases. *Semin Neurol*, 25(1), 39–51. <https://doi.org/10.1055/s-2005-867072>
- Bloch, K. E., Brack, T., & Wirz-Justice, A. (2005). Transient short free running circadian rhythm in a case of aneurysm near the suprachiasmatic nuclei. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 76(8), 1178–1180. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2004.059295>
- Boivin, D. B. (2000). Influence of sleep-wake and circadian rhythm disturbances in psychiatric disorders. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 25(5), 446–458.
- Bolitho, S. J., Naismith, S. L., Rajaratnam, S. M. W., Grunstein, R. R., Hodges, J. R., Terpening, Z., ... Lewis, S. J. G. (2014). Disturbances in melatonin secretion and circadian sleep-wake regulation in Parkinson disease. *Sleep Medicine*, 15(3), 342–347. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2013.10.016>
- Borgers, A. J., Romeijn, N., Van Someren, E., Fliers, E., Alkemade, A., & Bisschop, P. H. (2011). Compression of the optic chiasm is associated with permanent shorter sleep duration in patients with pituitary insufficiency. *Clinical Endocrinology*, 75(3), 347–353. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2011.04053.x>
- Boutin, J. A. (2016, March 3). Quinone reductase 2 as a promising target of melatonin therapeutic actions. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, Vol. 20, pp. 303–317. <https://doi.org/10.1517/14728222.2016.1091882>
- Brainard, G. C., Hanifin, J. R., Greeson, J. M., Byrne, B., Glickman, G., Gerner, E., & Rollag, M. D. (2001). Action spectrum for melatonin regulation in humans: Evidence for a novel circadian photoreceptor. *Journal of Neuroscience*, 21(16), 6405–6412. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-16-06405.2001>
- Brancaccio, M., Patton, A. P., Chesham, J. E., Maywood, E. S., & Hastings, M. H. (2017). Astrocytes Control Circadian Timekeeping in the Suprachiasmatic Nucleus via Glutamatergic Signaling. *Neuron*, 93(6), 1420-1435.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.030>
- Breen, D. P., Vuono, R., Nawarathna, U., Fisher, K., Shneerson, J. M., Reddy, A. B., & Barker, R. A. (2014b). Sleep and circadian rhythm regulation in early parkinson disease. *JAMA Neurology*, 71(5), 589–595.

<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.65>

- Brooks, P. L., & Peever, J. H. (2011). Impaired GABA and glycine transmission triggers cardinal features of rapid eye movement sleep behavior disorder in mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(19), 7111–7121. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0347-11.2011>
- Brown, R., Kocsis, J. H., Caroff, S., Amsterdam, J., Winokur, A., Stokes, P. E., & Frazer, A. (1985). Differences in nocturnal melatonin secretion between melancholic depressed patients and control subjects. *American Journal of Psychiatry*, *142*(7), 811–816. <https://doi.org/10.1176/ajp.142.7.811>
- Brown, S. A., Fleury-Olela, F., Nagoshi, E., Hauser, C., Juge, C., Meier, C. A., ... Schibler, U. (2005). The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals. *PLoS Biology*, *3*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030338>
- Burgess, H. J., Revell, V. L., Molina, T. A., & Eastman, C. I. (2010). Human phase response curves to three days of daily melatonin: 0.5 mg Versus 3.0 mg. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *95*(7), 3325–3331. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-2590>
- Buxton, O. M., Lee, C. W., L’Hermite-Baleriaux, M., Turek, F. W., & Van Cauter, E. (2003). Exercise elicits phase shifts and acute alterations of melatonin that vary with circadian phase. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *284*(3), R714-24. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00355.2002>
- Cai, Y., Liu, S., Sothern, R. B., Xu, S., & Chan, P. (2010). Expression of clock genes Per1 and Bmal1 in total leukocytes in health and Parkinson’s disease. *European Journal of Neurology*, *17*(4), 550–554. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2009.02848.x>
- Cameron, M. A., Pozdeyev, N., Vugler, A. A., Cooper, H., Iuvone, P. M., & Lucas, R. J. (2009). Light regulation of retinal dopamine that is independent of melanopsin phototransduction. *European Journal of Neuroscience*, *29*(4), 761–767. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06631.x>
- Caronti, B., Tanda, G., Colosimo, C., Ruggieri, S., Calderaro, C., Palladini, G., ... Chiara, G. Di. (1999). Reduced dopamine in peripheral blood lymphocytes in Parkinson’s disease. *NeuroReport*, *10*(14), 2907–2910. <https://doi.org/10.1097/00001756-199909290-00006>
- Castañeda, T. R., Marquez De Prado, B., Prieto, D., & Mora, F. (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*, *36*(3), 177–185.

<https://doi.org/10.1046/j.1600-079X.2003.00114.x>

- Cermakian, N., Lamont, E. W., Boudreau, P., & Boivin, D. B. (2011). Circadian clock gene expression in brain regions of Alzheimer's disease patients and control subjects. *Journal of Biological Rhythms*, 26(2), 160–170. <https://doi.org/10.1177/0748730410395732>
- Chaudhury, D., Wang, L. M., & Colwell, C. S. (2005). Circadian regulation of hippocampal long-term potentiation. *Journal of Biological Rhythms*, 20(3), 225–236. <https://doi.org/10.1177/0748730405276352>
- Chen, H., Huang, C., You, C., Wang, Z., & Si-qing, H. (2013). Polymorphism of CLOCK gene rs 4580704 C > G is associated with susceptibility of Alzheimer's disease in a Chinese population. *Archives of Medical Research*, 44(3), 203–207. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.01.002>
- Cheng, H.-Y. M., Papp, J. W., Varlamova, O., Dziema, H., Russell, B., Curfman, J. P., ... Obrietan, K. (2007). microRNA Modulation of Circadian-Clock Period and Entrainment. *Neuron*, 54(5), 813–829. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.017>
- Cho, K. (2001). Chronic “jet lag” produces temporal lobe atrophy and spatial cognitive deficits. *Nature Neuroscience*, 4(6), 567–568. <https://doi.org/10.1038/88384>
- Chung, S., Lee, E. J., Yun, S., Choe, H. K., Park, S. B., Son, H. J., ... Kim, K. (2014). Impact of circadian nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  on midbrain dopamine production and mood regulation. *Cell*, 157(4), 858–868. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.039>
- Claustrat, B., Chazot, G., Brun, J., Jordan, D., & Sassolas, G. (1984). A chronobiological study of melatonin and cortisol secretion in depressed subjects: plasma melatonin, a biochemical marker in major depression. *Biological Psychiatry*, 19(8), 1215–1228. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6498244>
- Colombo, C., Benedetti, F., Barbini, B., Campori, E., & Smeraldi, E. (1999). Rate of switch from depression into mania after therapeutic sleep deprivation in bipolar depression. *Psychiatry Research*, 86(3), 267–270. [https://doi.org/10.1016/S0165-1781\(99\)00036-0](https://doi.org/10.1016/S0165-1781(99)00036-0)
- Conti, A., Conconi, S., Hertens, E., Skwarlo-Sonta, K., Markowska, M., & Maestroni, G. J. M. (2000). Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *Journal of Pineal Research*, 28(4), 193–202. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2000.280401.x>
- Crasson, M., Kjiri, S., Colin, A., Kjiri, K., L'Hermite-Baleriaux, M., Anseau, M., & Legros, J. J. (2004). Serum melatonin and urinary 6-sulfatoxymelatonin in major depression. *Psychoneuroendocrinology*, 29(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/S0306->

- Cuesta, M., Cermakian, N., & Boivin, D. B. (2015). Glucocorticoids entrain molecular clock components in human peripheral cells. *FASEB Journal*, *29*(4), 1360–1370. <https://doi.org/10.1096/fj.14-265686>
- Cuesta, M., Mendoza, J., Clesse, D., Pévet, P., & Challet, E. (2008). Serotonergic activation potentiates light resetting of the main circadian clock and alters clock gene expression in a diurnal rodent. *Experimental Neurology*, *210*(2), 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.11.026>
- Damiola, F., Le Minli, 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 and Development*, *14*(23), 2950–2961. <https://doi.org/10.1101/gad.183500>
- Davis, S., & Mirick, D. K. (2006, May). Circadian disruption, shift work and the risk of cancer: A summary of the evidence and studies in Seattle. *Cancer Causes and Control*, Vol. 17, pp. 539–545. <https://doi.org/10.1007/s10552-005-9010-9>
- Dollins, A. B., Zhdanova, I. V., Wurtman, R. J., Lynch, H. J., & Deng, M. H. (1994). Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(5), 1824–1828. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.5.1824>
- Drazen, D. L., Bilu, D., Bilbo, S. D., & Nelson, R. J. (2001). Melatonin enhancement of splenocyte proliferation is attenuated by luzindole, a melatonin receptor antagonist. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *280*(5 49-5). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.280.5.r1476>
- Duffy, J. F., Cain, S. W., Chang, A. M., Phillips, A. J. K., Münch, M. Y., Gronfier, C., ... Czeisler, C. A. (2011). Sex difference in the near-24-hour intrinsic period of the human circadian timing system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(SUPPL. 3), 15602–15608. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010666108>
- Duman, R. S., & Voleti, B. (2012, January). Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: Novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends in Neurosciences*, Vol. 35, pp. 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.11.004>
- Duncan, W. C., Pettigrew, K. D., & Gillin, J. C. (1979). REM architecture changes in bipolar and unipolar depression. *American Journal of Psychiatry*, *136*(11), 1424–1427. <https://doi.org/10.1176/ajp.136.11.1424>

- Duncan, Wallace C, Slonena, E., Hejazi, N. S., Brutsche, N., Yu, K. C., Park, L., ... Zarate, C. A. (2017). Motor-Activity Markers of Circadian Timekeeping Are Related to Ketamine's Rapid Antidepressant Properties. *Biological Psychiatry*, 82(5), 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.03.011>
- Edgar, D. M., Dean, R. R., Dement, W. C., Miller, J. D., & Prosser, R. A. (1993). Serotonin and the Mammalian Circadian System: II. Phase-Shifting Rat Behavioral Rhythms with Serotonergic Agonists. *Journal of Biological Rhythms*, 8(1), 17–31. <https://doi.org/10.1177/074873049300800102>
- Edgar, N., & McClung, C. A. (2013). Major depressive disorder: A loss of circadian synchrony? *BioEssays*, 35(11), 940–944. <https://doi.org/10.1002/bies.201300086>
- Fan, Z., Zhao, M., Joshi, P. D., Li, P., Zhang, Y., Guo, W., ... Yan, J. (2017). A class of circadian long non-coding RNAs mark enhancers modulating long-range circadian gene regulation. *Nucleic Acids Research*, 45(10), 5720–5738. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx156>
- Ferrari, E., Arcaini, A., Gornati, R., Pelanconi, L., Cravello, L., Fioravanti, M., ... Magri, F. (2000). Pineal and pituitary-adrenocortical function in physiological aging and in senile dementia. *Experimental Gerontology*, 35(9–10), 1239–1250. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(00\)00160-1](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(00)00160-1)
- Fountoulakis, K. N., Karamouzis, M., Iacovides, A., Nimatoudis, J., Diakogiannis, J., Kaprinis, G., ... Bech, P. (2001). Morning and evening plasma melatonin and dexamethasone suppression test in patients with nonseasonal major depressive disorder from northern Greece (latitude 40-41.5°). *Neuropsychobiology*, 44(3), 113–117. <https://doi.org/10.1159/000054928>
- Frank, E., Swartz, H. A., & Kupfer, D. J. (2000, September 15). Interpersonal and social rhythm therapy: Managing the chaos of bipolar disorder. *Biological Psychiatry*, Vol. 48, pp. 593–604. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)00969-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)00969-0)
- Gahr, M. (2014). Agomelatine in the treatment of major depressive disorder: an assessment of benefits and risks. *Current Neuropharmacology*, 12(5), 287–398. <https://doi.org/10.2174/1570159X12999140619122914>
- Galbiati, A., Verga, L., Giora, E., Zucconi, M., & Ferini-Strambi, L. (2019, February 1). The risk of neurodegeneration in REM sleep behavior disorder: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Sleep Medicine Reviews*, Vol. 43, pp. 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2018.09.008>
- Gillette, M. U., & McArthur, A. J. (1996). Circadian actions of melatonin at the suprachiasmatic nucleus. *Behavioural Brain Research*, 73(1–2), 135–139. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(96\)00085-x](https://doi.org/10.1016/0166-4328(96)00085-x)

- Gooley, J. J., Lu, J., Chou, T. C., Scammell, T. E., & Saper, C. B. (2001). Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci*, *4*(12), 1165. <https://doi.org/10.1038/nn768>
- Gooley, J. J., Schomer, A., & Saper, C. B. (2006). The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food- entrainable circadian rhythms. *Nature Neuroscience*, *9*(3), 398–407. <https://doi.org/10.1038/nn1651|10.1038/nn1651>
- Gordijn, M. C. M., Beersma, D. G. M., Bouhuys, A. L., Reinink, E., & Van den Hoofdakker, R. H. (1994). A longitudinal study of diurnal mood variation in depression; characteristics and significance. *Journal of Affective Disorders*, *31*(4), 261–273. [https://doi.org/10.1016/0165-0327\(94\)90102-3](https://doi.org/10.1016/0165-0327(94)90102-3)
- Green, C. B., & Besharse, J. C. (2004, April). Retinal Circadian Clocks and Control of Retinal Physiology. *Journal of Biological Rhythms*, Vol. 19, pp. 91–102. <https://doi.org/10.1177/0748730404263002>
- Gros, P., & Videnovic, A. (2020, February 1). Overview of Sleep and Circadian Rhythm Disorders in Parkinson Disease. *Clinics in Geriatric Medicine*, Vol. 36, pp. 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.09.005>
- Gu, Z., Wang, B., Zhang, Y. B., Ding, H., Zhang, Y., Yu, J., ... Cai, Y. (2015). Association of ARNTL and PER1 genes with Parkinson's disease: A case-control study of Han Chinese. *Scientific Reports*, *5*. <https://doi.org/10.1038/srep15891>
- Gusek, W. (1983). Histology of the pineal gland in the elderly human. *Aktuelle Gerontologie*, *13*(3), 111–114. Retrieved from <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med2&AN=6135357>
- Harms, E., Young, M. W., & Saez, L. (2003). CK1 and GSK3 in the Drosophila and mammalian circadian clock. *Novartis Foundation Symposium*, *253*, 267–277; discussion 102-9, 277–284. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14712927>
- Harvey, A. G. (2008, July). Sleep and circadian rhythms in bipolar disorder: Seeking synchrony, harmony, and regulation. *American Journal of Psychiatry*, Vol. 165, pp. 820–829. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2008.08010098>
- Hastings, M. H., Maywood, E. S., & Brancaccio, M. (2018, August 1). Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nature Reviews Neuroscience*, Vol. 19, pp. 453–469. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0026-z>
- Hastings, M. H., Maywood, E. S., & Brancaccio, M. (2019, March 1). The mammalian circadian timing system and the suprachiasmatic nucleus as its pacemaker. *Biology*, Vol. 8. <https://doi.org/10.3390/biology8010013>

- Hastings, M. H., Reddy, A. B., & Maywood, E. S. (2003). A clockwork web: Circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(8), 649–661. <https://doi.org/10.1038/nrn1177>
- Hatfield, C. F., Herbert, J., Van Someren, E. J. W., Hodges, J. R., & Hastings, M. H. (2004, May). Disrupted daily activity/rest cycles in relation to daily cortisol rhythms of home-dwelling patients with early Alzheimer's dementia. *Brain*, Vol. 127, pp. 1061–1074. <https://doi.org/10.1093/brain/awh129>
- Hermansson, J., Bøggild, H., Hallqvist, J., Karlsson, B., Knutsson, A., Nilsson, T., ... Gillander Gådin, K. (2019). Interaction between Shift Work and Established Coronary Risk Factors. *The International Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 10(2), 57–65. <https://doi.org/10.15171/ijoem.2019.1466>
- Hooghiemstra, A. M., Eggermont, L. H. P., Scheltens, P., Van Der Flier, W. M., & Scherder, E. J. A. (2015). The rest-activity rhythm and physical activity in early-onset dementia. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 29(1), 45–49. <https://doi.org/10.1097/WAD.0000000000000037>
- Hori, H., Koga, N., Hidese, S., Nagashima, A., Kim, Y., Higuchi, T., & Kunugi, H. (2016). 24-h activity rhythm and sleep in depressed outpatients. *Journal of Psychiatric Research*, 77, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.02.022>
- Hou, L., Heilbronner, U., Degenhardt, F., Adli, M., Akiyama, K., Akula, N., ... Schulze, T. G. (2016). Genetic variants associated with response to lithium treatment in bipolar disorder: A genome-wide association study. *The Lancet*, 387(10023), 1085–1093. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00143-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00143-4)
- Hut, R. A., Mrosovsky, N., & Daan, S. (1999). Nonphotic entrainment in a diurnal mammal, the European ground squirrel (*Spermophilus citellus*). *Journal of Biological Rhythms*, 14(5), 409–419. <https://doi.org/10.1177/074873099129000812>
- Iitaka, C., Miyazaki, K., Akaike, T., & Ishida, N. (2005a). A role for glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in the mammalian circadian clock. *Journal of Biological Chemistry*, 280(33), 29397–29402. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503526200>
- Illnerova, H., Backström, M., Sääf, J., Wetterberg, L., & Vangbo, B. (1978). Melatonin in rat pineal gland and serum; rapid parallel decline after light exposure at night. *Neuroscience Letters*, 9(2–3), 189–193. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(78\)90070-8](https://doi.org/10.1016/0304-3940(78)90070-8)
- Illnerova, H., & Vanecek, J. (1984). Circadian-rhythm in inducibility of rat pineal N-acetyltransferase after brief light-pulses at night - control by a morning oscillator. *Journal of Comparative Physiology*, 154(5), 739–744. <https://doi.org/10.1007/BF01350227>

- Imbesi, M., Yildiz, S., Dirim Arslan, A., Sharma, R., Manev, H., & Uz, T. (2009). Dopamine receptor-mediated regulation of neuronal “clock” gene expression. *Neuroscience*, *158*(2), 537–544. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.10.044>
- Inder, M. L., Crowe, M. T., & Porter, R. (2016). Effect of transmeridian travel and jetlag on mood disorders: evidence and implications. *The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, *50*(3), 220–227. <https://doi.org/10.1177/0004867415598844>
- Jagannath, A., Butler, R., Godinho, S. I. H., Couch, Y., Brown, L. A., Vasudevan, S. R., ... Peirson, S. N. (2013). The CRTC1-SIK1 pathway regulates entrainment of the circadian clock. *Cell*, *154*(5), 1100–1111. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.004>
- Johnsson, A., Engelmann, W., Pflug, B., & Klemke, W. (1983). Period lengthening of human circadian rhythms by lithium carbonate, a prophylactic for depressive disorders. *International Journal of Chronobiology*, *8*(3), 129–147. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6862696>
- Kas, M. J., & Edgar, D. M. (1999). A nonphotic stimulus inverts the diurnal-nocturnal phase preference in *Octodon degus*. *J Neurosci*, *19*(1), 328–333. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9870962>
- Katz, G., Knobler, H. Y., Laibel, Z., Strauss, Z., & Durst, R. (2002). Time zone change and major psychiatric morbidity: The results of a 6-year study in Jerusalem. *Comprehensive Psychiatry*, *43*(1), 37–40. <https://doi.org/10.1053/comp.2002.29849>
- Kawarai, T., Kawakami, H., Yamamura, Y., & Nakamura, S. (1997). Structure and organization of the gene encoding human dopamine transporter. *Gene*, *195*(1), 11–18. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00131-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00131-5)
- Kennaway, D. J., & 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*, *260*(6), R1137–R1144. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1991.260.6.r1137>
- Kennedy, S. H., Kutcher, S. P., Ralevski, E., & Brown, G. M. (1996). Nocturnal melatonin and 24-hour 6-sulphatoxymelatonin levels in various phases of bipolar affective disorder. *Psychiatry Research*, *63*(2–3), 219–222. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(96\)02910-1](https://doi.org/10.1016/0165-1781(96)02910-1)
- Kenneth J. Livaka; Schmittgenb, & Thomas. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
- Kervezee, L., Cuesta, M., Cermakian, N., & Boivin, D. B. (2018). Simulated night shift work induces circadian misalignment of the human peripheral blood mononuclear cell transcriptome. *PNAS*, *115*(21), 5540–5545. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720719115>



- Klein, D. C., & Moore, R. Y. (1979). Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyl-transferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, *174*(2), 245–262. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90848-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90848-5)
- Klerman, E. B., Rimmer, D. W., Dijk, D. J., Kronauer, R. E., Rizzo, J. F., & Czeisler, C. A. (1998). Nonphotic entrainment of the human circadian pacemaker. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *274*(4 43-4). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.274.4.r991>
- Konturek, S. J., Konturek, P. C., Brzozowski, T., & Bubenik, G. A. (2007). Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society*, *58 Suppl 6*, 23–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18212399>
- Koshy, A., Cuesta, M., Boudreau, P., Cermakian, N., & Boivin, D. B. (2019). Disruption of central and peripheral circadian clocks in police officers working at night. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *33*(6), 6789–6800. <https://doi.org/10.1096/fj.201801889R>
- Kripke, D. F., Mullaney, D. J., Atkinson, M., & Wolf, S. (1978). Circadian rhythm disorders in manic-depressives. *Biological Psychiatry*, *13*(3), 335–351. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/667233>
- La Morgia, C., Ross-Cisneros, F. N., Koronyo, Y., Hannibal, J., Gallassi, R., Cantalupo, G., ... Carelli, V. (2016). Melanopsin retinal ganglion cell loss in Alzheimer disease. *Annals of Neurology*, *79*(1), 90–109. <https://doi.org/10.1002/ana.24548>
- Lam, R. W., Levitt, A. J., Levitan, R. D., Michalak, E. E., Cheung, A. H., Morehouse, R., ... Tam, E. M. (2016). Efficacy of Bright Light Treatment, Fluoxetine, and the Combination in Patients With Nonseasonal Major Depressive Disorder: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Psychiatry*, *73*(1), 56–63. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2015.2235>
- Landgraf, D., Joiner, W. J., McCarthy, M. J., Kiessling, S., Barandas, R., Young, J. W., ... Welsh, D. K. (2016). The mood stabilizer valproic acid opposes the effects of dopamine on circadian rhythms. *Neuropharmacology*, *107*, 262–270. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.047>
- Leak, R. K., Card, J. P., & Moore, R. Y. (1999). Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Research*, *819*(1–2), 23–32. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)01317-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)01317-1)
- Lee, H., Chen, R., Lee, Y., Yoo, S., & Lee, C. (2009). Essential roles of CKI $\delta$  and CKI $\epsilon$  in the mammalian circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

- of the United States of America*, 106(50), 21359–21364.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0906651106>
- Lee, K. Y., Song, J. Y., Kim, S. H., Kim, S. C., Joo, E. J., Ahn, Y. M., & Kim, Y. S. (2010). Association between CLOCK 3111T/C and preferred circadian phase in Korean patients with bipolar disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(7), 1196–1201.  
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.06.010>
- Leibenluft, E., & Suppes, T. (1999). Treating bipolar illness: focus on treatment algorithms and management of the sleep-wake cycle. *The American Journal of Psychiatry*, 156(12), 1976–1981. <https://doi.org/10.1176/ajp.156.12.1976>
- Leproult, R., Van Onderbergen, A., L’Hermite-Balériaux, M., Van Cauter, E., & Copinschi, G. (2005). Phase-shifts of 24-h rhythms of hormonal release and body temperature following early evening administration of the melatonin agonist agomelatine in healthy older men. *Clinical Endocrinology*, 63(3), 298–304.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2005.02341.x>
- 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.  
<https://doi.org/10.1126/science.7434030>
- Li, J., Lu, W. Q., Beesley, S., Loudon, A. S. I., & Meng, Q. J. (2012). Lithium impacts on the amplitude and period of the molecular circadian clockwork. *PLoS ONE*, 7(3).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033292>
- Li, J. Z., Bunney, B. G., Meng, F., Hagenauer, M. H., Walsh, D. M., Vawter, M. P., ... 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 of the United States of America*, 110(24), 9950–9955.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1305814110>
- Liang, F. Q., Allen, G., & Earnest, D. (2000). Role of brain-derived neurotrophic factor in the circadian regulation of the suprachiasmatic pacemaker by light. *Journal of Neuroscience*, 20(8), 2978–2987. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-08-02978.2000>
- Liguori, C., Romigi, A., Nuccetelli, M., Zannino, S., Sancesario, G., Martorana, A., ... Placidi, F. (2014). Orexinergic system dysregulation, sleep impairment, and cognitive decline in Alzheimer disease. *JAMA Neurology*, 71(12), 1498–1505.  
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.2510>
- Liu, A. C., Welsh, D. K., Ko, C. H., Tran, H. G., Zhang, E. E., Priest, A. A., ... Kay, S. A. (2007). Intercellular Coupling Confers Robustness against Mutations in the SCN

- Circadian Clock Network. *Cell*, 129(3), 605–616.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.047>
- Liu, R.-Y., Zhou, J.-N., van Heerikhuize, J., Hofman, M. A., & Swaab, D. F. (1999). Decreased Melatonin Levels in Postmortem Cerebrospinal Fluid in Relation to Aging, Alzheimer's Disease, and Apolipoprotein E-ε4/4 Genotype 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(1), 323–327.  
<https://doi.org/10.1210/jcem.84.1.5394>
- Lockley, S. W., Arendt, J., & Skene, D. J. (2007). Visual impairment and circadian rhythm disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 9(3), 301–314.
- Logan, R. W., & McClung, C. A. (2019, January 1). Rhythms of life: circadian disruption and brain disorders across the lifespan. *Nature Reviews Neuroscience*, Vol. 20, pp. 49–65. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0088-y>
- Logan, R. W., Parekh, P. K., Kaplan, G. N., Becker-Krail, D. D., Williams, W. P., Yamaguchi, S., ... McClung, C. A. (2019). NAD<sup>+</sup> cellular redox and SIRT1 regulate the diurnal rhythms of tyrosine hydroxylase and conditioned cocaine reward. *Molecular Psychiatry*, 24(11), 1668–1684. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0061-1>
- Lucas, R. J., Peirson, S. N., Berson, D. M., Brown, T. M., Cooper, H. M., Czeisler, C. A., ... Brainard, G. C. (2014, January). Measuring and using light in the melanopsin age. *Trends in Neurosciences*, Vol. 37, pp. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.10.004>
- Masson-Pevet, M., & Gauer, F. (1994). Seasonality and melatonin receptors in the pars tuberalis in some long day breeders. *Biological Signals*, 3(2), 63–70.  
<https://doi.org/10.1159/000109527>
- Matsubara, E., Bryant-Thomas, T., Pacheco Quinto, J., Henry, T. L., Poeggeler, B., Herbert, D., ... Neria, E. (2003). Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 85(5), 1101–1108. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01654.x>
- McCarter, S. J., Boswell, C. L., St Louis, E. K., Dueffert, L. G., Slocumb, N., Boeve, B. F., ... Tippmann-Peikert, M. (2013). Treatment outcomes in REM sleep behavior disorder. *Sleep Medicine*, 14(3), 237–242.  
<https://doi.org/10.1016/j.sleep.2012.09.018>
- Mccarthy, M. J., Nievergelt, C. M., Shekhtman, T., Kripke, D. F., Welsh, D. K., & Kelsoe, J. R. (2011). Functional genetic variation in the Rev-Erbα pathway and lithium response in the treatment of bipolar disorder. *Genes, Brain and Behavior*, 10(8), 852–861. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2011.00725.x>

- 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. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.90>
- McCarthy, Michael J., Wei, H., Nievergelt, C. M., Stautland, A., Maihofer, A. X., Welsh, D. K., ... Kelsoe, J. R. (2019). Chronotype and cellular circadian rhythms predict the clinical response to lithium maintenance treatment in patients with bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*, 44(3), 620–628. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0273-8>
- McCarthy, Michael J., & Welsh, D. K. (2012). Cellular circadian clocks in mood disorders. *Journal of Biological Rhythms*, 27(5), 339–352. <https://doi.org/10.1177/0748730412456367>
- McClung, C. A. (2007, May). Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders. *Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 114, pp. 222–232. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.02.003>
- McClung, C. A., Sidiropoulou, K., Vitaterna, M., Takahashi, J. S., White, F. J., Cooper, D. C., & Nestler, E. J. (2005). Regulation of dopaminergic transmission and cocaine reward by the Clock gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), 9377–9381. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503584102>
- McGlashan, E. M., Nandam, L. S., Vidafar, P., Mansfield, D. R., Rajaratnam, S. M. W., & Cain, S. W. (2018). The SSRI citalopram increases the sensitivity of the human circadian system to light in an acute dose. *Psychopharmacology*, 235(11), 3201–3209. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5019-0>
- McGrane, I. R., Leung, J. G., St. Louis, E. K., & Boeve, B. F. (2015, January 1). Melatonin therapy for REM sleep behavior disorder: A critical review of evidence. *Sleep Medicine*, Vol. 16, pp. 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2014.09.011>
- Michelon, L., Meira-Lima, I., Cordeiro, Q., Miguita, K., Breen, G., Collier, D., & Vallada, H. (2006). Association study of the INPP1, 5HTT, BDNF, AP-2beta and GSK-3beta GENE variants and retrospectively scored response to lithium prophylaxis in bipolar disorder. *Neuroscience Letters*, 403(3), 288–293. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.05.001>
- Middleton, B., Arendt, J., & Stone, B. M. (1996). Human circadian rhythms in constant dim light (8 lux) with knowledge of clock time. *Journal of Sleep Research*, 5(2), 69–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8795806>
- Mistlberger, R. E., & Skene, D. J. (2005). Nonphotic entrainment in humans? *Journal of*

- Biological Rhythms*, 20(4), 339–352. <https://doi.org/10.1177/0748730405277982>
- Moon, J. H., Cho, C. H., Son, G. H., Geum, D., Chung, S., Kim, H., ... Lee, H. J. (2016). Advanced Circadian Phase in Mania and Delayed Circadian Phase in Mixed Mania and Depression Returned to Normal after Treatment of Bipolar Disorder. *EBioMedicine*, 11, 285–295. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.08.019>
- Moore, R. Y., & Speh, J. C. (2004). Serotonin innervation of the primate suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, 1010(1–2), 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.02.024>
- Morin, L. P. (2013, May). Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. *Experimental Neurology*, Vol. 243, pp. 4–20. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.026>
- Mrosovsky, N. (1988). Phase response curves for social entrainment. *Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 162(1), 35–46. <https://doi.org/10.1007/bf01342701>
- Mrosovsky, N. (1995). A non-photoc gateway to the circadian clock of hamsters. *Ciba Foundation Symposium*, 183, 154–167; discussion 167–74. <https://doi.org/10.1002/9780470514597.ch9>
- Müller, M. J., Kundermann, B., & Cabanel, N. (2016). Eveningness and poor sleep quality independently contribute to self-reported depression severity in psychiatric inpatients with affective disorder. *Nordic Journal of Psychiatry*, 70(5), 329–334. <https://doi.org/10.3109/08039488.2015.1112832>
- Murray, J. M., Sletten, T. L., Magee, M., Gordon, C., Lovato, N., Bartlett, D. J., ... Rajaratnam, M. W. (2017). Prevalence of Circadian Misalignment and Its Association With Depressive Symptoms in Delayed Sleep Phase Disorder. *Circadian Misalignment*, 40(1). <https://doi.org/10.1093/sleep/zsw002>
- Musiek, E. S., Bhimasani, M., Zangrilli, M. A., Morris, J. C., Holtzman, D. M., & Ju, Y. E. S. (2018). Circadian rest-activity pattern changes in aging and preclinical Alzheimer disease. *JAMA Neurology*, 75(5), 582–590. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.4719>
- Naismith, S. L., Hickie, I. B., Terpening, Z., Rajaratnam, S. M., Rajaratnam, S. W., Hodges, J. R., ... Lewis, S. J. G. (2014). Circadian misalignment and sleep disruption in mild cognitive impairment. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 38(4), 857–866. <https://doi.org/10.3233/JAD-131217>
- Nomura, K., Castanon-Cervantes, O., Davidson, A., & Fukuhara, C. (2008). Selective serotonin reuptake inhibitors and raft inhibitors shorten the period of Period1-driven circadian bioluminescence rhythms in rat-1 fibroblasts. *Life Sciences*, 82(23–24),

1169–1174. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.03.024>

- Nováková, M., Praško, J., Látalová, K., Sládek, M., & Sumová, A. (2015). The circadian system of patients with bipolar disorder differs in episodes of mania and depression. *Bipolar Disorders*, *17*(3), 303–314. <https://doi.org/10.1111/bdi.12270>
- Nurnberger Jr, J. I., Adkins, S., Lahiri, D. K., Mayeda, A., Hu, K., Lewy, A., ... Davis-Singh, D. (2000). Melatonin Suppression by Light in Euthymic Bipolar and Unipolar Patients. *JAMA Psychiatry*, *57*(6), 572–579. <https://doi.org/10-1001/pubs.Arch Gen Psychiatry-ISSN-0003-990x-57-6-yoa8198>
- Ohayon, M. M., & Roth, T. (2003). Place of chronic insomnia in the course of depressive and anxiety disorders. *Journal of Psychiatric Research*, *37*(1), 9–15. [https://doi.org/10.1016/S0022-3956\(02\)00052-3](https://doi.org/10.1016/S0022-3956(02)00052-3)
- Ortiz-Tudela, E., Martinez-Nicolas, A., Díaz-Mardomingo, C., García-Herranz, S., Pereda-Pérez, I., Valencia, A., ... Rol, M. A. (2014). The characterization of biological rhythms in mild cognitive impairment. *BioMed Research International*, *2014*, 524971. <https://doi.org/10.1155/2014/524971>
- Oster, H., Challet, E., Ott, V., Arvat, E., de Kloet, E. R., Dijk, D.-J., ... Van Cauter, E. (2017). The Functional and Clinical Significance of the 24-Hour Rhythm of Circulating Glucocorticoids. *Endocrine Reviews*, *38*(1), 3–45. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1080>
- Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., ... Hogenesch, J. B. (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, *109*(3), 307–320. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00722-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00722-5)
- Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., Spence, D. W., Srinivasan, V., Dagan, Y., & Cardinali, D. P. (2008). The roles of melatonin and light in the pathophysiology and treatment of circadian rhythm sleep disorders. *Nature Clinical Practice Neurology*, Vol. 4, pp. 436–447. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0847>
- Parekh, P. K., Ozburn, A. R., & McClung, C. A. (2015, June 1). Circadian clock genes: Effects on dopamine, reward and addiction. *Alcohol*, Vol. 49, pp. 341–349. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.09.034>
- Paul, M. A., Love, R. J., Hawton, A., Brett, K., McCreary, D. R., & Arendt, J. (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), 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2014.12.012>
- Paulose, J. K., & Cassone, V. M. (2016). The melatonin-sensitive circadian clock of the enteric bacterium *Enterobacter aerogenes*. *Gut Microbes*, *7*(5), 424–427.

<https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1208892>

- Phillips, A. J. K., Vidafar, P., Burns, A. C., McGlashan, E. M., Anderson, C., Rajaratnam, S. M. W., ... Cain, S. W. (2019). High sensitivity and interindividual variability in the response of the human circadian system to evening light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(24), 12019–12024. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901824116>
- Posener, J. A., DeBattista, C., Williams, G. H., Kraemer, H. C., Kalehzan, B. M., & Schatzberg, A. F. (2000). 24-Hour monitoring of cortisol and corticotropin secretion in psychotic and nonpsychotic major depression. *Archives of General Psychiatry*, *57*(8), 755–760. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.57.8.755>
- Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C., & Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, *247*(4945), 975–978. <https://doi.org/10.1126/science.2305266>
- Reebs, S. G., & Mrosovsky, N. (1989). Effects of Induced Wheel Running on the Circadian Activity Rhythms of Syrian Hamsters: Entrainment and Phase Response Curve. *Journal of Biological Rhythms*, *4*(1), 39–48. <https://doi.org/10.1177/074873048900400103>
- Reick, M., Garcia, J. A., Dudley, C., & McKnight, S. L. (2001). NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science (New York, N.Y.)*, *293*(5529), 506–509. <https://doi.org/10.1126/science.1060699>
- Rey, G., Cesbron, F., Rougemont, J., Reinke, H., Brunner, M., & Naef, F. (2011). Genome-wide and phase-specific DNA-binding rhythms of BMAL1 control circadian output functions in mouse liver. *PLoS Biology*, *9*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000595>
- Robillard, R., Naismith, S. L., Rogers, N. L., Scott, E. M., Ip, T. K. C., Hermens, D. F., & Hickie, I. B. (2013). Sleep-Wake cycle and melatonin rhythms in adolescents and young adults with mood disorders: Comparison of unipolar and bipolar phenotypes. *European Psychiatry*, *28*(7), 412–416. <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2013.04.001>
- Roybal, K., Theobald, D., Graham, A., DiNieri, J. A., Russo, S. J., Krishnan, V., ... McClung, C. A. (2007). Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(15), 6406–6411. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609625104>
- Ruan, G. X., Allen, G. C., Yamazaki, S., & McMahan, D. G. (2008). An autonomous circadian clock in the inner mouse retina regulated by dopamine and GABA. *PLoS Biology*, *6*(10), 2248–2265. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060249>
- Sack, R. L., Blood, M. L., Hughes, R. J., & Lewy, A. J. (1998). Circadian-rhythm sleep

- disorders in persons who are totally blind. *Journal of Visual Impairment and Blindness*, 92(3), 145–161. <https://doi.org/10.1177/0145482x9809200303>
- Sakamoto, K., Liu, C., Kasamatsu, M., Pozdeyev, N. V., Iuvone, P. M., & Tosini, G. (2005). Dopamine regulates melanopsin mRNA expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *European Journal of Neuroscience*, 22(12), 3129–3136. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04512.x>
- Saper, C. B., Cano, G., & Scammell, T. E. (2005). Homeostatic, circadian, and emotional regulation of sleep. *J Comp Neurol*, 493(1), 92–98. <https://doi.org/10.1002/cne.20770>
- Sato, T. K., Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., McNamara, P., ... Hogenesch, J. B. (2004). A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, 43(4), 527–537. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.07.018>
- Shi, C., Zeng, J., Li, Z., Chen, Q., Hang, W., Xia, L., ... Shi, A. (2018). Melatonin mitigates kainic acid-induced neuronal tau hyperphosphorylation and memory deficits through alleviating ER stress. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00005>
- Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., ... Okamura, H. (1997). Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell*, 91(7), 1043–1053. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80494-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80494-8)
- Siwicki, K. K., Hardin, P. E., & Price, J. L. (2018, June 1). Reflections on contributing to “big discoveries” about the fly clock: Our fortunate paths as post-docs with 2017 Nobel laureates Jeff Hall, Michael Rosbash, and Mike Young. *Neurobiology of Sleep and Circadian Rhythms*, Vol. 5, pp. 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.nbscr.2018.02.004>
- Skene, D. J., & Swaab, D. F. (2003). Melatonin rhythmicity: Effect of age and Alzheimer’s disease. *Experimental Gerontology*, 38(1–2), 199–206. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(02\)00198-5](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(02)00198-5)
- Šonka, prof. (2014). Porucha chování v REM spánku - nozologická jednotka s velkým významem pro neurologii. *Neurologie pro Praxi*, 15(4), 189–191.
- Soria, V., Martínez-Amorós, È., Escaramís, G., Valero, J., Pérez-Egea, R., García, C., ... Urretavizcaya, M. (2010). Differential association of circadian genes with mood disorders: CRY1 and NPAS2 are associated with unipolar major depression and clock and VIP with bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*, 35(6), 1279–1289. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.230>



- Sou tre, E., Salvati, E., Belugou, J. L., Pringuey, D., Candito, M., Krebs, B., ... Darcourt, G. (1989). Circadian rhythms in depression and recovery: Evidence for blunted amplitude as the main chronobiological abnormality. *Psychiatry Research*, *28*(3), 263–278. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(89\)90207-2](https://doi.org/10.1016/0165-1781(89)90207-2)
- Sprouse, J., Braselton, J., & Reynolds, L. (2006). Fluoxetine modulates the circadian biological clock via phase advances of suprachiasmatic nucleus neuronal firing. *Biological Psychiatry*, *60*(8), 896–899. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.03.003>
- Stephan, F. K. (2002). The “other” circadian system: Food as a zeitgeber. *Journal of Biological Rhythms*, *17*(4), 284–292. <https://doi.org/10.1177/074873002129002591>
- Stephan, Friedrich K. (2002). The “other” circadian system: food as a Zeitgeber. *Journal of Biological Rhythms*, *17*(4), 284–292. <https://doi.org/10.1177/074873040201700402>
- Stokkan, K. A., & Reiter, R. J. (1994). Melatonin rhythms in Arctic urban residents. *Journal of Pineal Research*, *16*(1), 33–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8158521>
- Stopa, E. G., Volicer, L., Kuo-Leblanc, V., Harper, D., Lathi, D., Tate, B., & Satlin, A. (1999). Pathologic evaluation of the human suprachiasmatic nucleus in severe dementia. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *58*(1), 29–39. <https://doi.org/10.1097/00005072-199901000-00004>
- Sumova, A., Maywood, E. S., Selvage, D., Ebling, F. J. P., & Hastings, M. H. (1996). Serotonergic antagonists impair arousal-induced phase shifts of the circadian system of the Syrian hamster. *Brain Research*, *709*(1), 88–96. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01314-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01314-8)
- Suofu, Y., Li, W., Jean-Alphonse, F. G., Jia, J., Khattar, N. K., Li, J., ... Friedlander, R. M. (2017). Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(38), E7997–E8006. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705768114>
- Swaab, D. F., Fliers, E., & Partiman, T. S. (1985). The suprachiasmatic nucleus of the human brain in relation to sex, age and senile dementia. *Brain Research*, *342*(1), 37–44. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)91350-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)91350-2)
- Terman, J. S., & Terman, M. (1999). Photopic and scotopic light detection in patients with seasonal affective disorder and control subjects. *Biological Psychiatry*, *46*(12), 1642–1648. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10624545>
- Tosini, G., & Menaker, M. (1996). Circadian rhythms in cultured mammalian retina.

- Science* (New York, N.Y.), 272(5260), 419–421.  
<https://doi.org/10.1126/science.272.5260.419>
- Tranah, G. J., Blackwell, T., Stone, K. L., Ancoli-Israel, S., Paudel, M. L., Ensrud, K. E., ... SOF Research Group. (2011). Circadian activity rhythms and risk of incident dementia and mild cognitive impairment in older women. *Annals of Neurology*, 70(5), 722–732. <https://doi.org/10.1002/ana.22468>
- Travnickova-Bendova, 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.102075599>
- Valenzuela, F. J., Torres-Farfan, C., Richter, H. G., Mendez, N., Campino, C., Torrealba, F., ... Serón-Ferré, M. (2008). Clock gene expression in adult primate suprachiasmatic nuclei and adrenal: Is the adrenal a peripheral clock responsive to melatonin? *Endocrinology*, 149(4), 1454–1461. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1518>
- van Enkhuizen, J., Minassian, A., & Young, J. W. (2013). Further evidence for Clock $\delta$ 19 mice as a model for bipolar disorder mania using cross-species tests of exploration and sensorimotor gating. *Behavioural Brain Research*, 249, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.04.023>
- Van Hook, M. J., Wong, K. Y., & Berson, D. M. (2012). Dopaminergic modulation of ganglion-cell photoreceptors in rat. *European Journal of Neuroscience*, 35(3–4), 507–518. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07975.x>
- van Oosterhout, F., Lucassen, E. A., Houben, T., vanderLeest, H. T., Antle, M. C., & Meijer, J. H. (2012). Amplitude of the SCN clock enhanced by the behavioral activity rhythm. *PloS One*, 7(6), e39693. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039693>
- Van Someren, E. J. W., Lijzenga, C., Mirmiran, M., & Swaab, D. F. (1997). Long-Term Fitness Training Improves the Circadian Rest-Activity Rhythm in Healthy Elderly Males. *Journal of Biological Rhythms*, 12(2), 146–156. <https://doi.org/10.1177/074873049701200206>
- Wams, E. J., Riede, S. J., van der Laan, I., ten Bulte, T., & Hut, R. A. (2017). Mechanisms of Non-photoc Entrainment. In *Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour* (pp. 395–404). [https://doi.org/10.1007/978-81-322-3688-7\\_18](https://doi.org/10.1007/978-81-322-3688-7_18)
- Wang, J. L., Lim, A. S., Chiang, W. Y., Hsieh, W. H., Lo, M. T., Schneider, J. A., ... Saper, C. B. (2015a). Suprachiasmatic neuron numbers and rest-activity circadian rhythms in older humans. *Annals of Neurology*, 78(2), 317–322.

<https://doi.org/10.1002/ana.24432>

- Wehr, T. A. (2018). Bipolar mood cycles associated with lunar entrainment of a circadian rhythm. *Translational Psychiatry*, *8*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0203-x>
- Wehr, T. A., Wirz-Justice, A., Goodwin, F. K., Duncan, W., & Christian Gillin, J. (1979). Phase advance of the circadian sleep-wake cycle as an antidepressant. *Science*, *206*(4419), 710–713. <https://doi.org/10.1126/science.227056>
- Weissová, K., Bartoš, A., Sládek, M., Nováková, M., & Sumová, A. (2016). Moderate changes in the circadian system of Alzheimer's disease patients detected in their home environment. *PLoS ONE*, *11*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146200>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90214-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90214-7)
- Wever, R. (1975). The circadian multi-oscillatory system of man. *International Journal of Chronobiology*, *3*(1), 19–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1193771>
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., ... Tei, H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, *288*(5466), 682–685.
- Yang, J., Jin, H. J., Mocaër, E., Seguin, L., Zhao, H., & Rusak, B. (2016). Agomelatine affects rat suprachiasmatic nucleus neurons via melatonin and serotonin receptors. *Life Sciences*, *155*, 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.04.035>
- Yang, S., Van Dongen, H. P. A., Wang, K., Berrettini, W., & Bućan, M. (2009). Assessment of circadian function in fibroblasts of patients with bipolar disorder. *Molecular Psychiatry*, *14*(2), 143–155. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.10>
- Yin, L., Wang, J., Klein, P. S., & Lazar, M. A. (2006). Nuclear receptor Rev-erb $\alpha$  is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock. *Science*, *311*(5763), 1002–1005. <https://doi.org/10.1126/science.1121613>
- Yoneyama, S., Hashimoto, S., & Honma, K. (2017). Seasonal changes of human circadian rhythms in Antarctica. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *277*(4), R1091–R1097. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.277.4.r1091>
- Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., ... Takahashi, J. S. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15), 5339–5346. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308709101>
- Yoshikawa, T., & Honma, S. (2016). Lithium lengthens circadian period of cultured brain slices in area specific manner. *Behavioural Brain Research*, 314, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.07.045>
- Yu, H. S., Pang, S. F., & Tang, P. L. (1981). Increase in the level of retinal melatonin and persistence of its diurnal rhythm in rats after pinealectomy. *Journal of Endocrinology*, 91(3), 477–481. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0910477>
- Zeman, M., & Herichova, I. (2013). Melatonin and clock genes expression in the cardiovascular system. *Frontiers in Bioscience - Scholar*, 5 S(2), 743–753. <https://doi.org/10.2741/s404>
- 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*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408886111>
- Zhou, J. N., Hofman, M. A., & Swaab, D. F. (1995). VIP neurons in the human SCN in relation to sex, age, and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 16(4), 571–576. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(95\)00043-E](https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)00043-E)
- Zhou, J. N., Liu, R. Y., Kamphorst, W., Hofman, M. A., & Swaab, D. F. (2003). Early neuropathological Alzheimer's changes in aged individuals are accompanied by decreased cerebrospinal fluid melatonin levels. *Journal of Pineal Research*, 35(2), 125–130. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2003.00065.x>

## 9. Seznam příložených publikací

### Publikace *in extenso*, které jsou podkladem této dizertační práce

1. WEISSOVÁ, K., KOPŘIVOVÁ, J., ŠÓŠ, P., BENDO VÁ, 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., BENDO VÁ, Z., MILETÍNOVÁ, E., KOPŘIVOVÁ, J., 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., BENDO VÁ 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 *in extenso*, 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., BENDO VÁ, Z. Ranní ptáče dál doskáče... Ale co sovy?. In: Horáček, J., Kesner, L., Höschl, C., Španiel, F. Mozek a jeho člověk, mysl a její nemoc. Praha: Galén, 2016, s. 146-152. ISBN: 978-80-7492-283-1.