

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Jessica Nováková

Cirkadiánní regulace kardiovaskulárního systému
Circadian regulation of the cardiovascular system

Bakalářská práce

Školitelka: doc. RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

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

V Praze, 2. 5. 2022

Podpis:

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce doc. RNDr. Zdeňce Bendové, PhD., za milý přístup, ochotu, čas, trpělivost, motivaci a podporu při psaní mé bakalářské práce.

Abstrakt

Cirkadiánní systém se skládá z hlavního cirkadiánního oscilátoru a periferních oscilátorů, jež umožňují organismům přizpůsobovat se střídajícím se podmínkám vnějšího prostředí. Řídí rytmickou expresi genů téměř ve všech buňkách těla, čímž ovlivňuje fyziologické a behaviorální procesy savců a ostatních živočichů. Práce shrnuje poznatky z experimentů, které vedly k prokázání cirkadiánní rytmicity v kardiovaskulárním systému. Nejprve jsou zmíněny první objevy, následně se práce zaměřuje na cirkadiánní rytmicitu v kardiomyocytech, ve vaskulárních endoteliálních buňkách a buňkách hladké svaloviny cév. Je zde zmíněna role transkripčního faktoru Krüppel-like factor 15. Z uvedených informací vyplývá, že cirkadiánní regulace kardiovaskulárního systému je důležitá pro správnou funkci srdce a cév. Při narušení cirkadiánních rytmů dochází k patofyziologickým stavům a kardiovaskulárním nemocem jako je hypertrofie srdce, hypertenze, ateroskleróza, infarkt myokardu či ischemická choroba srdeční.

Klíčová slova: cirkadiánní, hodinové geny, kardiovaskulární systém, kardiomyocyty, vaskulární endoteliální buňky, buňky hladké svaloviny cév, Krüppel-like factor 15, kardiovaskulární nemoci

Abstract

Circadian system consist of the main circadian oscillator and the peripheral oscillators. Their function is to enable the adaptation of living organisms to the diurnal environmental changes. Circadian system regulates rhythmical expression of genes in nearly every cell of the body, thereby affecting both the physiological and behavioural processes of mammals and other animals. This bachelor's thesis summarizes a knowledge from experiments which led to the demonstration of circadian rhythms in cardiovascular system. To introduce the topic, the first discoveries of circadian rhythms in the cardiovascular system are mentioned. Then, we focus on the circadian rhythms in cardiomyocytes, vascular endothelial cells and in vascular smooth muscle cells. Another focal point of my thesis is the role of transcription factor Krüppel-like factor 15. Circadian regulation of the cardiovascular system is important for the proper function of the heart and blood vessels. Circadian disruption can cause severe pathophysiological and cardiovascular conditions, such as ventricular hypertrophy, hypertension, atherosclerosis, myocardial infarction or coronary artery disease.

Key words: circadian, clock genes, cardiovascular system, cardiomyocytes, vascular endothelial cells, vascular smooth muscle cells, Krüppel-like factor 15, cardiovascular diseases

Obsah

1. Úvod	1
2. Cirkadiánní systém	2
2.1 Princip zpětnovazebných smyček hodinových genů	2
2.1.1 První zpětnovazebná smyčka	3
2.1.2 Druhá zpětnovazebná smyčka.....	3
2.2 Synchronizace s vnějším prostředím	4
2.3 Regulace periferních hodin ze suprachiasmatického jádra.....	5
3. Cirkadiánní regulace kardiovaskulárního systému	7
3.1 První objevy cirkadiánní rytmicity v kardiovaskulárním systému	7
3.2 Vaskulární endoteliální buňky	8
3.3 Buňky hladké svaloviny cév (VSMC)	9
3.4 Kardiomyocyty	10
3.4.1 Vývoj embryonální kmenové buňky v kardiomyocyt a cirkadiánní rytmicita	14
3.5 Krüppel-like factor 15 (KLF15)	14
4. Závěr	16
5. Seznam použité literatury	18

Seznam použitých zkratek

ATP	-	adenosine triphosphate
AVP	-	arginine vasopressin
bHLH	-	basic helix–loop–helix
BMAL1	-	brain and muscle ARNTL-like protein-1
Ca²⁺	-	calcium ion
CCM	-	cardiomyocyte-specific circadian clock mutant
CK1δ	-	casein kinase I delta
CK1ε	-	casein kinase 1 epsilon
CLIF	-	cycle-like factor
CLOCK	-	circadian locomotor output cycles kaput
CRY	-	cryptochrome
CT	-	circadian timed
DAG	-	diacylglycerol
Dbp	-	D-Box Binding PAR BZIP Transcription Factor
DD	-	dark-dark
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DM-SCN	-	dorsomedial suprachiasmatic nucleus
EKB	-	embryonální kmenová buňka (z angl. embryonic stem cell)
GABA	-	gamma aminobutyric acid
IP3	-	inositol-1,4,5-triphosphate
ipRGCs	-	intrinsic photoresponsive retinal ganglion cells
KLF15	-	Krüppel-like factor 15
LD	-	light/dark cycle
MK	-	mastné kyseliny (z angl. fatty acids)
MLC	-	myosin light chain
Movas-1	-	mouse vascular smooth muscle cell line one
mRNA	-	messenger RNA
NAD⁺	-	nicotinamide adenine dinucleotide
Nampt	-	Nicotinamide phosphoribosyltransferase

NO	-	nitric oxide
Npas2	-	neuronal PAS domain-containing protein 2
PACAP	-	pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide
PAI-1	-	plasminogen activator inhibitor-1 gene
PAS	-	Per-Arnt-Sim domain
Pdk4	-	pyruvate dehydrogenase kinase 4
PER	-	period
PKA	-	protein kinase A
RHT	-	retinohypothalamic tract
RNA	-	ribonucleic acid
ROCK2	-	rho-associated protein kinase 2
RORα	-	retinoic acid-related orphan receptor alfa
ROREs	-	retinoic acid-related orphan receptor response elements
RT-PCR	-	real-time reverse transcription–polymerase chain reaction
SCN	-	suprachiasmatic nucleus
tPA	-	tissue plasminogen activator
Ucp3	-	Uncoupling Protein 3
VIP	-	vasoactive intestinal polypeptide
VL-SCN	-	ventrolateral suprachiasmatic nucleus
VSMC	-	vacular smooth muscle cell

1. Úvod

Cirkadiánní systém je zodpovědný za adaptaci organismů k periodicky se měnícím podmínkám vnějšího prostředí a za načasování fyziologických a behaviorálních procesů v těle. Jedná se o endogenní systém běžící s periodou přibližně 24 hodin. Skládá se z hlavního cirkadiánního oscilátoru uloženého v suprachiasmatických jádrech hypotalamu a periferních oscilátorů nacházejících se téměř v každé buňce těla. Molekulární mechanismus cirkadiánního systému je založen na zpětnovazebných smyčkách hodinových genů a jejich posttranskripčních a posttranslačních regulacích. Aby nebyly rytmy ve fázovém nesouladu, je nutná synchronizace s vnějším prostředím tzv. zeitgebery, kterými jsou například fotoperioda či hormonální signály. Dále je nutná synchronizace periferních oscilátorů hlavním cirkadiánním oscilátorem, aby taktéž nedocházelo k utlumování či desynchronizaci rytmů v periferních orgánech.

Cílem této práce je zjistit, zda je kardiovaskulární systém řízen cirkadiánními hodinami a jaké konkrétní buňky kardiovaskulárního systému jsou cirkadiánním systémem regulovány. V prvních kapitolách je popsán cirkadiánní systém, molekulární mechanismus zpětnovazebných smyček, synchronizace s vnějším prostředím a regulace periferních hodin suprachiasmatickým jádrem. V následujících kapitolách se zaměřuji na první objevy cirkadiánního systému v kardiovaskulárním systému a následně rozebírám jednotlivé typy buněk, ve kterých byly oscilace hodinových genů v kardiovaskulárním systému naměřeny s nastíněním fyziologických a patofyziologických dopadů narušení cirkadiánních rytmů na kardiovaskulární systém.

2. Cirkadiánní systém

První záznamy o existenci cirkadiánního systému se objevily již v roce 1729. Francouzský astronom Jean Jacques d'Ortous de Mairan prováděl studie na rostlině mimosa a pozoroval, že se její listy otevírají a zavírají s periodicitou dne a noci a že dokonce tato rytmicita přetrvává i když je mimosa v tmavém koutě místnosti izolovaná od denního světla (Korf & von Gall, 2016). Později bylo provedeno několik studií na rostlinách i zvířatech a bylo zjištěno, že tyto rytmy nejsou řízeny pouze cykly vnějšího prostředí, ale že existuje endogenní cirkadiánní systém, který je jen do určité míry ovlivněn vnějšími vlivy. Hlavní rozvoj tohoto oboru nastal až ve 20. století.

Cirkadiánní systém generuje a udržuje rytmy v chování i fyziologických funkcích, samovolně běžící s periodou přibližně 24 hodin. Pro správné fungování cirkadiánního systému jsou důležité vnější stimuly, zejména délka fotoperiody, díky níž se endogenní cirkadiánní systém synchronizuje s vnějším prostředím. Mezi hlavní komponenty cirkadiánního systému patří hlavní cirkadiánní oscilátor a periferní oscilátory. Hlavní cirkadiánní oscilátor je uložen v suprachiasmatických jádrech hypotalamu (SCN), která jsou bilaterálně uložená po obou stranách třetí mozkové komory, nad křížením optických nervů chiasma opticum (Abrahamson & Moore, 2001; Moore & Eichler, 1972; Ralph *et al.*, 1990). Každé suprachiasmatické jádro obsahuje přibližně 10 000 neuronů a každý neuron v SCN má jako hlavní transmitter kyselinu gama-aminomáselnou (GABA) (Mohawk & Takahashi, 2011). SCN je pak rozdělen na dvě části – na ventrolaterální jádra (VL-SCN) obsahující neuropeptid vasoaktivní intestinální peptid (VIP) a dorzomediální jádra (DM-SCN) obsahující arginin vasopressin (AVP) (Abrahamson & Moore, 2001).

2.1 Princip zpětnovazebných smyček hodinových genů

Hodinové geny byly objeveny v roce 1971 u *Drosophily melanogaster*. Ronald Konopka a Seymour Benzer (1971) identifikovali gen *period* (*Per*) a zjistili, že mutace tohoto genu vede k narušení 24hodinové cirkadiánní rytmicity v lokomoční aktivitě a dalších behaviorálních procesech *Drosophily* (Konopka & Benzer, 1971). Od této doby proběhla již řada studií zabývajících se molekulární podstatou hodinových genů a jejich produktů a dnes je obecně známé, že hodinové geny a jejich produkty interagují v autoregulačních transkripčně-translačních zpětnovazebných smyčkách (viz obrázek 1). Tyto smyčky se skládají z pozitivních a negativních částí a řídí tak periodickou expresi hodinových genů.

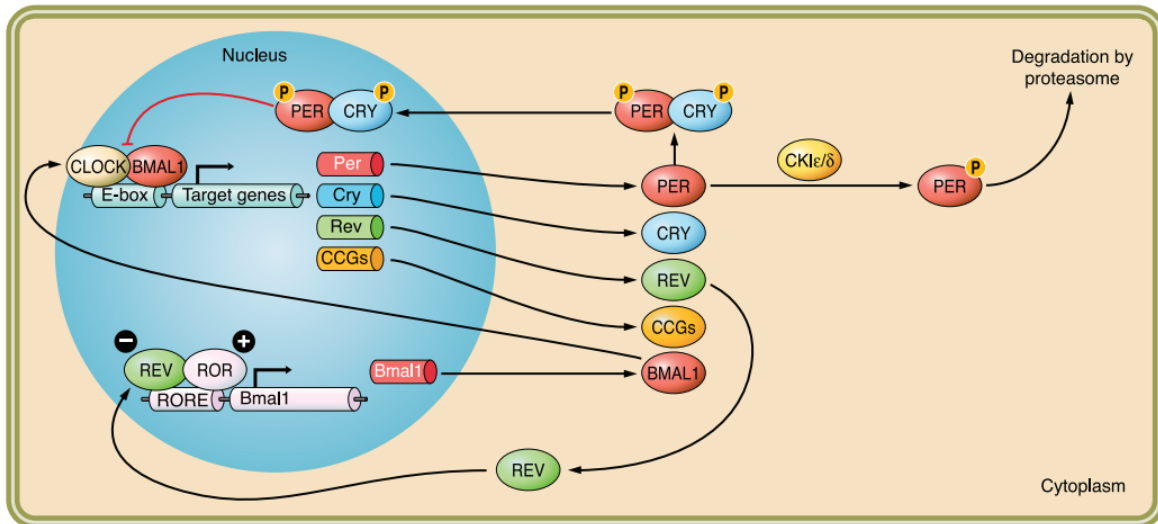
2.1.1 První zpětnovazebná smyčka

První zpětnovazebná smyčka zahrnuje geny: *circadian locomotor output cycles kaput* (*Clock*) a jeho analog *neuronal PAS domain-containing protein 2* (*Npas2*), dále *brain and muscle Arnt-like protein-1* (*Bmal1*), *period1* a *period2* (*Per1*, *Per2*) a *cryptochrome 1* a *cryptochrome 2* (*Cry1*, *Cry2*) (Golombek & Rosenstein, 2010). *Clock* a *Bmal1* kódují proteiny patřící do bazální helix-loop-helix (bHLH)-PAS transkripční rodiny. Následně proteiny CLOCK a BMAL1 přes jejich PAS protein-protein doménu heterodimerizují a vytváří v jádře buněk komplex CLOCK:BMAL1 (Gekakis *et al.*, 1998; Korf & von Gall, 2016). V mozkových tkáních je homologem CLOCK protein NPAS2 a tvoří se komplex NPAS2:BMAL1 (Reick *et al.* 2001). Heterodimer CLOCK:BMAL1 se poté váže na E-box sekvenci promotorů genů *Per* a *Cry* a dalších hodinami řízených genů a tím aktivuje jejich transkripci (Gekakis *et al.*, 1998; Horst *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2001). Proteinové produkty PER a CRY se akumulují v cytoplazmě a formují heterotypické komplexy s polypeptidy jako je kaseinkináza CK1 δ a CK1 ϵ (Lee *et al.*, 2009). PER a CRY dimerizují, transportují se do jádra, interagují s komplexem CLOCK:BMAL1 a tím inhibují jejich vlastní transkripci (Kume *et al.*, 1999). Během noci je represorový komplex PER:CRY degradován E3 ubiquitin ligázou a tím se opět obnoví aktivita komplexu CLOCK:BMAL1 (Reischl *et al.*, 2007; Yoo *et al.*, 2013). BMAL1 a CLOCK tedy působí jako aktivátory v ranních hodinách a PER a CRY jako represory ve večerních hodinách.

2.1.2 Druhá zpětnovazebná smyčka

Druhá zpětnovazebná smyčka slouží především k zajištění stabilní funkce cirkadiálních hodin. Zahrnuje expresi jaderného receptorového hormonu *Rev-erba*, který se tvoří během první zpětnovazebné smyčky a je stejně jako *Per* a *Cry* aktivován komplexem CLOCK:BMAL1 připojením na jeho E-box sekvenci. Další složku druhé zpětnovazebné smyčky tvoří retinoic acid-related orphan receptor α (*ROR α*). Proteinové produkty těchto genů (REV-ERB α a ROR α) řídí rytmickou expresi genu *Bmal1*. Rytmicky se navazují na ROR enhancerové elementy (ROREs), které *Bmal1* obsahuje v jeho promotorové oblasti a ROR α pak působí jako aktivátor, kdežto REV-ERB α jako represor transkripce (Cho *et al.*, 2012; Preitner *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004).

Důležité jsou posttranskripční a posttranslační modifikace proteinů jako je již zmíněná ubiquitinace komplexu PER:CRY či fosforylace PER1 a PER2 kaseinkinázy CK1 δ a CK1 ϵ , které jsou důležité pro regulaci translokace, dimerizaci a degradaci proteinů v proteasomu (Lee *et al.*, 2009; Reischl *et al.*, 2007; Yoo *et al.*, 2013).



Obrázek 1 - Schéma zpětnovazebných smyček molekulárních hodin savců – Heterodimer CLOCK:BMAL1 v jádře spouští transkripci genů Per a Cry nasednutím na jejich E-box sekvenci. Proteinové produkty PER a CRY v cytoplasmě heterodimerizují, následně se přesouvají zpět do jádra, inhibují komplex CLOCK:BMAL1 a tím inhibují svoji vlastní transkripci. PER:CRY komplex je degradován v proteasomu. Zároveň REV-ERBa a RORa řídí rytmickou expresi genu Bmal1 nasednutím na RORE v jeho promotorové oblasti. (Převzato a upraveno z Golombek a Rosenstein 2010)

2.2 Synchronizace s vnějším prostředím

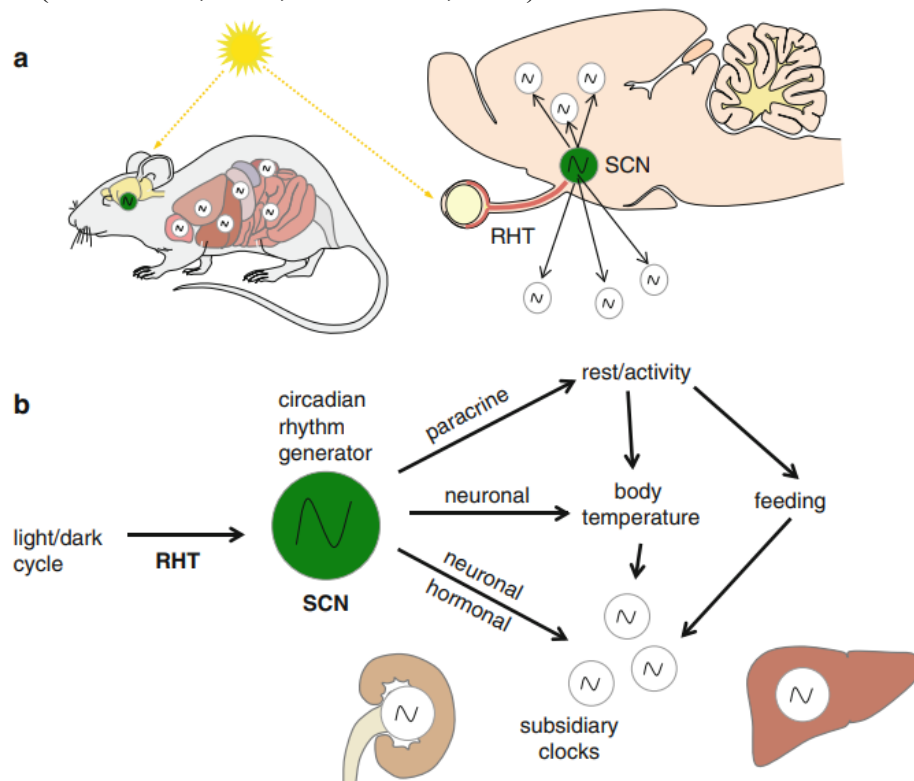
Procesem důležitým pro správné fungování cirkadiálního rytmu je synchronizace vnitřních biologických hodin s vnějším prostředím. To umožňuje organismům predikovat změny okolního prostředí a přizpůsobovat se novým podmínkám v předstihu. Hlavním zeitgeberem (časovým podnětem z vnějšího prostředí, díky kterému se cirkadiální systém může synchronizovat s vnějším prostředím) je střídání světla a tmy dané rotací Země kolem vlastní osy. Pro experimenty v laboratorních podmínkách je proto důležité vytvořit obdobné podmínky a toho lze docílit tzv. light/dark cykly (LD, cykly světlo/tma), kdy jsou modelová zvířata 12 hodin na světle a 12 hodin ve tmě. Studujeme-li endogenní podstatu cirkadiálních oscilací, pokusy jsou prováděny v konstantní tmě (DD), aby se odmaskoval účinek okamžitého světla. V takových podmínkách se první polovina cyklu CT0-CT12 označuje jako subjektivní den, druhá polovina cyklu CT12-CT24 jako subjektivní noc (Lowrey & Takahashi, 2004).

Světelný impulz je veden z retiny až do hlavního cirkadiánního oscilátoru v SCN. Fotorecepce není vedena jen skrze klasické retinální fotoreceptory – tyčinky a čípky, ale zejména retinálními gangliovými buňkami (ipRGCs; z angl. intrinsic photoresponsive retinal ganglion cells) obsahujícími ftopigment melanopsin, který má mimořádnou schopnost reagovat přímo na světlo (Berson, 2003; Lowrey & Takahashi, 2004; Rollag *et al.*, 2003). ipRGCs savců používají jako transmitery glutamát a neuropeptid PACAP (pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide) a jejich axony tvoří odbočku optického nervu – retinohypotalamický trakt (RHT), kterým je fotická informace z retiny vedena do hypotalamu (Berson *et al.*, 2002; Stephan & Zucker, 1972). Nervová vlákna tvořící RHT tedy končí v samotných suprachiasmatických jádrech a zde je světelný impulz přeměněn na neuronální a humorální výstupní signály, které řídí např. rytmy v tělesné teplotě nebo vylučování hormonů (Buijs & Kalsbeek, 2001).

2.3 Regulace periferních hodin ze suprachiasmatického jádra

Hiearchické postavení cirkadiánního systému bylo zaznamenáno již u bezobratlých živočichů, a to konkrétně u členovců či u hmyzu, ale komplexní uspořádání cirkadiánního systému pozorujeme až u savců (viz obrázek 2a/b). Jak již bylo zmíněno výše, hlavní cirkadiánní oscilátor je uložen v SCN. Není však jediným oscilátorem v těle. Skoro každá buňka v těle totiž obsahuje svůj vlastní cirkadiánní oscilátor. Pro udržení správné rytmicity však musí být oscilátory v periferních orgánech koordinovány těmi hlavními v SCN neurálními a humorálními cestami (viz obrázek 2b). Periferní hodiny nejsou tedy přímo regulované světlem, ale musí dostávat signály z pacemakeru v SCN (Korf & von Gall, 2016). Hlavní důkazy, že SCN je hlavním cirkadiánním oscilátorem, který koordinuje periferní oscilátory byly provedeny již v 70. letech, kdy lézí SCN byly zrušeny rytmy v chování, lokomoční aktivitě a tělesné teplotě savců a naopak po transplantaci SCN znovu došlo k objevení rytmů s fází donora (Lehman *et al.*, 1987; Ralph *et al.*, 1990; Ralph & Menaker, 1988; Stephan & Zucker, 1972). Mezi další důkazy patří pokusy *in vitro*, které ukazují, že rytmus generovaný v SCN probíhá i několik měsíců v izolovaném SCN od okolní tkáně, kdežto rytmy v periferních tkáních se desynchronizují a ustávají již po několika cyklech (Yamazaki *et al.*, 2000). Dalším nepřímým důkazem, že jsou periferní oscilátory řízeny hlavním oscilátorem v SCN je zjištění, že fáze oscilace periferních hodin je o 3-9 hodin opožděná (Zylka *et al.*, 1998). Byla však provedena studie s použitím genového konstruktů PER2:LUC, který umožňuje snímat cirkadiánní oscilace *in vitro*, ve které došli autoři k závěru, že periferní oscilace nejsou

utlumeny a mohou v izolovaném stavu přetrvávat více než 20 cyklů. Dnes se vědci spíše přiklání k názoru, že hlavní cirkadiální oscilátor v SCN pouze koordinuje oscilace v periferních tkáních, aby nedošlo k desynchronizaci, ale není hlavním pacemakerem, který by periferní oscilace generoval (Yoo *et al.*, 2004). SCN tedy přímými a nepřímými drahami posílá časové signály, kterými synchronizuje periferní hodiny. Přímými drahami skrze parasymptický a sympatický nervový systém, neuroendokrinně přes melatonin a glukokortikoidy, nepřímo například řízením rytmu tělesné teploty nebo cyklu spánku a bdění. Molekulární hodiny pak v periferních buňkách, tkáních a orgánech kontrolují cirkadiální rytmy v metabolických a fyziologických funkcích (Korf & von Gall, 2016). Rytmičky exprimované geny v periferních tkáních kódují proteiny a enzymy v biosyntetických a metabolických procesech jako je metabolismus lipidů, glykolýza, glukoneogeneze, oxidativní fosforylace a detoxifikace (Green *et al.*, 2008; Panda *et al.*, 2002).



Obrázek 2a/b – Schéma hierarchického uspořádání cirkadiálního systému savců

2a – Cirkadiální systém se skládá z hlavního cirkadiálního oscilátoru (SCN) v hypothalamu a z periferních oscilátorů. Hlavní cirkadiální oscilátor je ovlivněn světlem, které je transdukováno ipRGC do elektrického signálu vedeného retinohypotalamickým traktem (RHT) až do samotného SCN. Periferní oscilátory se nacházejí v periferních orgánech a obsahuje je téměř každá buňka těla.

2b – Aby periferní hodiny správně fungovaly, musí být koordinovány hlavními cirkadiálními hodinami a to skrze parakrinní, neuronální a humorální dráhy. (Převzato a upraveno z Korf & von Gall 2016)

3. Cirkadiální regulace kardiovaskulárního systému

Před několika lety se ukázalo, že kardiovaskulární nemoci jako je srdeční arytmie, infarkt myokardu, cévní mozková příhoda, srdeční fibróza nebo náhlá srdeční smrt nemají náhodný výskyt během dne, ale nejčastěji nastávají v ranních hodinách, konkrétně mezi 8.-10. hodinou ranní (Degaute *et al.* 1991; Elliott 1998; Marler *et al.* 1989; Muller *et al.* 1987; 1989; 1999; Tofler *et al.* 1992; Willich *et al.* 1992). To má jistou souvislost s tím, že tepová frekvence, srdeční kontraktilita, krevní tlak nebo krevní hustota jsou vyšší po probuzení v důsledku exogenních vlivů jako je vzpřímený postoj a zahájení denních aktivit (Muller 1999; Talan a Engel 1993; Taylor *et al.* 2015). Později se začalo přicházet na to, že časování těchto kardiovaskulárních příhod mohou řídit vnitřní cirkadiální hodiny, které jsou seřizovány denním cyklem. Jiné experimenty ukázaly, že i vznik kardiovaskulárních nemocí může mít souvislost s chronickým narušováním funkce cirkadiálních hodin. Byly provedeny např. pokusy na křečcích s vrozenou kardiomyopatií, kterým byla chronicky desynchronizována cirkadiální rytmicita simulovanou prací na směny, což vedlo k významnému urychlení jejich mortality (Penev *et al.*, 1998). Poněkud složitější experiment s křečky s tzv. *Tau* mutací ukázal, že tato zvířata, která mají zkrácenou endogenní periodu trpí kardiovaskulárními i renálními obtížemi a umírají v mladém věku. Pokud se však vnější cyklus střídání světla a tmy přizpůsobí jejich endogenní periodě, tyto patologické změny nenastávají (Martino *et al.*, 2008). Tyto pokusy demonstrují, že narušení cirkadiálních hodin ať již genetickými mutacemi či vlivem vnějšího prostředí výrazně ovlivňuje funkci kardiovaskulárního systému.

3.1 První objevy cirkadiální rytmicity v kardiovaskulárním systému

První záznamy cirkadiální rytmicity v kardiovaskulárním systému byly získány z pokusů na myších aortách. Aorta je největší a nejdelší tepna savců, která rozvádí okysličenou krev do velkého krevního oběhu. Autoři si dali za cíl zjistit, zda tedy v aortě, konkrétně v buňkách hladké svaloviny cév (VSMC), dochází k cirkadiálním oscilacím. V jednom z pokusů byly myši po dobu 2 týdnů vystaveny cyklu LD12:12 a pak byly 2 dny drženy v DD. Autoři práce z aort těchto myší extrahovali RNA a pomocí Northern blot analýzy zkoumali míru exprese genů *Per2*, *Bmal1* a *Dbp* (D-Box Binding PAR BZIP Transcription Factor, hodinami kontrolovaný gen, který je přímo regulován zpětnovazebnými smyčkami) v jednotlivých časových bodech v průběhu cirkadiálního cyklu. Exprese *Per2* jako jednoho z hlavních hodinových genů měla vrchol v CT12 a propad v CT0, rytmus exprese *Dbp* měl podobnou fázi jako *Per2* – vrchol v CT8/12 a propad v CT20/24. *Bmal1* naopak vykazoval antifázový rytmus

– vrchol v CT0 a propad v CT8. Toto byl jeden z prvních experimentů, který prokázal, že aorta vykazuje cirkadiánní rytmicitu (Nonaka *et al.* 2001). Později byly tyto výsledky potvrzeny i jinými studiemi, ve kterých byla např. měřena, v žilách a arteriích transgenních potkanů, rytmická aktivita promotoru hodinového genu *Per1* spojeného s genem pro luciferázu (Davidson *et al.*, 2005). V dalším experimentu Rudic *et al.* (2005) pak zkoumali cirkadiánní expresi genů v myších aortách a pomocí bioinformatické analýzy transkriptomu ukázali, že 330 transkriptů této tkáně vykazuje cirkadiánní rytmicitu. Touto prací se autoři přiblížili k pochopení mechanismu, kterým mohou cirkadiánní hodiny ovlivňovat funkci kardiovaskulárního systému na molekulární úrovni (Rudic *et al.*, 2005). Další pokusy byly prováděny převážně s potkany, kteří byli vystaveni po dobu 1 týdne světelnému cyklu LD12:12 a následně v průběhu cirkadiánního cyklu zabiti. Metodou kvantitativní RT-PCR vzorků srdeční tkáně se ukázalo, že např. *Bmal1* a *Clock* vykazují cirkadiánní rytmicitu. Tyto experimenty, stejně jako předchozí, potvrdily, že hlavní složky molekulárních hodin v srdci dramaticky mění úroveň svojí genové exprese během 24 hodin (Durgan *et al.* 2005; Young *et al.* 2001; 2014).

3.2 Vaskulární endoteliální buňky

Vaskulární endoteliální buňky hrají důležitou roli v průtoku krve, propustnosti buněčných i nebuněčných látek skrze cévní stěnu a mají vliv na koagulaci a fibrinolýzu. Produkují vazokonstrikční (endoteliny) i vazodilatační látky (oxid dusnatý, NO), tkáňový aktivátor plazminogenu (tPA) a jeho inhibitor plasminogen activator inhibitor-1 gen (PAI-1) a trombomodulin, což je protein s antikoagulační aktivitou, který váže trombin, aktivuje protein C a protein S, čímž následně deaktivuje řadu srážecích faktorů. Nerovnováha mezi vazokonstrikčními a vazodilatačními látkami spouští řadu endoteliálních dysfunkcí, popřípadě kardiovaskulárních nemocí. Jedním z příkladů je například ateroskleróza, která vede ke zvýšení propustnosti cévní stěny (Karásek *et al.*, 2004; Vrablík *et al.*, 2011). Je otázkou, zda jsou základní regulační faktory produkované endoteliálními buňkami řízené cirkadiánními hodinami.

Maemura *et al.* (2000) objevili protein z bHLH/PAS rodiny, cycle-like faktor (CLIF, později uváděný jako BMAL2), který vykazoval vysokou homologii s hodinovým genem *Cycle* u *Drosophily*. Předpokládali, že CLIF může v endoteliálních buňkách regulovat cirkadiánní oscilaci exprese PAI-1. V pokusu se ukázalo, že CLIF tvoří heterodimer s CLOCK a upreguluje PAI-1 gen skrz E-box. Proteiny PER2 a CRY1 pak inhibují aktivaci PAI-1 promoteru, kterou

řídí CLOCK:CLIF heterodimer. Z tohoto pokusu vyplývá, že se CLIF účastní zpětnovazebné smyčky, která je typická pro hodinové geny. PAI-1 je důležitým inhibítozem fibrinolýzy, procesu rozpouštění krevní sraženiny. Cirkadiánní oscilace PAI-1 s maximem během časných ranních hodin tak částečně vysvětluje, proč tromboembolické nemoci či infarkt myokardu nastávají v ranních hodinách (Maemura *et al.*, 2000).

Další studie se zaměřila na endotelový membránový protein trombomodulin. Pokus byl prováděn na *Clock* mutantních myších a lidských endoteliálních buňkách pupečnickové žíly. Ukázalo se, že mRNA trombomodulinu je up-regulována heterodimerem CLOCK a BMAL2 a cirkadiánní oscilace exprese trombomodulinu má podobný průběh jako PAI-1. Fyziologické pokusy ukázaly, že trombin a PAI-1 spolupracují, indukují tvorbu fibrinu a zároveň inhibují degradační procesy, čímž se urychluje akumulace fibrinu. Trombomodulin pak vykazuje opačný efekt, kdy inhibuje funkci trombinu. Komplex trombomodulinu a trombinu aktivuje protein C, který inhibuje aktivitu PAI-1 (Takeda *et al.*, 2007). Časování exprese trombomodulinu tedy bude hrát významnou roli v kardiovaskulárních nemocích, které nastávají převážně v ranních hodinách.

Role cirkadiánního systému ve správné funkci vaskulárních endoteliálních buněk byla prokázána také na modelu myši s mutací hodinového genu *Per2*. Pokusy byly prováděny na myších, které byly rozděleny do dvou skupin – kontrolní a s *Per2* mutací. Autoři studie izolovali myši aorty s neporušeným endotelem a v podmínkách LD12:12, tedy v prostředí střídání světla a tmy, zkoumali expresi několika proteinů. Mutace v *Per2* způsobila sníženou produkci NO a vazodilatačních prostaglandinů a zvýšenou produkci vazokonstrikčních prostaglandinů. Výsledky tak naznačují, že *Per2* a neporušený cirkadiánní systém hrají významnou roli ve správné funkci endotelu (Viswambharan Hema *et al.*, 2007).

3.3 Buňky hladké svaloviny cév (VSMC)

VSMC jsou nejvíce zastoupeným typem buněk v krevních cévách. Nachází se ve střední vrstvě cév zvané tunica media. Jsou velice významnými buňkami pro strukturní i fyziologickou funkci cév (Bacakova *et al.*, 2018). Skrze systém renin-angiotensin regulují kontrakci, růst, vývoj a remodelaci cévních stěn. Hlavní přeměněnou složkou renin-angiotensinového systému je angiotensin II, hormon, který působí silně vazokonstrikčně. Angiotensin II ovlivňuje kontrakci VSMC tím, že aktivuje fosfolipázu C, která štěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát na diacylglycerol (DAG) a inositol-1,4,5-trisfosfát (IP3), což jsou sekundární poslové, kteří zvyšují intracelulární množství Ca^{2+} a pH. Zvýšená koncentrace Ca^{2+} pak vede k interakci

aktin-myosin a následné kontrakci (Touyz & Schiffrin, 1997). V roce 2013 se poprvé prokázalo, že kontraktilita VSMC je řízena vnitřním cirkadiánním systémem. Exprese hodinového genu *Rora* podněcuje oscilační změnu v transkripci Rho-associated protein kinase 2 (ROCK2), proteinové kinázy, která pak zprostředkovně generuje oscilaci ve fosforylaci lehkého řetězce myosinu (MLC). MLC fosforylace pak zvyšuje citlivost myofilamenta (vlákna aktinu, myosinu a tropomyosinu) na Ca^{2+} a tím reguluje kontrakci VSMC. ROCK2 kináza se tedy ukázala být hlavním oscilátorem, který generuje cirkadiánní rytmy v citlivosti myofilamenta na Ca^{2+} a v kontraktilitě cév s největším vrcholem se začátkem světelné fáze u myši (Saito *et al.*, 2013).

Jak již bylo zmíněno výše, Nonaka *et al.* (2001) objevili cirkadiánní rytmicitu exprese genů v myších aortách. V dalších pokusech se tedy zaměřili na to, v jakých buňkách aorty se tyto zpětnovazebné smyčky tvoří. Enzymatickou disociací izolovali VSMC z aort potkanů. VSMC buňky po dobu 72 hodin inkubovali v 5% mediu DMEM (z angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium) a následně stimulovali médiem obsahujícím angiotensin II, který po 2 hodinách opět odmyli. Výsledky ukázaly, že angiotensin II vyvolává rytmickou expresi hodinových genů ve VSMC a funguje tak jako Zeitgeber. Hraje tak důležitou roli v cirkadiánní regulaci kardiovaskulárního systému (Nonaka, *et al.*, 2001). Oscilace hodinových genů ve VSMC byla také potvrzena v experimentu s myší linií buněk Movas-1 (z angl. mouse vascular smooth muscle cell line one) (Chalmers *et al.*, 2008).

Po biochemickém či mechanickém poškození cévy VSMC podstupují fenotypickou modulaci, při které se přeměňují z kontraktilní buňky na buňku syntetickou, pro kterou je charakteristická zvýšená proteosyntéza, migrace a růst VSMC (Campbell & Campbell, 2012; Saleh Al-Shehabi *et al.*, 2016; Shinohara *et al.*, 2012). Tato přeměna často vede k nenávratnému poškození krevních cév (Bacakova *et al.*, 2018). VSMC tak mají přímý vliv na vývoj řady kardiovaskulárních patofyziologických stavů jako je ateroskleróza či hypertenze.

3.4 Kardiomyocyty

Buňky myokardu (střední, nejsilnější vrstvy srdeční stěny), kardiomyocyty, lze rozdělit na pracovní a převodní tvořící převodní systém srdeční. Buňky převodního systému jsou zodpovědné za elektrickou aktivitu srdce, samovolně tvoří vzruchy v sinoatriálním uzlu, rozvádí je po celém srdci a určují frekvenci kontrakcí. Naopak buňky pracovního myokardu nejsou schopné vytvářet vzruchy, jejich hlavní funkcí je kontrakce, tedy mechanická čerpací práce srdce, kterou rozvádí krev ze srdce do celého krevního oběhu. Jednotlivé kardiomyocyty jsou propojeny gap junctions a tvoří funkční syncytium, které je důležité pro synchronizovanou

kontrakci myokardu. Cyklus kontrakce-relaxace kardiomyocytů je ovlivněn cyklickým nárůstem a poklesem intracelulárního Ca^{2+} . Změny v rychlosti a síly kontrakce jsou nutné při stresových situacích, kdy je potřeba zvýšit srdeční výdej. Toho je dosaženo procesy, které zesilují Ca^{2+} zprostředkované odpovědi. Tyto procesy jsou regulované aktivací sympatických nervů a následným zvýšením hladiny norepinefrinu, hlavního neurotransmiteru sympatiku. Norepinefrin se následně váže na β -adrenergní receptory, což vede k následné cAMP signalizaci a aktivaci proteinkinázy A (PKA). Aktivovaná PKA následně fosforyluje proteiny přímo regulující kontraktilitu myokardu. V reakci na patologické podněty podstupují kardiomyocyty hypertrofii, s čímž je spojené chronické zvýšení krevního tlaku. Hypertrofie srdce může být také způsobena objemovým přetížením či ztrátou kontraktálních kardiomyocytů v důsledku infarktu myokardu. Neustávající hypertrofie pak může zapříčinit selhání srdce (Woodcock & Matkovich, 2005).

Autoři Durgan *et al.* (2005) publikovali práci, v níž se snažili odhalit podstatu cirkadiálních hodin v kardiomyocytech. Dospělé potkany adaptovali na LD12:12 po dobu 10 dní, poté jim odebrali vzorky kardiomyocytů pracovního myokardu pro *in vitro* experiment a následnou kvantitativní analýzu RNA. Po izolaci kardiomyocyty rozdělili do 2 skupin – na kontrolní skupinu a druhou, kterou synchronizovali 2,5% roztokem telecího séra, který nechali přes noc působit a poté ho odmyli. Výsledek studie ukázal, že hodinové geny *Bmal1*, *Rev-erba*, *Per2* a *Dbp* vykazují cirkadiální rytmicitu, avšak pouze v populaci buněk synchronizovaných sérem. Autoři dokázali, že oscilace hodinových genů existují v jednotlivých buňkách, ale jejich populace vykazuje jednotný cirkadiální rytmus v expresi pouze po synchronizaci sérem. Sérum v *in vitro* experimentech tedy funguje jako Zeitgeber. Tato studie testuje význam dalšího možného zeitgeberu, glukózy, která je hlavní Zeitgeber ve fibroblastech (Hirota *et al.*, 2002). Práce Durgan *et al.* (2005) však její synchronizační roli nepotvrdila, avšak odhalila, že norepinefrin ovlivňuje časování cirkadiálních hodin v srdci a jeví se tedy jako hlavní Zeitgeber v kardiomyocytech (Durgan *et al.*, 2005). Katecholaminy (adrenalin, norepinefrin) a glukokortikoidy (kortizol) obsažené v plazmě se tedy zdají být nejdůležitějšími synchronizátory cirkadiálních rytmů v periferních orgánech a tedy i v srdci (Balsalobre *et al.*, 1998; Beesley *et al.*, 2016; Sujino *et al.*, 2012; Veen *et al.*, 2012). Vykazují cirkadiální rytmicitu s největším vrcholem na začátku aktivní fáze, tedy v ranních hodinách u lidí a v nočních hodinách u potkanů (De Boer & Van Der Gugten, 1987). Tyto poznatky tak naznačují, proč je krevní tlak u lidí vyšší v ranních hodinách, neboť norepinephrin a kortizol jsou hlavními regulátory krevního tlaku (Thosar *et al.*, 2018).

Beesley *et al.* (2016) testovali, zda jsou kardiomyocyty stejně jako neurony SCN autonomními cirkadiálními oscilátory (Beesley *et al.*, 2016; Leise *et al.*, 2012). Z myší chovaných v podmínkách LD12:12 izolovali primární kultury kardiomyocytů a porovnávali jejich rytmicitu s rytmicitou explantátových kultur srdečních komor. Ukázali, že jak primární kultury kardiomyocytů, tak explantátové kultury srdečních komor vykazují robustní oscilace exprese genu *Per2*, což danou hypotézu potvrzuje. Autonomně však fungují jen dočasně, po několika dnech je nutné je opět synchronizovat. Další jejich pozorování bylo inspirováno také experimenty s SCN, ve kterých se prokázalo, že specializovaná neuronální síť synchronizuje jednotlivé neurony SCN a upevňuje tak výslednou cirkadiální rytmicitu celé tkáně (Liu *et al.*, 2007). Zkoumali tedy, zda mezibuněčná komunikace hraje podobnou roli v synchronizaci cirkadiálních rytmů mezi kardiomyocyty. V tomto experimentu stejně jako u předchozího porovnávali rytmicitu primárních kultur kardiomyocytů s rytmicitou explantátových kultur srdečních komor. Výsledky ukázaly větší koherentnost rytmů *Per2* v organotypických kulturách komor než u roztroušených kardiomyocytů, čímž se potvrdila hypotéza, že mezibuněčná komunikace může udržovat synchronizované cirkadiální oscilace v srdci. Společně s vnějšími stimuly jako jsou hormonální signály či signály sympatiku mezibuněčná komunikace přispívá k udržování robustní cirkadiální rytmicity kardiomyocytů (Beesley *et al.*, 2016).

Dalším důležitým bodem v cirkadiální regulaci kardiomyocytů je porozumění cirkadiální oscilaci v uvolňování Ca^{2+} . Intracelulární hladina Ca^{2+} je o 30% vyšší v potkaních kardiomyocytech izolovaných v průběhu odpočinkové fáze než v průběhu fáze aktivní (Collins & Rodrigo, 2010). Beesley *et al.* (2016) se tedy domnívali, že srdce, stejně jako SCN, může vykazovat robustní netlumené oscilace v bazální hladině Ca^{2+} a také v Ca^{2+} , které se uvolňují během srdeční kontrakce. Hladinu Ca^{2+} a frekvenci kontrakcí pozorovali na izolovaných explantátech srdečních komor myší. U frekvence kontrakcí nepozorovali žádné velké oscilace, u bazální hladiny Ca^{2+} pouze slabé oscilace. Výsledky porovnávali s primární kulturou kardiomyocytů, která taktéž vykazovala pouze slabé oscilace v bazální hladině Ca^{2+} (Beesley *et al.*, 2016). Ačkoliv autoři předešlé studie nezaznamenali spojitost mezi cirkadiálním systémem, bazální hladinou Ca^{2+} a frekvencí kontrakcí, několik *in vivo* studií potvrdilo, že dysregulace cirkadiálních rytmů intracelulárního Ca^{2+} může způsobit řadu kardiovaskulárních onemocnění jako je arytmie (Collins & Rodrigo, 2010), ischemická choroba srdeční (Rotter *et al.*, 2014) či hypertrofie srdce (Bers & Guo, 2006).

Ještě dříve se však autoři Bray *et al.* (2008) zabývali potenciální spojitostí mezi cirkadiánním systémem a srdeční frekvencí. Výzkum provedli na myších s cílenou mutací hodinového genu *Clock* v kardiomyocytech (CCM, z angl. cardiomyocyte-specific circadian clock mutant) a porovnávali skupiny v *in vivo* a *ex vivo* podmínkách s kontrolní skupinou. V *in vivo* podmínkách byly oscilace v srdeční frekvenci u CCM myší utlumeny, kdežto u kontrolní skupiny přetrvávaly. Tento experiment tedy potvrdil, že cirkadiánní hodiny kardiomyocytů mohou ovlivňovat pacemakerovou funkci sinoatriálního uzlu (Bray *et al.*, 2008).

Jeden z externích vlivů, na které se kardiomyocyty musí adaptovat, je změna v hladině cirkulujících mastných kyselin. Mastné kyseliny (MK) jsou primární palivo pro celé srdce, přibližně 70% ATP, který je nutný ke kontrakci, je vyrobeno β -oxidací mastných kyselin (Lopaschuk *et al.*, 1994). MK jsou však více než jen palivo kardiomyocytů, jsou strukturními prekurzory a regulátory signalizačních drah. Musí být tedy udržována rovnováha mezi dostupností MK a rychlostí β -oxidace MK. Pokud je tato rovnováha vychýlena při obezitě či diabetu, metabolity non-beta oxidace MK se akumulují v myokardu a to má za následek vznik kardiomyopatie (Sharma *et al.*, 2004; Taegtmeyer *et al.*, 2002; Unger & Orci, 2001). Hladina MK vykazuje robustní denní oscilace se zvýšenou hladinou během odpočinkové fáze savců a je tedy možné, že cirkadiánní hodiny v srdci mohou synchronizovat dostupnost MK v myokardu regulací exprese několika enzymů oxidační metabolické dráhy (Stavinoha *et al.*, 2004). Autoři Durgan *et al.* (2006) studovali potkany, kteří byli vystaveni LD12:12 podmínkám a následně rozděleni do 2 skupin – na kontrolní skupinu se začátkem světelné fáze v 7 hodin ráno a druhou skupinu se začátkem světelné fáze v 19 hodin večer. Potkany pak porovnávali ještě s CCM myšmi a sledovali expresi genů Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 (*pdk4*) a Uncoupling Protein 3 (*Ucp3*). *Pdk4* reguluje metabolismus glukózy a MK v krvi (Jeoung & Harris, 2010; S. Zhang *et al.*, 2014). *Ucp3* reguluje metabolismus lipidů (Oliveira *et al.*, 2016). Manipulace s LD cykly způsobila změny ve schopnosti srdce reagovat na MK a narušení synchronizace mezi cirkadiánním systémem a vnějším prostředím. Cirkadiánní rytmy ve schopnosti srdce reagovat na MK se zvýšenou citlivostí během temné fáze přetrvávaly pouze u plně funkčních cirkadiánních hodin bez narušené funkce genů *Pdk4* a *Ucp3*, což poukazuje na to, že cirkadiánní hodiny kardiomyocytů regulují citlivost srdce na MK (Durgan *et al.*, 2006; Stavinoha *et al.*, 2004).

3.4.1 Vývoj embryonální kmenové buňky v kardiomyocyt a cirkadiánní rytmicita

Kardiomyocyty vznikají z embryonálních kmenových buněk (EKB) a je otázkou, v jakém stadiu vývoje kardiomyocytu se vytváří cirkadiánní rytmicita. Zda již EKB vykazují cirkadiánní rytmicitu či se vytváří až v průběhu vývoje.

Provedené studie na rybách a myších prokázaly, že produkty hodinových genů jsou přítomny již v mateřském vajíčku (Dekens & Whitmore, 2008; Delaunay *et al.*, 2003; Hamatani *et al.*, 2004). To však ještě neznamená, že proteiny hodinových genů v EKB vykazují funkční zpětnovazebné smyčky, které jsou klíčové pro správné fungování cirkadiánního rytmu. Nezávisle na sobě došlo několik týmů k poznatku, že hodinové geny jsou přítomny v EKB, ale nevykazují žádnou cirkadiánní rytmicitu (Amano *et al.*, 2009; Dekens & Whitmore, 2008; Johnson *et al.*, 2002). Další studie byly tedy zaměřeny na to, kdy se cirkadiánní rytmicita během vývoje buněk objevuje. Ukázalo se, že pro vývoj funkčních cirkadiánních hodin je důležitý proces diferenciaci a cirkadiánní hodiny se vyvíjí postupně s vývojem od EKB až po dospělý kardiomyocyt. Amplituda exprese genů *Bmal1*, *Per2* a *Clock* postupně roste během diferenciaci kardiomyocytů z EKB a dospělé kardiomyocyty již mají plně funkční cirkadiánní hodiny (Dierickx *et al.*, 2017; Kowalska *et al.*, 2010; Umemura *et al.*, 2014; Yagita *et al.*, 2010).

3.5 Krüppel-like factor 15 (KLF15)

KLF15 je transkripční faktor, který ovlivňuje několik fyziologických a patofyziologických funkcí v kardiovaskulárním systému. Je důležitý pro udržování homeostázy, především pro příjem glukózy a expresi genů lipogenních enzymů (Zhao *et al.*, 2019). Reguluje oxidaci a expresi genů lipogenních enzymů v kardiomyocytech (Prosdocimo *et al.*, 2015). Expresi růstových faktorů a inhibicí drah buněčné smrti potlačuje srdeční fibrózu a hypertrofii srdce (Gao *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2015). Nadměrná exprese KLF15 má ochranný účinek proti dysfunkci vaskulárních endoteliálních buněk, což je důležité, protože dysfunkce vaskulárních endoteliálních buněk může vést k ateroskleróze (Liu *et al.*, 2018; Mitra *et al.*, 2017). Down regulace KLF15 naopak vede k poruchám v využití lipidů, nedostatku NAD⁺, zvýšenému sklonu k ischemii srdce, srdeční fibróze a k srdečnímu selhání (Li *et al.*, 2020; Prosdocimo *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2019).

KLF15 reguluje přibližně 75% oscilujících transkriptů v srdci s největším vrcholem na začátku aktivní fáze (Zhang *et al.*, 2015). KLF15 je řízen heterodimerem CLOCK:BMAL1, je však také regulován několika vnějšími vlivy, např. stárnutím, stravou, cvičením či kardiovaskulárními nemocemi. Strava a cvičení jsou spojovány se zvýšenou expresí KLF15,

kdežto kardiomyopatie je naopak spojována se sníženou expresí KLF15 (Jeyaraj *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2020; Prosdocimo *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). BMAL1 a KLF15 mohou spolupracovat za účelem regulace cílené genové exprese. Například ovlivňují časovou expresi nikotinamid fosforibosyltransferázy (*Nampt*), což je hlavní faktor určující hladinu NAD⁺ nejen v srdci (Hsu *et al.*, 2014; Ramsey *et al.*, 2009; L. Zhang & Jain, 2021). Bylo potvrzeno, že exprese KLF15 má antifázový rytmus k expresi BMAL1 a že KLF15 posiluje funkci *Rev-erba*. Farmakologická aktivace *Rev-erba* pak selektivně potlačuje patologickou genovou expresi a ochraňuje tím srdce před hypertrofií (Zhang *et al.*, 2017; L. Zhang & Jain, 2021). Důkladnější porozumění tomuto faktoru tak v budoucnu může pomoci při léčbě řady kardiovaskulárních nemocí.

4. Závěr

Regulace kardiovaskulárního systému cirkadiánními hodinami je poměrně komplexní téma, zahrnující úroveň buněčnou i systémovou a mnoho studií je věnováno také patologickým důsledkům narušení cirkadiánních oscilací. Bylo proto poněkud obtížné popsat všechny vědecké poznatky, které jsou dodnes známy. Rozhodla jsem se proto pro zaměření zejména na jednotlivé typy buněk kardiovaskulárního systému, ve kterých byla cirkadiánní rytmicita naměřena u řady regulačních proteinů, a fyziologické a patofyziologické procesy ovlivňované časovým systémem jsem pouze nastínila.

Studie na myších aortách potvrdily rytmickou expresi hodinových genů v kardiovaskulárním systému, čímž započaly první výzkumy týkající se cirkadiánní regulace kardiovaskulárního systému. Byla potvrzena role hodinových genů v několika typech buněk, ve kterých ovlivňují důležité fyziologické funkce kardiovaskulárního systému. Pokusy na kardiomyocytech například prokázaly vliv cirkadiánních hodin na kontrakci, srdeční frekvenci či srdeční metabolismus. Ukázalo se, že kardiomyocyty působí jako autonomní cirkadiánní oscilátory, je zde však důležitá synchronizační role mezibuněčné komunikace, která cirkadiánní rytmy upevňuje. Byla prokázána role norepinefrinu a angiotensinu II jako hlavních zeitgeberů buněk kardiovaskulárního systému, kde norepinefrin ovlivňuje časovou expresi hodinových genů v kardiomyocytech a angiotensin II ve VSMC. Norepinefrin vykazuje nejvyšší vrchol v ranních hodinách, což koreluje s vyšším tlakem po probuzení, jelikož je norepinefrin hlavním regulátorem krevního tlaku. Angiotensin II ovlivňuje kontrakci cév také s nejvyšším vrcholem v ranních hodinách. Ve vaskulárních endoteliálních buňkách byla prokázána role *Per2* a neporušeného cirkadiánního systému jako hlavních faktorů určující správnou funkci endotelu.

Dále byla potvrzena časová exprese KLF15, hlavního transkripčního faktoru v srdci. KLF15 je důležitý pro udržování homeostázy, regulaci oxidace a exprese genů lipogenních enzymů v kardiomyocytech. Bylo prokázáno, že nadměrná exprese KLF15 má ochranný účinek na vaskulární endoteliální buňky, dále potlačuje srdeční fibrózu a hypertrofii srdce.

Bylo prokázáno, že narušení cirkadiánních rytmů v kardiovaskulárním systému vede k mnoha patofyziologickým stavům a kardiovaskulárním nemocem jako je hypertrofie srdce, hypertenze, ateroskleróza, infarkt myokardu či ischemická choroba srdeční. Všechny tyto patologické stavy nastávají převážně v ranních hodinách. Pro budoucí výzkum tak bude důležité pochopení konkrétních molekulárních mechanismů, jak cirkadiánní hodiny ovlivňují časový vývoj kardiovaskulárních patofyziologických stavů za účelem nastolení cílené léčby.

Podávání léků ve správný čas by tak mohlo řadu kardiovaskulárních nemocí zmírnit či jim úplně předejít.

5. Seznam použité literatury

- 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)
- Amano, T., Matsushita, A., Hatanaka, Y., Watanabe, T., Oishi, K., Ishida, N., Anzai, M., Mitani, T., Kato, H., Kishigami, S., Saeki, K., Hosoi, Y., Iritani, A., & Matsumoto, K. (2009). Expression and Functional Analyses of Circadian Genes in Mouse Oocytes and Preimplantation Embryos: Cry1 Is Involved in the Meiotic Process Independently of Circadian Clock Regulation1. *Biology of Reproduction*, *80*(3), 473–483. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.069542>
- *Bacakova, L., Travnickova, M., Filova, E., Matejka, R., Stepanovska, J., Musilkova, J., Zarubova, J., & Molitor, M. (2018). Vascular Smooth Muscle Cells (VSMCs) in Blood Vessel Tissue Engineering: The Use of Differentiated Cells or Stem Cells as VSMC Precursors. *Muscle Cell and Tissue—Current Status of Research Field*. IntechOpen. 289–308. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77108>
- 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)
- Beesley, S., Noguchi, T., & Welsh, D. K. (2016). Cardiomyocyte Circadian Oscillations Are Cell-Autonomous, Amplified by β -Adrenergic Signaling, and Synchronized in Cardiac Ventricle Tissue. *PLoS ONE*, *11*(7), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159618>
- Bers, D. M., & Guo, T. (2006). Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1047*, 86–98. <https://doi.org/10.1196/annals.1341.008>
- *Berson, D. M. (2003). Strange vision: Ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends in Neurosciences*, *26*(6), 314–320. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00130-9](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00130-9)
- Berson, D. M., Dunn, F. A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science*, *295*(5557), 1070–1073. <https://doi.org/10.1126/science.1067262>
- Bray, M. S., Shaw, C. A., Moore, M. W. S., Garcia, R. A. P., Zanutta, M. M., Durgan, D. J., Jeong, W. J., Tsai, J.-Y., Bugger, H., Zhang, D., Rohrwasser, A., Rennison, J. H., Dyck, J. R. B., Litwin, S. E., Hardin, P. E., Chow, C.-W., Chandler, M. P., Abel, E. D., & Young, M. E. (2008). Disruption of the circadian clock within the cardiomyocyte influences myocardial contractile function, metabolism, and gene expression. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *294*(2), H1036–H1047. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01291.2007>
- *Buijs, R. M., & Kalsbeek, A. (2001). Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature Reviews Neuroscience*, *2*(7), 521–526. <https://doi.org/10.1038/35081582>
- Campbell, J. H., & Campbell, G. R. (2012). Smooth Muscle Phenotypic Modulation—A Personal Experience. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *32*(8), 1784–1789. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.243212>

- Collins, H. E., & Rodrigo, G. C. (2010). Inotropic response of cardiac ventricular myocytes to beta-adrenergic stimulation with isoproterenol exhibits diurnal variation: Involvement of nitric oxide. *Circulation Research*, *106*(7), 1244–1252. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.213942>
- Davidson, A. J., London, B., Block, G. D., & Menaker, M. (2005). Cardiovascular tissues contain independent circadian clocks. *Clinical and Experimental Hypertension (New York, N.Y.: 1993)*, *27*(2–3), 307–311.
- De Boer, S. F., & Van Der Gugten, J. (1987). Daily variations in plasma noradrenaline, adrenaline and corticosterone concentrations in rats. *Physiology & Behavior*, *40*(3), 323–328. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(87\)90054-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(87)90054-0)
- Degaute, J. P., van de Borne, P., Linkowski, P., & Van Cauter, E. (1991). Quantitative analysis of the 24-hour blood pressure and heart rate patterns in young men. *Hypertension*, *18*(2), 199–210. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.18.2.199>
- Dekens, M. P., & Whitmore, D. (2008). Autonomous onset of the circadian clock in the zebrafish embryo. *The EMBO Journal*, *27*(20), 2757–2765. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.183>
- Delaunay, F., Thisse, C., Thisse, B., & Laudet, V. (2003). Differential regulation of Period 2 and Period 3 expression during development of the zebrafish circadian clock. *Gene Expression Patterns*, *3*(3), 319–324. [https://doi.org/10.1016/S1567-133X\(03\)00050-4](https://doi.org/10.1016/S1567-133X(03)00050-4)
- Dierickx, P., Vermunt, M. W., Muraro, M. J., Creyghton, M. P., Doevendans, P. A., van Oudenaarden, A., Geijsen, N., & Van Laake, L. W. (2017). Circadian networks in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *EMBO Reports*, *18*(7), 1199–1212. <https://doi.org/10.15252/embr.201743897>
- Durgan, D. J., Hotze, M. A., Tomlin, T. M., Egbejimi, O., Graveleau, C., Abel, E. D., Shaw, C. A., Bray, M. S., Hardin, P. E., & Young, M. E. (2005). The intrinsic circadian clock within the cardiomyocyte. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *289*(4), H1530–H1541. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00406.2005>
- Durgan, D. J., Trexler, N. A., Egbejimi, O., McElfresh, T. A., Suk, H. Y., Petterson, L. E., Shaw, C. A., Hardin, P. E., Bray, M. S., Chandler, M. P., Chow, C.-W., & Young, M. E. (2006). The Circadian Clock within the Cardiomyocyte Is Essential for Responsiveness of the Heart to Fatty Acids. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(34), 24254–24269. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601704200>
- Elliott, W. J. (1998). Circadian Variation in the Timing of Stroke Onset. *Stroke*, *29*(5), 992–996. <https://doi.org/10.1161/01.STR.29.5.992>
- Gao, L., Guo, Y., Liu, X., Shang, D., & Du, Y. (2017). KLF15 protects against isoproterenol-induced cardiac hypertrophy via regulation of cell death and inhibition of Akt/mTOR signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *487*, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.087>
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., & Weitz, C. J. (1998). Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism. *Science*, *280*(5369), 1564–1569. <https://doi.org/10.1126/science.280.5369.1564>
- *Golombek, D. A., & Rosenstein, R. E. (2010). Physiology of Circadian Entrainment. *Physiological Reviews*, *90*(3), 1063–1102. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2009>

- *Green, C. B., Takahashi, J. S., & Bass, J. (2008). The Meter of Metabolism. *Cell*, *134*(5), 728–742. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.022>
- Hamatani, T., Carter, M. G., Sharov, A. A., & Ko, M. S. H. (2004). Dynamics of Global Gene Expression Changes during Mouse Preimplantation Development. *Developmental Cell*, *6*, 117–131. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00373-3](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00373-3)
- Hirota, T., Okano, T., Kokame, K., Shirotani-Ikejima, H., Miyata, T., & Fukada, Y. (2002). Glucose Down-regulates Per1 and Per2 mRNA Levels and Induces Circadian Gene Expression in Cultured Rat-1 Fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(46), 44244–44251. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206233200>
- Horst, G. T. J. van der, Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., Wit, J. de, Verkerk, A., Eker, A. P. M., Leenen, D. van, Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H. J., & Yasui, A. (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, *398*(6728), 627–630. <https://doi.org/10.1038/19323>
- *Hsu, C.-P., Yamamoto, T., Oka, S., & Sadoshima, J. (2014). The function of nicotinamide phosphoribosyltransferase in the heart. *DNA repair*, 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.08.005>
- Chalmers, J. A., Martino, T. A., Tata, N., Ralph, M. R., Sole, M. J., & Belsham, D. D. (2008). Vascular circadian rhythms in a mouse vascular smooth muscle cell line (Movas-1). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *295*(5), R1529–R1538. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90572.2008>
- Cho, H., Zhao, X., Hatori, M., Yu, R. T., Barish, G. D., Lam, M. T., Chong, L.-W., DiTacchio, L., Atkins, A. R., Glass, C. K., Liddle, C., Auwerx, J., Downes, M., Panda, S., & Evans, R. M. (2012). Regulation of Circadian Behavior and Metabolism by Rev-erba and Rev-erbβ. *Nature*, *485*(7396), 123–127. <https://doi.org/10.1038/nature11048>
- *Jeoung, N. H., & Harris, R. A. (2010). Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 in Regulation of Blood Glucose Levels. *Korean Diabetes Journal*, *34*(5), 274–283. <https://doi.org/10.4093/kdj.2010.34.5.274>
- Jeyaraj, D., Haldar, S. M., Wan, X., McCauley, M. D., Ripperger, J. A., Hu, K., Lu, Y., Eapen, B. L., Sharma, N., Ficker, E., Cutler, M. J., Gulick, J., Sanbe, A., Robbins, J., Demolombe, S., Kondratov, R. V., Shea, S. A., Albrecht, U., Wehrens, X. H. T., ... Jain, M. K. (2012). Circadian rhythms govern cardiac repolarization and arrhythmogenesis. *Nature*, *483*(7387), 96–99. <https://doi.org/10.1038/nature10852>
- Johnson, M. H., Lim, A., Fernando, D., & Day, M. L. (2002). Circadian clockwork genes are expressed in the reproductive tract and conceptus of the early pregnant mouse. *Reproductive BioMedicine Online*, *4*(2), 140–145. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61931-1](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61931-1)
- *Karásek, D., Vaverková, H., Halenka, M., & Hutýra, M. (2004). Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi. *Interní Medicína pro Praxi*, *6*(9), 450–453. <http://solen.cz/doi/10.nnnn/int.2004.110.html>
- Konopka, R. J., & Benzer, S. (1971). Clock Mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *68*(9), 2112–2116. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.9.2112>
- *Korf, H.-W., & von Gall, C. (2016). Circadian Physiology. *Neuroscience in the 21st Century*, 2203–2239. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3474-4_65

- Kowalska, E., Moriggi, E., Bauer, C., Dibner, C., & Brown, S. A. (2010). The Circadian Clock Starts Ticking at a Developmentally Early Stage. *Journal of Biological Rhythms*, 25(6), 442–449. <https://doi.org/10.1177/0748730410385281>
- Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., & Reppert, S. M. (1999). MCRY1 and mCRY2 Are Essential Components of the Negative Limb of the Circadian Clock Feedback Loop. *Cell*, 98(2), 193–205. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81014-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81014-4)
- Lee, H., Chen, R., Lee, Y., Yoo, S., & Lee, C. (2009). Essential roles of CKI δ and CKI ϵ 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>
- Lehman, M., Silver, R., Gladstone, W., Kahn, R., Gibson, M., & Bittman, E. (1987). Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *The Journal of Neuroscience*, 7(6), 1626–1638. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.07-06-01626.1987>
- Leise, T. L., Wang, C. W., Gitis, P. J., & Welsh, D. K. (2012). Persistent Cell-Autonomous Circadian Oscillations in Fibroblasts Revealed by Six-Week Single-Cell Imaging of PER2::LUC Bioluminescence. *PLoS ONE*, 7(3), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033334>
- Li, L., Li, H., Tien, C.-L., Jain, M. K., & Zhang, L. (2020). KLF15 Regulates the Circadian Susceptibility to Ischemia Reperfusion Injury in the Heart. *Circulation*, 141(17), 1427–1429. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041664>
- Liu, A. C., Welsh, D. K., Ko, C. H., Tran, H. G., Zhang, E. E., Priest, A. A., Buhr, E. D., Singer, O., Meeker, K., Verma, I. M., Doyle III, F. J., Takahashi, J. S., & 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, B., Xu, L., Yu, X., Li, W., Sun, X., Xiao, S., Guo, M., & Wang, H. (2018). Protective effect of KLF15 on vascular endothelial dysfunction induced by TNF- α . *Molecular Medicine Reports*, 18(2), 1987–1994. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9195>
- *Lopaschuk, G. D., Belke, D. D., Gamble, J., Itoi, T., & Schönekeß, B. O. (1994). Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1213(3), 263–276. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(94\)00082-4](https://doi.org/10.1016/0005-2760(94)00082-4)
- *Lowrey, P. L., & Takahashi, J. S. (2004). Mammalian Circadian Biology: Elucidating Genome-Wide Levels of Temporal Organization. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 5(1), 407–441. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.5.061903.175925>
- Maemura, K., Monte, S. M. de la, Chin, M. T., Layne, M. D., Hsieh, C.-M., Yet, S.-F., Perrella, M. A., & Lee, M.-E. (2000). CLIF, a Novel Cycle-like Factor, Regulates the Circadian Oscillation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene Expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 36847–36851. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000629200>
- Marler J. R., Price T. R., Clark G. L., Muller J. E., Robertson T., Mohr J. P., Hier D. B., Wolf P. A., Caplan L. R., & Foulkes M. A. (1989). Morning increase in onset of ischemic stroke. *Stroke*, 20(4), 473–476. <https://doi.org/10.1161/01.STR.20.4.473>

- Martino, T. A., Oudit, G. Y., Herzenberg, A. M., Tata, N., Koletar, M. M., Kabir, G. M., Belsham, D. D., Backx, P. H., Ralph, M. R., & Sole, M. J. (2008). Circadian rhythm disorganization produces profound cardiovascular and renal disease in hamsters. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294(5), R1675–R1683. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00829.2007>
- *Mitra, R., O’Neil, G. L., Harding, I. C., Cheng, M. J., Mensah, S. A., & Ebong, E. E. (2017). Glycocalyx in Atherosclerosis-Relevant Endothelium Function and as a Therapeutic Target. *Current Atherosclerosis Reports*, 19(63), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0691-9>
- Mohawk, J. A., & Takahashi, J. S. (2011). Cell Autonomy and Synchrony of Suprachiasmatic Nucleus Circadian Oscillators. *Trends in neurosciences*, 34(7), 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.05.003>
- Moore, R. Y., & Eichler, V. B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*, 42(1), 201–206. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90054-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90054-6)
- *Muller, J. (1999). Circadian variation in cardiovascular events. *American Journal of Hypertension*, 12(2), 35S-42S. [https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(98\)00278-7](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(98)00278-7)
- Muller, J. E., Ludmer, P. L., Willich, S. N., Tofler, G. H., Aylmer, G., Klangos, I., & Stone, P. H. (1987). Circadian variation in the frequency of sudden cardiac death. *Circulation*, 75(1), 131–138. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.75.1.131>
- Muller, J. E., Tofler, G. H., & Stone, P. H. (1989). Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation*, 79(4), 733–743. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.79.4.733>
- Nonaka, H., Emoto, N., Ikeda, K., Fukuya, H., Rohman, M. S., Raharjo, S. B., Yagita, K., Okamura, H., & Yokoyama, M. (2001). Angiotensin II Induces Circadian Gene Expression of Clock Genes in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation*, 104(15), 1746–1748. <https://doi.org/10.1161/hc4001.098048>
- Oliveira, B. A. P., Pinhel, M. A. S., Nicoletti, C. F., Oliveira, C. C., Quinhoneiro, D. C. G., Noronha, N. Y., Marchini, J. S., Marchry, A. J., Junior, W. S., & Nonino, C. B. (2016). UCP1 and UCP3 Expression Is Associated with Lipid and Carbohydrate Oxidation and Body Composition. *PLOS ONE*, 11(3), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150811>
- Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., Schultz, P. G., Kay, S. A., Takahashi, J. S., & Hogenesch, J. B. (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)
- Penev, P. D., Kolker, D. E., Zee, P. C., & Turek, F. W. (1998). Chronic circadian desynchronization decreases the survival of animals with cardiomyopathic heart disease. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 275(6), H2334–H2337. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.275.6.H2334>
- Preitner, N., Damiola, F., Luis-Lopez-Molina, Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., & Schibler, U. (2002). The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB α Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Cell*, 110(2), 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00825-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00825-5)

- Prosdocimo, D. A., Anand, P., Liao, X., Zhu, H., Shelkay, S., Artero-Calderon, P., Zhang, L., Kirsh, J., Moore, D., Rosca, M. G., Vazquez, E., Kerner, J., Akat, K. M., Williams, Z., Zhao, J., Fujioka, H., Tuschl, T., Bai, X., Schulze, P. C., ... Haldar, S. M. (2014). Kruppel-like Factor 15 Is a Critical Regulator of Cardiac Lipid Metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(9), 5914–5924. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.531384>
- Prosdocimo, D. A., John, J. E., Zhang, L., Efraim, E. S., Zhang, R., Liao, X., & Jain, M. K. (2015). KLF15 and PPAR α Cooperate to Regulate Cardiomyocyte Lipid Gene Expression and Oxidation. *PPAR Research*, 2015(201625), 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/201625>
- 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>
- Ralph, M. R., & Menaker, M. (1988). A Mutation of the Circadian System in Golden Hamsters. *Science*, 241(4870), 1225–1227. <https://doi.org/10.1126/science.3413487>
- Ramsey, K. M., Yoshino, J., Brace, C. S., Abrassart, D., Kobayashi, Y., Marcheva, B., Hong, H.-K., Chong, J. L., Buhr, E. D., Lee, C., Takahashi, J. S., Imai, S., & Bass, J. (2009). Circadian Clock Feedback Cycle Through NAMPT-Mediated NAD⁺ Biosynthesis. *Science*, 324(5927), 651–654. <https://doi.org/10.1126/science.1171641>
- Reick, M., Garcia, J. A., Dudley, C., & McKnight, S. L. (2001). NPAS2: An Analog of Clock Operative in the Mammalian Forebrain. *Science*, 293(5529), 506–509. <https://doi.org/10.1126/science.1060699>
- Reischl, S., Vanselow, K., Westermark, P. O., Thierfelder, N., Maier, B., Herzel, H., & Kramer, A. (2007). β -TrCP1-Mediated Degradation of PERIOD2 Is Essential for Circadian Dynamics. *Journal of Biological Rhythms*, 22(5), 375–386. <https://doi.org/10.1177/0748730407303926>
- *Rollag, M. D., Berson, D. M., & Provencio, I. (2003). Melanopsin, Ganglion-Cell Photoreceptors, and Mammalian Photoentrainment. *Journal of Biological Rhythms*, 18(3), 227–234. <https://doi.org/10.1177/0748730403253382>
- Rotter, D., Grinsfelder, D. B., Parra, V., Pedrozo, Z., Singh, S., Sachan, N., & Rothermel, B. A. (2014). Calcineurin and its regulator, RCAN1, confer time-of-day changes in susceptibility of the heart to ischemia/reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 74, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.05.004>
- Rudic, R. D., McNamara, P., Reilly, D., Grosser, T., Curtis, A.-M., Price, T. S., Panda, S., Hogenesch, J. B., & FitzGerald, G. A. (2005). Bioinformatic Analysis of Circadian Gene Oscillation in Mouse Aorta. *Circulation*, 112(17), 2716–2724. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.568626>
- Saito, T., Hirano, M., Ide, T., Ichiki, T., Koibuchi, N., Sunagawa, K., & Hirano, K. (2013). Pivotal Role of Rho-Associated Kinase 2 in Generating the Intrinsic Circadian Rhythm of Vascular Contractility. *Circulation*, 127(1), 104–114. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.135608>
- Saleh Al-Shehabi, T., Iratni, R., & Eid, A. H. (2016). Anti-atherosclerotic plants which modulate the phenotype of vascular smooth muscle cells. *Phytomedicine*, 23(11), 1068–1081. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.10.016>

- Sato, T. K., Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., McNamara, P., Naik, K. A., FitzGerald, G. A., Kay, S. A., & Hogenesch, J. B. (2004). A Functional Genomics Strategy Reveals Rora as a Component of the Mammalian Circadian Clock. *Neuron*, *43*(4), 527–537. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.07.018>
- Sharma, S., Adroge, J. V., Golfman, L., Uray, I., Lemm, J., Youker, K., Noon, G. P., Frazier, O. H., & Taegtmeier, H. (2004). Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *The FASEB Journal*, *18*(14), 1692–1700. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2263com>
- *Shinohara, S., Shinohara, S., Kihara, T., & Miyake, J. (2012). Regulation of Differentiated Phenotypes of Vascular Smooth Muscle Cells. *Current Basic and Pathological Approaches to the Function of Muscle Cells and Tissues—From Molecules to Humans*, 331–344. <https://doi.org/10.5772/48573>
- Stavinoha, M. A., RaySpellicy, J. W., Hart-Sailors, M. L., Mersmann, H. J., Bray, M. S., & Young, M. E. (2004). Diurnal variations in the responsiveness of cardiac and skeletal muscle to fatty acids. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *287*(5), E878–E887. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00189.2004>
- Stephan, F. K., & Zucker, I. (1972). Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *69*(6), 1583–1586. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.6.1583>
- Sujino, M., Furukawa, K., Koinuma, S., Fujioka, A., Nagano, M., Iigo, M., & Shigeyoshi, Y. (2012). Differential Entrainment of Peripheral Clocks in the Rat by Glucocorticoid and Feeding. *Endocrinology*, *153*(5), 2277–2286. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1794>
- *Taegtmeier, H., McNulty, P., & Young, M. E. (2002). Adaptation and Maladaptation of the Heart in Diabetes: Part I: General Concepts. *Circulation*, *105*(14), 1727–1733. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000012466.50373.E8>
- Takeda, N., Maemura, K., Horie, S., Oishi, K., Imai, Y., Harada, T., Saito, T., Shiga, T., Amiya, E., Manabe, I., Ishida, N., & Nagai, R. (2007). Thrombomodulin Is a Clock-controlled Gene in Vascular Endothelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(45), 32561–32567. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705692200>
- Talan, M. I., & Engel, B. T. (1993). Morning increase in whole blood viscosity: A consequence of a homeostatic nocturnal haemodynamic pattern. *Acta Physiologica Scandinavica*, *147*(2), 179–183. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1993.tb09487.x>
- *Taylor, K. S., Heneghan, C. J., Stevens, R. J., Adams, E. C., Nunan, D., & Ward, A. (2015). Heterogeneity of Prognostic Studies of 24-Hour Blood Pressure Variability: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE*, *10*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126375>
- *Thosar, S. S., Butler, M. P., & Shea, S. A. (2018). Role of the circadian system in cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Investigation*, *128*(6), 2157–2167. <https://doi.org/10.1172/JCI80590>
- Tofler, G. H., Muller, J. E., Stone, P. H., Forman, S., Solomon, R. E., Knatterud, G. L., & Braunwald, E. (1992). Modifiers of timing and possible triggers of acute myocardial infarction in the thrombolysis in myocardial infarction phase II (TIMI II) study group. *Journal of the American College of Cardiology*, *20*(5), 1049–1055. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(92\)90356-R](https://doi.org/10.1016/0735-1097(92)90356-R)

- Touyz, R. M., & Schiffrin, E. L. (1997). Angiotensin II Regulates Vascular Smooth Muscle Cell pH, Contraction, and Growth Via Tyrosine Kinase-Dependent Signaling Pathways. *Hypertension*, *30*(2), 222–229. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.30.2.222>
- Umemura, Y., Koike, N., Matsumoto, T., Yoo, S.-H., Chen, Z., Yasuhara, N., Takahashi, J. S., & Yagita, K. (2014). Transcriptional program of Kpna2/Importin- α 2 regulates cellular differentiation-coupled circadian clock development in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(47), E5039–E5048. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419272111>
- *Unger, R. H., & Orci, L. (2001). Diseases of liporegulation: New perspective on obesity and related disorders. *The FASEB Journal*, *15*(2), 312–321. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0590>
- Veen, D. R. van der, Shao, J., Xi, Y., Li, L., & Duffield, G. E. (2012). Cardiac Atrial Circadian Rhythms in PERIOD2::LUCIFERASE and per1:luc Mice: Amplitude and Phase Responses to Glucocorticoid Signaling and Medium Treatment. *PLOS ONE*, *7*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047692>
- Viswambharan Hema, Carvas João M., Antic Vladan, Marecic Ana, Jud Corinne, Zaugg Christian E., Ming Xiu-Fen, Montani Jean-Pierre, Albrecht Urs, & Yang Zhihong. (2007). Mutation of the Circadian Clock Gene Per2 Alters Vascular Endothelial Function. *Circulation*, *115*(16), 2188–2195. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.653303>
- *Vrablík, M., Janotová, M., Motyková, E., & Prusíková, M. (2011). Endoteliální dysfunkce – první stadium aterosklerózy. *Medicina pro praxi*, *8*(3), 119–122.
- Wang, B., Haldar, S. M., Lu, Y., Ibrahim, O. A., Fisch, S., Gray, S., Leask, A., & Jain, M. K. (2008). The Kruppel-like factor KLF15 inhibits connective tissue growth factor (CTGF) expression in cardiac fibroblasts. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *45*(2), 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.05.005>
- Willich, S. N., Goldberg, R. J., Maclure, M., Perriello, L., & Muller, J. E. (1992). Increased onset of sudden cardiac death in the first three hours after awakening. *The American Journal of Cardiology*, *70*(1), 65–68. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(92\)91391-g](https://doi.org/10.1016/0002-9149(92)91391-g)
- *Woodcock, E. A., & Matkovich, S. J. (2005). Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *37*(9), 1746–1751. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.04.011>
- Yagita, K., Horie, K., Koinuma, S., Nakamura, W., Yamanaka, I., Urasaki, A., Shigeyoshi, Y., Kawakami, K., Shimada, S., Takeda, J., & Uchiyama, Y. (2010). Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(8), 3846–3851. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913256107>
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R.-I., Ueda, M., Block, G., Sakaki, Y., Menaker, M., & Tei, H. (2000). Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats. *Science*, *288*, 682–685. <https://doi.org/10.1126/science.288.5466.682>
- Yoo, S.-H., Mohawk, J. A., Slepka, S. M., Shan, Y., Huh, S. K., Hong, H.-K., Kornblum, I., Kumar, V., Koike, N., Xu, M., Nussbaum, J., Liu, X., Chen, Z., Chen, Z. J., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2013). Competing E3 Ubiquitin Ligases Govern Circadian Periodicity by Degradation of CRY in Nucleus and Cytoplasm. *Cell*, *152*(5), 1091–1105. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.055>

- Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepkas, S. M., Hong, H.-K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M., & 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>
- Young, M. E., Brewer, R. A., Pelicciari-Garcia, R. A., Collins, H. E., He, L., Birky, T. L., Peden, B. W., Thompson, E. G., Ammons, B.-J., Bray, M. S., Chatham, J. C., Wende, A. R., Yang, Q., Chow, C.-W., Martino, T. A., & Gamble, K. L. (2014). Cardiomyocyte-Specific BMAL1 Plays Critical Roles in Metabolism, Signaling, and Maintenance of Contractile Function of the Heart. *Journal of Biological Rhythms*, *29*(4), 257–276. <https://doi.org/10.1177/0748730414543141>
- Young Martin E., Razeghi Peter, & Taegtmeier Heinrich. (2001). Clock Genes in the Heart. *Circulation Research*, *88*(11), 1142–1150. <https://doi.org/10.1161/hh1101.091190>
- Yu, Y., Ma, J., Xiao, Y., Yang, Q., Kang, H., Zhen, J., Yu, L., & Chen, L. (2015). KLF15 Is an Essential Negative Regulatory Factor for the Cardiac Remodeling Response to Pressure Overload. *Cardiology*, *130*(3), 143–152. <https://doi.org/10.1159/000369382>
- Zhang, L., & Jain, M. K. (2021). Circadian regulation of cardiac metabolism. *The Journal of Clinical Investigation*, *131*(15), 1–9. <https://doi.org/10.1172/JCI148276>
- Zhang, L., Prosdocimo, D. A., Bai, X., Fu, C., Zhang, R., Campbell, F., Liao, X., Collier, J., & Jain, M. K. (2015). KLF15 Establishes the Landscape of Diurnal Expression in the Heart. *Cell Reports*, *13*(11), 2368–2375. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.038>
- Zhang, L., Zhang, R., Tien, C.-L., Chan, R. E., Sugi, K., Fu, C., Griffin, A. C., Shen, Y., Burris, T. P., Liao, X., & Jain, M. K. (2017). REV-ERB α ameliorates heart failure through transcription repression. *JCI Insight*, *2*(17), 1–13. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.95177>
- Zhang, S., Hulver, M. W., McMillan, R. P., Cline, M. A., & Gilbert, E. R. (2014). The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. *Nutrition & Metabolism*, *11*(10), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-11-10>
- Zhao, Y., Song, W., Wang, L., Rane, M. J., Han, F., & Cai, L. (2019). Multiple roles of KLF15 in the heart: Underlying mechanisms and therapeutic implications. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *129*, 193–196. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.01.024>
- Zheng, B., Albrecht, U., Kaasik, K., Sage, M., Lu, W., Vaishnav, S., Li, Q., Sun, Z. S., Eichele, G., Bradley, A., & Lee, C. C. (2001). Nonredundant Roles of the mPer1 and mPer2 Genes in the Mammalian Circadian Clock. *Cell*, *105*(5), 683–694. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00380-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00380-4)
- Zylka, M. J., Shearman, L. P., Weaver, D. R., & Reppert, S. M. (1998). Three period Homologs in Mammals: Differential Light Responses in the Suprachiasmatic Circadian Clock and Oscillating Transcripts Outside of Brain. *Neuron*, *20*(6), 1103–1110. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80492-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80492-4)