

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Fyziologie živočichů

Studijní zaměření: Neurobiologie



**Jakub Dušek**

**Vývoj cirkadiánního systému po systémové potenciaci GABAergního přenosu v časně ontogenezi**

**Development of the circadian system after systemic potentiation of GABAergic transmission in early ontogenesis**

Diplomová práce

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

Praha, 2023

## **Prohlášení**

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

V Praze, 26. dubna 2023

Jakub Dušek

Podpis:

## **Poděkování**

Tímto bych chtěl poděkovat své školitelce doc. RNDr. Zdeňce Bendové, Ph.D. za konzultace a cenné rady během tvorby této práce a Mgr. Veronice Spišské za naučení laboratorních metod.

## Abstrakt

Cirkadiánní systém je evoluční odpovědí organismů na opakující se geofyzikální podmínky a umožňuje organismům věnovat svoji energii řešení náhlých změn. Ačkoliv má cirkadiánní systém pomoci organismům přežít a prosperovat v dynamických podmínkách, je sám citlivý na vnější změny. Během kritické vývojové periody savčí CNS, tedy v neonatálním věku, je cirkadiánní systém obzvláště zranitelný. Benzodiazepiny, farmaka široce předepisována již půl století, zasahují do GABAergního přenosu, jež je kruciólním typem signalizace pro fungování cirkadiánního systému. Předmětem této práce je zjistit, zda a jakým způsobem dojde ke změně vývoje a fungování cirkadiánního systému po aplikaci látky ze skupiny benzodiazepinů, klonazepamu, v kritické vývojové periodě. Práce sleduje změny v expresním profilu vybraných genů v hipokampu, čichových lalocích a frontálním kortexu dvou ontogenetických stádií potkanů. Výsledky této práce naznačují, že benzodiazepiny aplikované v neonatálním věku narušují vývoj cirkadiánního systému, a že tyto změny, zejména v hipokampu, po určitou dobu přetrvávají.

**Klíčová slova:** cirkadiánní systém; cirkadiánní rytmy; vývoj; GABA; benzodiazepiny

## Abstract

The circadian system is the evolutionary response of organisms to repetitive geophysical conditions and allows organisms to devote their energy to solving sudden changes. Although the circadian system developed to help organisms survive and thrive in dynamic conditions, system itself is sensitive to external changes. During critical developmental period of the mammalian CNS, the neonatal period, the circadian system is significantly vulnerable. Benzodiazepines, pharmaceuticals widely prescribed for half a century, interfere with GABAergic transmission, which is critical type of signaling for the functioning of the circadian system. The purpose of this thesis is to determine whether and how the development and functioning of the circadian system is altered after administration of a drug from the benzodiazepine class, clonazepam, during the critical developmental period. This thesis examines changes in the expression profile of selected genes in the hippocampus, olfactory bulb and frontal cortex of two ontogenetic stages of rats. Results of this work suggest that benzodiazepines administered in the neonatal period disrupt the development of the circadian system and that these changes, particularly in the hippocampus, persist for certain time.

**Key words:** circadian system; circadian rhythms; development; GABA; benzodiazepines

## Seznam použitých zkratek

Aq	–	Voda v laboratorní čistotě
AANAT	–	Aralkylamin N-acetyltransferáza
Ang II	–	Angiotensin II
ANOVA	–	Analýza rozptylu (Analysis of variance)
AVP	–	Arginin-vazopresin
BDZ	–	Benzodiazepiny
CALB	–	Kalbindin
CALR	–	Kalretinin
CCG	–	Hodinami řízené geny (Clock controlled genes)
cDNA	–	Cirkulární DNA
CKI $\epsilon$	–	Kasein kináza epsilon
CNS	–	Centrální nervová soustava
CT	–	Cirkadiánní čas (Circadian time)
dm-SCN	–	Dorsomediální část suprachiasmatického jádra (Shell of suprachiasmatic nucleus)
DNA	–	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)
dNTP	–	Deoxyribonukleosidtrifosfát
E1	–	Embryonální den 1
EtOH	–	Etanol
GABA	–	Kyselina $\gamma$ -aminomáselná (Gamma-aminobutyric acid)
GRP	–	Peptid uvolňující gastrin
ipRGC	–	Vnitřně fotosenzitivní gangliové buňky sítnice (Intrinsically photosensitive retinal ganglion cell)
mENK	–	Metionin-enkefalin
mRNA	–	Mediátorová RNA (Messenger RNA)

NT	–	Neurotensin
P1	–	Postnatální den 1
PBR	–	Periferní benzodiazepinový receptor
PCR	–	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
PVN	–	Paraventriculární jádro (Paraventricular nucleus)
RHT	–	Retino hypotalamický trakt
RNA	–	Ribonukleová kyselina
RT	–	Reverzní transkriptáza
RT-qPCR	–	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Quantitative reverse transcription PCR)
SCG	–	Superiorní cervikální ganglion (Superior cervical ganglion)
SCN	–	Suprachiasmatické jádro (Suprachiasmatic nucleus)
T	–	Délka periody vnějšího cyklu
$\tau$	–	Délka endogenní periody
VGAT	–	Vezikulární GABA transportér
VIP	–	Vazoaktivní intestinální polypeptid (Vasoactive intestinal polypeptide)
vl-SCN	–	Ventrolaterální část suprachiasmatického jádra (Core of suprachiasmatic nucleus)
Zeitgeber	–	Externí synchronizátor
ZT	–	Čas s odkazem na Zeitgeber (Zeitgeber time)

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cirkadiánní systém.....	2
2.1	Co je cirkadiánní systém.....	2
2.2	Molekulární mechanismus hodinové smyčky .....	3
2.3	Hierarchie cirkadiánního systému savců a význam SCN .....	4
2.4	Morfologie SCN .....	6
2.5	Intercelulární komunikace neuronů SCN .....	6
2.6	Eferentní výstupy SCN .....	10
2.7	Ontogenetický vývoj cirkadiánního systému .....	14
3	GABA ve vývoji mozku .....	18
3.1	Role GABA ve vývoji SCN.....	18
3.2	GABAergní neurony ve vývoji předního mozku .....	20
4	Benzodiazepiny .....	23
4.1	Farmakokinetika benzodiazepinů .....	24
4.2	Mechanismus působení benzodiazepinů a souvislost s GABA.....	27
5	Cíle práce .....	31
6	Metodika .....	32
6.1	Experimentální paradigma.....	32
6.2	Izolace RNA .....	32
6.3	Přepis RNA do cDNA .....	33
6.4	Kvantitativní real-time PCR .....	33
6.5	Analýza dat a statistické vyhodnocení.....	34
7	Výsledky .....	35
7.1	Hipokampus P18.....	35
7.2	Čichové laloky P18.....	38
7.3	Frontální kortex P18 .....	41
7.4	Hipokampus P60.....	44
7.5	Čichové laloky P60.....	47
7.6	Frontální kortex P60 .....	50
8	Diskuze .....	53
8.1	Experimentální paradigma.....	53
8.2	Cirkadiánní rytmus genové exprese kontrolní skupiny .....	54

8.3	Změny v expresi a rytmu genů po podání CZP .....	55
8.4	Rozdíly mezi strukturami a kohortami po podání CZP.....	56
8.5	Citlivost genové exprese na CZP.....	57
9	Závěr .....	59
10	Použitá literatura .....	60

# 1 Úvod

Benzodiazepiny (BDZ) představují skupinu farmak, která bývají již od 70. let 20. století předepisována při epilepsii, úzkostných stavech, nespavosti, proti bolesti nebo jako anestetika. Jejich užití na takto široké spektrum patofyziologických a fyziologických stavů je založeno na relativně nespecifickém působení, kdy dochází k systémové potenciaci GABAergního přenosu.

Krátkodobé užívání BDZ, tedy zhruba do 4 týdnů, je považováno za bezpečné. V klinické praxi toto doporučení nebývá vždy dodržováno a jejich chronické užívání, či kombinace s některými antidepresivy, představuje řadu zdravotních rizik. Tento problém je o to významnější, jelikož celosvětově dosahuje prevalence užití BDZ vysokých hodnot, které vykazují rostoucí trend (Bais et al., 2020; Lim et al., 2020). Jedno ze zmíněných rizik představuje u člověka užívání BDZ v kritické vývojové periodě, tedy během prvních měsíců a let života.

U všech savců hraje kyselina  $\gamma$ -aminomáselná (GABA) v časně ontogenezi zásadní roli při vývoji CNS. V embryonálním stádiu se GABA, v té době excitační neuropřenašeč, stává hlavním iniciátorem procesu neurogeneze. V období okolo porodu se GABA postupně stává inhibičním neuropřenašečem, díky změně v intracelulárním složení neuronů, a její role v neurogenezi se snižuje. Ovšem vývoj GABAergního systému přetrvává ještě po porodu. Vývoj cirkadiánního systému je významnou měrou závislý na vývoji GABAergního systému.

I v dospělosti představuje GABAergní signalizace nedílnou součást cirkadiánního systému. Generování cirkadiánního rytmu u savců probíhá v každé jednotlivé buňce pomocí několika vzájemně propojených transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček hodinových genů. Jelikož výstupní rytmy tohoto molekulárního mechanismu mají v každé buňce jinou periodu a fázi, využívají savci k jejich synchronizaci specializovanou mozkovou strukturu – suprachiasmatická jádra (SCN). Jedním z hlavních aktérů intercelulární synchronizace SCN je GABA. Jeden z výstupních signálů z SCN, vedoucích do ostatních částí CNS i periferních oblastí, je také zprostředkován pomocí GABA.



## 2 Cirkadiánní systém

### 2.1 Co je cirkadiánní systém

Cirkadiánní systém vznikl jako odpověď organismů na opakující se změny ve vnějším prostředí, které jsou důsledkem 24 hodin trvající rotace Země kolem své osy. Díky informaci o denní době se mohou organismy přizpůsobit denně se opakujícím podmínkám a událostem, což je ve světě, plném nepředvídatelných událostí, kritickou podmínkou pro prosperitu a přežití. Endogenní biologické hodiny se vyvinuly již pravěkým bakteriím a v různých podobách na molekulární úrovni je tento koncept zakonzervován až po člověka. Podstatou generování cirkadiánních rytmů fylogeneticky pokročilejšími endogenními hodinami je několik vzájemně propojených transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček hodinových genů a jejich proteinů. U pokročilejších organismů se cirkadiánní systém rozvinul na anatomické úrovni i do jednoho nebo několika specializovaných orgánů (pacemakerů; oscilátorů), které určují rytmus zbývajících tkání. Endogenní podstata biologických hodin umožňuje organismu udržet si přehled o čase, i když se nachází v prostředí, kde nemá žádný referenční signál o denní době.

Základními parametry rytmu jsou perioda, mezor, amplituda, fáze a akrofáze. Perioda je doba trvání jednoho cyklu, přičemž je zpravidla měřena jako doba od vrcholu jednoho cyklu k vrcholu dalšího cyklu, ale může být měřena z libovolného bodu křivky. Mezor je aritmetickým průměrem hodnot zkoumaných veličin v průběhu cyklu, stanovuje tak „baseline“. Amplituda pak značí velikost veličiny od mezoru k maximu či minimu v rámci cyklu. Fáze rytmu je okamžitý stav měřeného parametru v rámci periody, představuje relativní časový bod vůči referenční hodině. Akrofáze je fází či časem, ve kterém dosahuje sledovaná veličina maximální hodnoty (Kuhlman et al., 2018).

Rytmus lze nazvat „cirkadiánním“, pokud má oscilace periodu ( $\tau$ ) přibližně 24 h a pokud přetrvává za stálých podmínek, jimiž jsou stálá tma (v literatuře „dark – dark“ či DD) nebo v některých případech stálé světlo (v literatuře „light – light“ či LL). Pokud se rytmus neudrží za stálých podmínek, znamená to, že je rytmus řízen externím synchronizátorem (Zeitgeber) a jedná se o rytmus „denní“. V případě, že je organismus v neperiodickém prostředí a tedy, že Zeitgeber není k dispozici, endogenní oscilátor řídí rytmus podle své  $\tau$ , čemuž se říká, že rytmus „volně běží“. Délka  $\tau$  se liší podle druhu organismu, přičemž bývá  $24 \pm 1,5$  h (člověk:  $\tau = 24,5$  h; potkan:  $\tau = 24,4$  h; myš:  $\tau = 23,4$  h). Naopak pokud Zeitgeber je k dispozici, je podle něj synchronizován endogenní oscilátor tak, aby  $\tau$  bylo shodné s  $T$  – tedy periodou vnějšího cyklu. Podmínky, jimiž bývají organismy mimo laboratorní prostředí

běžně vystaveny představují periodické střídání světla a tmy (v literatuře „light – dark“ či LD), přičemž čas je v nich s odkazem na geofyzikální podstatu značen jako ZT (Zeitgeber time). ZT0 (= ZT24) značí začátek dne, a tedy začátek světelné fáze, ZT12 zpravidla značí začátek noci, a tedy temnostní fáze. Avšak ne vždy trvá den 12 h a noc 12 h, což je dáno např. následkem změny délky fotoperiody v průběhu roku. Tomu je pak přizpůsobeno značení světelné a temnostní fáze. Druhým způsobem měření času je s odkazem na vnitřní synchronizátor, pokud je organismus v neperiodickém prostředí. Čas se pak značí jako CT (Circadian time), kdy CT0 znamená počátek subjektivního dne, CT12 znamená počátek subjektivní noci, přičemž zde je na rozdíl od ZT vždy formát 12:12. Pokud je organismus během své subjektivní noci vystaven světelnému pulzu, nastává pak fázový posun. Při světelném pulzu na počátku subjektivní noci dochází k fázovému zpoždění, což znamená, že v dalším cyklu se stav měřeného parametru o určitý čas oddálí. Naopak při světelném pulzu na konci subjektivní noci dochází k fázovému předběhnutí a během dalšího cyklu začíná rytmus dříve. V obou případech je velikost fázového posunu úměrná velikosti světelného pulzu a současně mezidruhově odlišná (Kuhlman et al., 2018).

## 2.2 Molekulární mechanismus hodinové smyčky

Molekulární mechanismus cirkadiálních hodin je založen na několika vzájemně závislých transkripčně-translačních zpětnovazebných smyčkách. První a pro fungování hodinového mechanismu nejzásadnější smyčka je tvořena dvěma dimery. Jedním je heterodimer proteinů CLOCK a BMAL1, který slouží po přesunu z cytoplazmy do buněčného jádra jako transkripční aktivátor a nasedá na E-box, promotorovou sekvenci DNA, čímž aktivuje transkripci genů *Per* a *Cry* (Gekakis et al., 1998). Proteiny PER1 a CRY tvoří další heterodimer této smyčky a po vstupu do jádra inhibují aktivitu CLOCK a BMAL1. *Cry* je transkribován ve dvou isoformách, přičemž každá má trochu odlišnou afinitu k PER (Kume et al., 1999). Stabilita dimeru PER1 a CRY je ovlivněna kasein kinázou epsilon (CKI $\epsilon$ ), jež s dimerem tvoří komplex a fosforyluje PER. Fosforylovaný PER je poté rychleji degradován, čímž je zkrácena doba inhibice E-boxu dimerem PER1 a CRY, celá smyčka probíhá rychleji a je tak zkrácena doba trvání cirkadiálního cyklu. CKI $\epsilon$  je tedy jedním z hlavních regulačních mechanismů chodu molekulárních hodin (Lee et al., 2001).

Ve druhé smyčce hrají hlavní roli faktory *Rev-erba* (značen také *Nr1d1*) a *ROR $\alpha$* , jejichž transkripce je aktivována dimerem CLOCK/BMAL1. REV-ERB $\alpha$  v jádře nasednutím na sekvenci RORE inhibuje transkripci *Bmall* (Preitner et al., 2002). Kromě toho REV-ERB $\alpha$  slouží jako jaderný receptor, který je jedním z výstupních signálů hodinového molekulárního

mechanismu. V závislosti na výši hladiny REV-ERB $\alpha$  je poté regulována transkripce mnoha dalších genů. Ačkoliv má takto významnou roli, dvojitým knock-outem bylo zjištěno, že nemá zásadní vliv na chod první cirkadiální smyčky (Ikeda et al., 2019). Na sekvenci RORE nasedá kromě REV-ERB $\alpha$  i protein ROR $\alpha$ , který naopak podporuje transkripci *Bmal1*. Oba tyto proteiny spolu kompetují o vazebné místo na RORE. Oba jsou taktéž exprimovány v tkáňově specifických isoformách – REV-ERB ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) a ROR ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (Guillaumond et al., 2005).

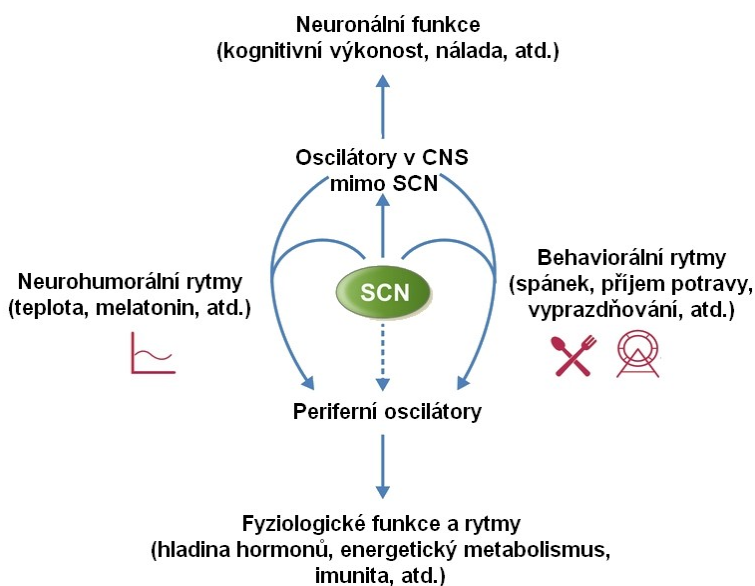
Třetí hodinový smyčka se vyznačuje kompeticí DBP s NFIL3 (E4BP4). Nasednutím CLOCK a BMAL1 na E-box kromě aktivace již výše zmíněných transkriptů dochází také k transkripci *DBP*. Protein DBP poté podporuje transkripci *Per*, ale současně je zpětně inhibován dimerem PER/CRY (Yamaguchi et al., 2000). Transkripce *DBP* je umožněna i nasednutím transkripčního aktivátoru na sekvenci zvanou D-box, čehož je samo DBP schopno. O vazebné místo ale soupeří s NFIL3. Oba tyto proteiny jsou dalšími vstupními a výstupními místy do a z molekulárního hodinového mechanismu (Yoshitane et al., 2019).

Zkoumáním myšního genomu bylo zjištěno, že hodinami řízené geny (CCG, z angl. clock-controlled genes, tj. geny, jejichž promotory obsahují E-box, RORE nebo D-box) se nacházejí v každé tkáni organismu. Exprese většiny těchto genů i jejich funkce je tkáňově specifická. Nejvyšší zastoupení CCG je v metabolicky aktivních tkáních jako jsou játra a ledviny, v nich je exprimováno 16 %, respektive 13 % CCG. Naopak mozkové struktury mají nejnižší množství CCG a to zhruba 4 % a ve zbylých tkáních organismu se zastoupení pohybuje v rozmezí těchto hladin. V tomto výzkumu se také zjistilo, že cílem většiny farmaceutických látek jsou hodinami řízené geny (Zhang et al., 2014).

### **2.3 Hierarchie cirkadiálního systému savců a význam SCN**

Struktury generující a udržující rytmy se nazývají oscilátory. Lze je rozdělit na autonomní (sebeudržující), semiautonomní a otrocké oscilátory podle toho, zda rytmus samy generují, anebo pouze udržují rytmus udávaný jinou strukturou. V případě savců je centrálním autonomním oscilátorem SCN. Semiautonomní si udržují svůj rytmus v závislosti na SCN, ale bývají synchronizovány i dalšími zeitgebery, díky čemuž si v případě potřeby dokáží udržet jednotný rytmus. Otročné oscilátory toto neumí a pokud nejsou seřizeny hlavním oscilátorem, neudrží si jednotný rytmus.

Potvrzením, že SCN jsou opravdu autonomním oscilátorem, byla studie, ve které léze SCN systlu zlatavých způsobila úplné zrušení jejich cirkadiálního rytmu. Centrální autonomní oscilátor je seřizován v závislosti na externích podmínkách, přičemž určujícím synchronizátorem – zeitgeberem – je světlo (Zucker et al., 1983). SCN je neuronálně či humorálně propojeno s dalšími mozkovými strukturami a periferními orgány, přičemž nastavuje jejich molekulární hodinový mechanismus do odpovídající fáze (obr. 1: Begemann et al., 2020). I dvě další struktury – retina a čichové laloky – jsou autonomními oscilátory, avšak na rozdíl od SCN nemají výstupní signál, jenž by synchronizoval ostatní struktury. V případě retiny dochází ke světelné synchronizaci stejně jako u SCN, což z ní činí autonomní oscilátor. Při odpojení od SCN dokáže retina udržet svůj rytmus několik dalších dní (Tosini and Menaker, 1996). Čichové laloky dokáží udržet svůj rytmus i po dobu několika týdnů od přerušení spojení s SCN. Laloky tedy fungují autonomně, ale SCN je potřeba k prvotnímu navození jejich rytmu (Granados-Fuentes et al., 2004).



*Obr. 1* Hierarchie oscilátorů a jejich hlavní funkce (Begemann et al., 2020) Centrální autonomní oscilátor SCN určuje rytmus semiautonomních a otrockých oscilátorů. SCN synchronizuje další mozkové struktury ve většině případů přes synaptické spoje a v menší míře pomocí humorální signalizace. Některé z těchto struktur, např. epifyza, poté synchronizují periferní oscilátory, což probíhá především humorální cestou.

Hodiny semiautonomních oscilátorů jsou kromě výstupu z SCN seřizovány i dalšími zeitgebery. Hlavní z nich představuje časování příjmu potravy. Tento Zeitgeber naprosto obchází hlavní oscilátor SCN, při jehož poškození dokáže u savců navodit synchronizaci metabolických orgánů a chování (Damiola et al., 2000). Na periférii představují tento typ oscilátoru např. plíce či játra. V CNS se výše zmíněný mechanismus uplatňuje i při synchronizaci dorzomediálního jádra, jež je taktéž jedním ze semiautonomních oscilátorů. Dalším je obloukové jádro hypotalamu, které si při odpojení od SCN dokáže zachovat silné

oscilace. Posledním známým semiautonomním oscilátorem v CNS je habenula, která pomocí svého propojení s retinou obchází SCN (Dibner et al., 2010).

Většina tkání a struktur těla není schopna generovat vlastní jednotný rytmus, což z nich činí otrocké oscilátory. Buňky těchto tkání sice na základě svých molekulárních hodin generují rytmus, ale bez signalizace z SCN jej nejsou schopny sjednotit. Mezi otrocké oscilátory se řadí mj. i frontální kortex a hipokampus (Dibner et al., 2010).

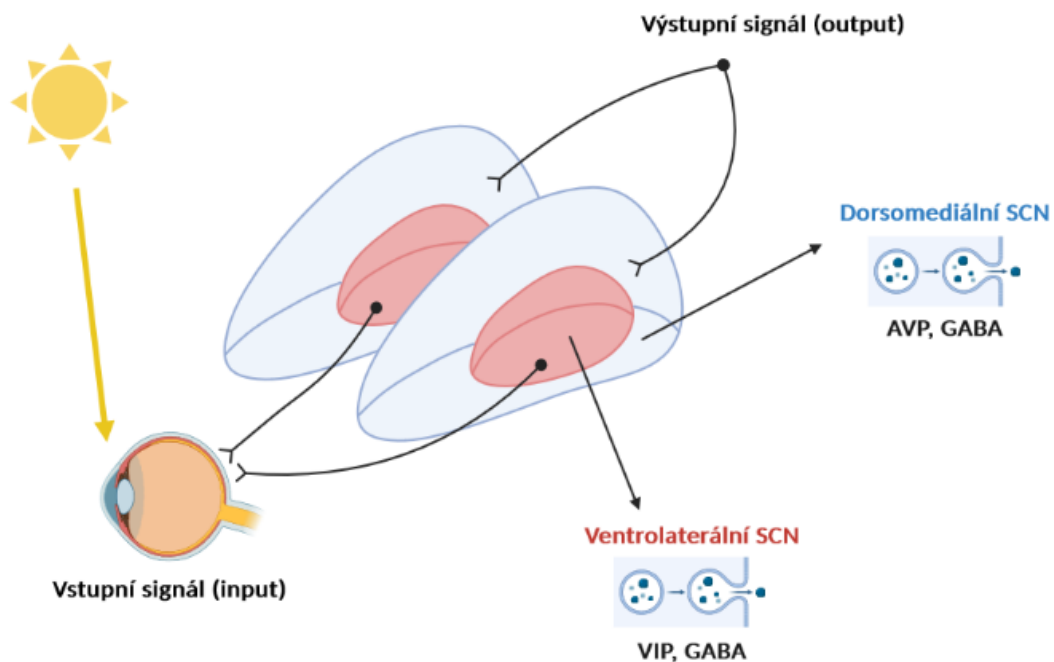
## **2.4 Morfologie SCN**

SCN jsou párová struktura, jež se nachází nad optickým chiasmatem v anteriorní části hypotalamu. Každé z jader je tvořeno přibližně 10.000 neurony a v sagitálním řezu připomíná ležící hrušku. Buňky se rozdělují na dvě hlavní populace, přičemž dorsomediálně ležící buňky tvoří tzv. slupku SCN (shell; dále značeno jako dm-SCN), zatímco ventrolaterálně ležící buňky tvoří tzv. jádro SCN (core; dále značeno jako vl-SCN) (Abrahamson a Moore, 2001). Aferentní vstup do této struktury je veden z retiny a extraretinálních oblastí, tedy z limbického systému, hypotalamu, rafeálního jádra a paraventriculárního talamu, svazky aferentních axonů jsou topograficky organizovány v SCN a přilehlých oblastech (Moga a Moore, 1997). Primární vstup (z hlediska synchronizace SCN) vede ze sítnice oka. Světelný signál je zachycen, kromě tyčinek a čípků, také fotoreceptory vnější retiny – specificky populací vnitřně fotosenzitivních gangliových buněk sítnice (ipRGC) (Moore a Lenn, 1972). Tyto buňky integrují signály ze všech tří druhů fotoreceptorů a jejich axony tvoří neobrazovou dráhu nazývanou retino-hypotalamický trakt (RHT), který vede kromě SCN také do dalších struktur hypotalamu a do mozkového kmene. Jedná se tedy o odlišnou dráhu, než tu, jež přenáší informace o světelném signálu do talamu a následně do okcipitálního mozkového laloku (Moore et al., 1995).

## **2.5 Intercelulární komunikace neuronů SCN**

Spřažení neuronové sítě SCN probíhá na několika úrovních: sekrecí a navázáním specifických neuropeptidů, GABAergní signalizací, změnou elektrického potenciálu skrz vodivé spoje (gap junctions) nebo pomocí astrocytů (Vadnie a McClung, 2017). Buňky SCN jsou sekrečně velmi aktivní, většina z nich sekretuje alespoň některou z následujících látek: GABA, arginin-vazopresin (AVP), vazoaktivní intestinální peptid (VIP), peptid uvolňující gastrin (GRP), angiotensin II (AII), metionin-enkefalin (mENK), neurotensin (NT), kalretinin (CALR), kalbindin (CALB). Populace buněk dm-SCN sekretuje jako hlavní neuropeptid AVP a dále mENK a AII. Většina těchto neuronů svými výběžky opouští dorsální část SCN a

směřují ke třetí mozkové komoře. Ve vl-SCN dochází především k sekreci VIP a v menším množství GRP a CALR a do neuronů této části proudí světlem indukované signály z retiny a na světle nezávislé signály z rafeálního jádra. Sekrece GABA, NT a CALB pak probíhá v celém SCN bez významnějších prostorových rozdílů (Abrahamson a Moore, 2001). Nejvíce sekretovanými neuropeptidy, a současně nejvíce významnými pro tvorbu cirkadiálních rytmů, jsou tedy AVP v dm-SCN a VIP ve vl-SCN, (i mezi těmito oblastmi však dochází k menšímu překryvu), proto budou přiblíženy v následujících odstavcích. Na obr. 2 je zobrazeno, jakým způsobem je organizována signalizace SCN.



*Obr. 2 Organizace signalizace SCN (Dušek, 2023). Světelný signál vstupuje do sítnicových ipRGC buněk. Z nichž akční potenciál, jež putuje přes retinohypotalamický trakt, aktivuje buňky vl-SCN, které sekretují neuropeptidy VIP, GRP, CALR a neuropřenašeč GABA. Skupinou těchto buněk je následně aktivováno dm-SCN, které spouští sekreci neuropeptidů AVP, mENK, AII a neuropřenašeče GABA. Výstupní signál z SCN v podobě AVP a GABA poté synchronizuje další oblasti nervové soustavy.*

Za intercelulární komunikaci neuronů SCN je odpovědný zejména VIP, jenž je sekretovaný především vl-SCN. Řada experimentů ukázala, že VIP je zásadní pro udržení cirkadiálních rytmů. Knockoutování jeho receptoru VPAC2 u myších modelů způsobilo ztrátu rytmické transkripce hodinových genů *Per*, *Cry* a také neuropeptidu *Avp*, což mělo za následek kompletní ztrátu cirkadiálního rytmu v celém organismu (Harmar et al., 2002). Podobný experiment ukázal, že ze 70 % všech rytmicky aktivních neuronů v SCN je rytmus 30 % neuronů SCN závislý na VIP. Molekula tohoto neuropeptidu slouží v SCN ke dvěma

hlavním účelům – prvním je nastolení a udržování rytmu u neuronů, jež samy tvoří rytmus (non-pacemaking), druhým účelem je synchronizace neuronů tvořících rytmus (pacemaking) k jednotnému rytmu (Aton et al., 2005). Množství sekretovaného VIP je úměrné množství intenzity světla dopadajícího na retinu. Vzestup tvorby VIP nastává i při světelném pulzu během subjektivní noci daného organismu, což způsobuje fázový posun cirkadiálních hodin. Množství a čas sekrece VIP jsou tak závislé na světelných podmínkách (Jones et al., 2018). Infekce myších modelů specificky zkonstruovaným virem ničícím VIP neurony SCN ukázala odlišné změny funkce cirkadiálního systému v závislosti na ontogenetickém stádiu jedince. Delece u mláďat v postnatálním 6. dni způsobila systémovou ztrátu rytmicity, zatímco u dospělých jedinců došlo pouze ke zkrácení cirkadiální periody. Navíc se u obou skupin se prokázalo snížení amplitudy rytmů krevní hladiny glukokortikoidů. Neuropeptid VIP účinkuje v ontogenetickém vývoji a jeho narušením dochází ke ztrátě cirkadiálního rytmu (Mazuski et al., 2020).

V intercelulární komunikaci hraje roli také neuropeptid AVP, jež je sekretován buňkami dm-SCN. Množství SCN neuronů produkujících AVP je dvojnásobné oproti neuronům produkujícím VIP (Abrahamson and Moore, 2001). Na tkáňovém řezu křeččím SCN se ukázalo, že až 50 % neuronů této struktury reaguje na AVP v závislosti na fázi cirkadiálního rytmu. Tento neuropeptid je agonistou V1a, V1b a V2 receptorů (Liou a Albers, 1989). Jednou z jeho funkcí je zajištění stability cirkadiálních hodin. To bylo prokázáno na myších modelech, kdy po nuceném fázovém posunu (jetlagu) byly geneticky či farmakologicky vyřazeny receptory V1a a V1b. Následkem toho se urychlila synchronizace a nastolení nové cirkadiální fáze (Yamaguchi et al., 2013). Další funkcí je zvýšení amplitudy buněk SCN, následkem čehož je zvětšena i síla výstupního signálu do dalších mozkových struktur. Lze to ilustrovat na příkladu kmene potkanů bez funkční tvorby AVP, jehož jedinci mají nižší amplitudou spánkových rytmů, zejména hlubokého spánku (Brown a Nunez, 1989; Mihai et al., 1994). Neurony SCN dokáží synchronizovat svůj rytmus v aktivitě s dalšími blízkými buňkami. Následkem toho dochází k lepšímu spřažení cirkadiálního rytmu buněk SCN, což se projevuje zpřesněním a zesílením jeho výstupního signálu (Mieda et al., 2015). V rámci SCN tvoří AVP neurony synapse s dalšími buňkami vlastní populace, ale i s VIP neurony a dalšími populacemi (Romijn et al., 1997). Imunohistochemickými metodami na řezu myšího SCN bylo zjištěno, že vrchol tvorby AVP nastává uprostřed světelné fáze cirkadiálního cyklu a je tedy podobný vrcholu tvorby PER1. Podobný profil sekrece AVP jako u SCN se vyskytuje v paraventriculárním jádře hypotalamu (PVN) a v supraoptickém jádře, což značí, že rytmická sekrece AVP v těchto dvou strukturách je závislá na aktivitě

SCN (Yoshikawa et al., 2015). Myší SCN bylo také zkoumáno imunohistochemickými metodami, které ukázaly, že axony AVP neuronů, kromě propojení s dalšími mozkovými strukturami, směřují ke 3. mozkové komoře. Tam dochází k sekreci AVP poblíž ependymální stěny nebo přímo do cerebrospinální tekutiny. Podle hladiny AVP v cerebrospinální tekutině se synchronizují další mozkové struktury (Taub et al., 2021).

K intercelulární komunikaci v rámci SCN přispívá značnou měrou také neuropřenašeč GABA, který ovlivňuje výsledný cirkadiánní rytmus několika možnými způsoby, a dokonce i jeho signalizace probíhá různými způsoby. Ve studii na potkanech se zjistilo, že GABA a glutamát dekarboxyláza – enzym katalyzující syntézu GABA z glutamátu – jsou různě aktivní v závislosti na fázi cirkadiánního rytmu, a to jak v SCN, tak i v dalších částech mozku. Rytmicita byla zachována za normálních podmínek střídání světla a tmy, ale i v neperiodických podmínkách, což indikuje její endogenní původ (Aguilar-Roblero et al., 1993).

Prvním způsobem účinku GABA je synchronizace cirkadiánních rytmů jednotlivých neuronů tak, aby byl výsledný rytmus celého SCN co nejvíce jednotný. Mechanismus spočívá ve snížení frekvence akčních potenciálů neuronů SCN během akrofáze rytmu jejich elektrické aktivity. Vazba GABA na receptor  $GABA_A$  způsobuje sjednocení frekvence akčních potenciálů blízkých neuronů, snižuje frekvenci aktivnějších neuronů na frekvenci méně aktivních neuronů (Aton et al., 2006; Liu a Reppert, 2000). Díky tomuto mechanismu může GABA modulovat mezidenní rozdíly ve velikosti amplitudy. Nedávná studie na myších s knockoutem genu vezikulárního GABA transportéru (VGAT) uvádí, že nefunkční  $GABA_A$  signálizace způsobuje větší rozdíly ve velikosti cirkadiánních rytmů mezi jednotlivými dny a také celkové snížení velikosti výstupního signálu SCN. Bez synchronizace neuropřenašečem GABA je totiž rytmus každého neuronu v odlišné fázi a výstup, jež je průměrem amplitudy rytmů všech neuronů, se tak v jednotlivé dny liší. Další studie ovšem uvádí, že GABA naopak zvětšuje rozdíly amplitudy mezi jednotlivými dny, a že je za to spíše odpovědný efektorový  $G_{i/o}$  proteinu receptoru  $GABA_B$ , a ne nutně receptor samotný. Ke zvětšení mezidenních rozdílů amplitudy nedochází za stálých podmínek, ale při návratu do nich z periodického prostředí (Aton et al., 2006; Ono et al., 2019).  $GABA_B$  či její downstreamové efekторы pozměňují rozdíly mezi amplitudou jednotlivých cyklů. Zda dochází ke zmenšení nebo naopak zvětšení rozdílů se odvíjí od toho, jestli se jedná o periodické či neperiodické prostředí.

Signalizační dráha GABA funguje v SCN paralelně s VIP dráhou a obě zajišťují jednotnost tkáňového rytmu SCN, avšak liší se v jeho negativním či pozitivním ovlivnění za



jistých podmínek. Zda GABA synchronizuje nebo desynchronizuje neurony k jednotnému rytmu, závisí na tom, v jakých fázích jsou obě jádra SCN vůči sobě. V polarizovaném stavu, tedy když je vl-SCN ve velkém fázovém posunu vůči dm-SCN a vice versa, působí GABA synchronizačně. Ve stavu, kdy je mezi vl-SCN a dm-SCN malý nebo žádný fázový posun vůči sobě, působí GABA desynchronizačně. Ve vztahu GABA k VIP to znamená následující. Během synchronizačního působení GABA dochází k synergické interakci s VIP, zatímco při desynchronizačním působení GABA funguje jako antagonist k VIP, jelikož VIP působí vždy synchronizačně (Evans et al., 2013).

Signalizace pomocí GABA probíhá v SCN na dvou úrovních: fázická a tonická. Fázická spočívá v uvolnění velkých kvant GABA po vyvolání akčního potenciálu u příslušného GABAergního neuronu. Tonická signalizace nastává pouze u některých GABAergních neuronů a to poté, co byly po delší dobu drážděny, ale nedošlo k překročení prahového potenciálu. Tonická signalizace probíhá jako několikanásobné uvolňování menších kvant GABA po delší dobu. Tonická signalizace může být neuronu navozena buď na synapsi vedoucí z RHT nebo na synapsi s GABAergním neuronem SCN. Tímto způsobem může GABAergní neuron pálit nezávisle na svých vnitřních hodinách, a dokonce je může posunout, jelikož specifickým mechanismem změny vnitrobuněčnou koncentraci  $Ca^{2+}$  iontů. To neplatí pro fázickou signalizaci, jež je na vnitřních hodinách závislá. Zmíněný mechanismus umožňuje jednotnější výstup GABAergních neuronů do dalších částí mozku, aniž by se přenastavovaly molekulární hodiny jednotlivých neuronů (DeWoskin et al., 2015).

## 2.6 Eferentní výstupy SCN

Eferentní výstupy SCN ovlivňují de facto celé fungování organismu. Jedná se především o ovlivnění tělesné homeostázy, sekrece hormonů, chování a kognice, ale i dalších mozkových struktur a periferních tkání či orgánů.

Cirkadiánním výstupem je ovlivněna homeostáza organismu a základní životní funkce – reguluje metabolismus, tělesnou teplotu či autonomní nervový systém. V závislosti na cirkadiánní fázi je ovlivněna bazální krevní hladina glukózy díky regulované sekreci insulinu z pankreatu (Kalsbeek a Strubbe, 1998). Propojením SCN s hypothalamem je přímo řízena tělesná teplota (Scheer et al., 2005). Aktivita parasymptatiku je ovlivněna následovně – výstup z SCN reguluje aktivitu vagiálního nervu a tím i moduluje klidovou srdeční frekvenci (Scheer et al., 1999). Taktéž aktivita sympatiku je ovlivněna cirkadiánním systémem (Nijima et al., 1992). SCN svými výstupy ovlivňuje i celou řadu dalších metabolických dějů a nesprávná

funkce cirkadiálních hodin je jednou z příčin moderních civilizačních chorob jako je diabetes 2. typu, obezita či hypertenze (Kalsbeek et al., 2006).

Sekrece hormonů je především výsledkem stimulace hypotalamu a hypofýzy. Inervace PVN, dorsomediálního hypotalamu či mediální preoptické oblasti umožňuje sekretovat kortikoliberin, tyreotropin uvolňující hormon, tyreoidní hormon a gonadoliberin v různou denní dobu (Kalsbeek and Buijs, 2002). Propojení SCN s preoptickou oblastí také umožňuje cirkadiálně řízenou sekreci hormonu uvolňujícího luteinizační hormon (de la Iglesia et al., 2003). Od SCN vedou k PVN axony neuronů, které na synapsi uvolňují AVP. Touto dráhou je stimulována HPA osa, jež ústí v aktivaci kůry nadledvinek a sekreci kortikosteronu, což je obzvláště důležité pro probuzení organismu (Kalsbeek and Buijs, 2002).

Další způsob regulace cyklů spánku a bdělosti je umožněn pomocí přímého spoje SCN s ventrolaterálním preoptickým jádrem hypotalamu (Sun et al., 2001). Významným typem chování, na jehož základě bývá hodnoceno fungování cirkadiálního systému při behaviorálních experimentech, je lokomoční aktivita. Její časování je přímo závislé na fungování SCN (Vogelbaum a Menaker, 1992). Ačkoliv příjem potravy slouží jako Zeitgeber obcházející SCN, tato struktura může ovlivňovat potravní chování díky sekreci látky zvané neuromedin-S, jež vyvolá v organismu potlačení hladu (Mori et al., 2005). SCN také uvolňuje do mozkomíšního moku vazopresin, který ovlivňuje sociální chování, např. schopnost rozpoznávat další jedince svého druhu, navazovat s nimi vztahy, případně míru agresivity jedince (Kruisbrink et al., 1987).

Kognitivní schopnosti jsou ovlivněny přímým či nepřímým propojením SCN s dalšími mozgovými strukturami. Hlavní úlohu v tom hraje dráha vedoucí z SCN do thalamických jader, skrz kterou je synchronizační signál předáván do korových oblastí a limbického systému (Kalsbeek et al., 1993). Cirkadiální rytmy ovlivňují schopnost zpracování informací hipokampem. Během světelné fáze dne se u hipokampálních neuronů zvyšuje synaptická plasticita a schopnost navodit dlouhodobou potenciaci. Tím dochází ke zvýšení schopnosti učit se a k účinnější tvorbě krátkodobé paměti. Naopak při narušení cirkadiálních rytmů se výrazně omezuje schopnost tvorby nových paměťových stop a jejich reaktivace (Fernandez et al., 2014; Rawashdeh et al., 2014). Během světelné fáze dne je vyšší výkonost nejen samotného hipokampu, ale je i účinnější předávání informací s dalšími strukturami. To lze ilustrovat na součinnosti hipokampu a olfaktorického laloku při ukládání pachových stop. Ovšem v neperiodickém prostředí se zvýšená aktivita olfaktorického laloku přesunuje do jiné fáze dne, což podtrhává jeho schopnost autonomního fungování (Tam et al., 2017). Funkční výstup z SCN je také důležitý pro správnou konsolidaci paměti. Účinnější přesun informací

z krátkodobé paměti hipokampu do dlouhodobé paměti korových struktur probíhá v temnostní fázi (Heller a Ruby, 2019). To se následně odráží na funkci dlouhodobé paměti, která v případě narušených cirkadiálních rytmů vykazuje sníženou schopnost vybavit si informace (He et al., 2020). Další kognitivní schopnosti jsou pak ovlivněny dráhami z SCN do korových oblastí. Nepřímý spoj vedoucí z SCN do frontální kůry pravděpodobně ovlivňuje pozornost či náladu v závislosti na cirkadiální fázi (Sylvester et al., 2002). Přes stejný spoj je v periodickém prostředí udržováno normální emoční a kognitivní chování, avšak v neperiodickém prostředí přes tento spoj dochází vlivem narušených cirkadiálních rytmů k rozvoji depresivního a úzkostného chování (Zhou et al., 2018).

Nakonec a především SCN reguluje tvorbu a sekreci melatoninu. Během dne je vyšší neuronální aktivita SCN, která způsobuje vyšší výlev neuropřenašeče GABA na synapsi s PVN. Dále je PVN excitačními synapsemi spojeno s intermediálním jádrem páteřní míchy, a to je zase excitačně propojeno se superiorním cervikálním gangliem (SCG). Z tohoto ganglia vedou postgangliová noradrenergická vlákna do epifýzy, kde v důsledku této excitace probíhá syntéza a sekrece melatoninu. Během dne je tedy díky GABAergní inhibici PVN z SCN epifýza inhibována a melatonin se netvoří, zatímco během tmy dochází k aktivaci epifýzy a systémové distribuci melatoninu (Larsen et al., 1998). Kromě této synchronizační regulace z SCN, je syntéza melatoninu citlivá na okamžité působení světla. Světlo v noci tlumí aktivační dráhu vedoucí z PVN a dochází k okamžitému poklesu syntézy melatoninu v epifýze (Reiter et al., 1986).

Melatonin se váže na MT1, MT2 a MT3 GPCR receptory, přičemž MT1 receptory aktivují  $G_{i/o}$  dráhu a MT2 spíše  $G_q$  dráhu. Melatoninové receptory se pravděpodobně vyskytují ve většině tkání organismu, do této doby byly kromě mozku potvrzeny také v řadě periferních tkání. Těmi jsou srdce, artérie, ledviny, játra, plíce, tenké střevo, nadledvinky, adipocyty, vaječníky, prostata, prsní žlázy, kůže a lymfocyty (Tordjman et al., 2017).

V periferních tkáních zastává melatonin mnoho rozličných funkcí. Avšak dochází zde ke kombinaci účinku lokálně sekretovaného melatoninu a toho, jenž je krví systémově distribuován z epifýzy. Spolu s rytmem tělní teploty a v souhře s dalšími hormony jako je kortisol a insulin, zajišťuje melatonin správnou časovou souslednost fyziologických procesů a pomáhá navozovat spánek (Cipolla-Neto and Amaral, 2018). Pro ilustraci je dále několik zajímavých příkladů. Melatonin reguluje kardiovaskulární funkce a krevní tlak (Scheer et al., 2004). Dále melatonin příznivě působí na imunitní systém díky stimulaci cytokinů, jež zvyšují odpověď (Miller et al., 2006). Detoxikuje organismus od volných radikálů a brání jej před oxidativním stresem (Reiter et al., 2005). Snižuje tvorbu oxidu dusnatého, čímž působí

protizánětlivě (Hardeland a Pandi-Perumal, 2005). V gastrointestinálním traktu stimuluje sekreci hlenu a regeneraci tkáně (Sjöblom et al., 2001). Zvyšuje odbourávání viscerálního tuku (Rasmussen et al., 1999). A v neposlední řadě zvýšením aktivity osteoblastů zvyšuje odolnost kosterního aparátu (Ladizesky et al., 2001).

Melatonin je také důležitý pro regulaci sezónního chování živočichů, například reprodukčního chování a fyziologie živočichů nebo pro indukci změn hmotnosti, a tedy i poměru tukové vůči svalové tkáni. Hlavní cílovou strukturou pro vazbu melatoninu při řízení sezónního chování je PVN (Bittman et al., 1991). V rámci sezónního chování je další cílovou strukturou rafeální jádro. Tam dochází k regulaci množství sekretovaného serotoninu podle délky fotoperiody, čímž je ovlivněno emociální chování. Na základě množství melatoninu, jež působilo na rafeální jádro živočicha v první sezóně jeho života, se utváří reaktivita rafeálního jádra k melatoninu po zbytek života (Green et al., 2015).

Hlavní význam melatoninu spočívá v synchronizaci cirkadiánních rytmů periferních tkání a některých mozkových struktur s hlavním pacemakerem SCN. Synchronizace periferních tkání je umožněna již zmíněnou krevní distribucí, zatímco mozkové struktury jsou synchronizovány melatoninem obsaženým v mozkomíšním moku (Lewy and Sack, 1989; Reppert et al., 1979). Ve funkci synchronizátoru melatonin slouží už během vývoje plodu, kdy synchronizuje jeho cirkadiánní systém podle matky (Houdek et al., 2015). Je třeba zmínit, že distribuce melatoninových receptorů se v mozku poměrně liší i mezi blízkými druhy savců, pravděpodobně je distribuce přizpůsobena životní strategii daného druhu (Masson-Pévet et al., 1994). U potkanů nejvyšší afinitu vykazují cirkumventrikulární orgány – median eminence hypothalamu (ME) a area postrema prodloužené míchy, zhruba poloviční afinitu vůči cirkumventrikulárním orgánům vykazuje SCN a čtvrtinovou afinitu thalamus. Všechny zmíněné struktury ale mají stále velmi vysokou afinitu. Naopak korové struktury a hipokampus vykazují velmi nízkou afinitu (Laudon and Zisapel, 1987; Weaver et al., 1989). Pro porovnání nám bližší druhy – primáti pavián a kočkodan – mají oproti potkanovi velmi odlišně rozložené melatoninové receptory v mozku, shodně jsou však hojně zastoupeny v cirkumventrikulárních orgánech. Oblast pars tuberalis hypofýzy, jež se nachází velmi blízko hypothalamické median eminence, vykazuje u primátů nejvyšší afinitu, přičemž obdobnou míru afinity vykazuje také posteriorní arterie Willisova okruhu. O třetinu nižší afinitu má choroidní plexus 4. mozkové komory a o dvě třetiny nižší afinitu má SCN. Zhruba jednu pětinu až jednu desetinu afinity vůči pars tuberalis má pak hypothalamus, hipokampus a frontální kortex, přičemž stále se jedná o vysoké míry afinity (Stankov et al., 1993).

## 2.7 Ontogenetický vývoj cirkadiálního systému

U lidského embrya se objevují první cirkadiální rytmy mezi 13. a 22. týdnem těhotenství. Zatímco ve 13. týdnu těhotenství (rané fetální období) ještě nebyla zaznamenána rytmicita v pohybech dýchacích a skeletálních svalů a v srdečním rytmu, ve 22. týdnu (pozdí fetální období) již embryo rytmicitu vykazovalo (de Vries et al., 1987). Avšak tato kapitola se zabývá zejména ontogenetickým vývojem cirkadiálního systému myši a potkanů, jakožto typických savčích modelů. U myši trvá gestace zhruba 20 dní, zatímco u potkanů kolem 22 dní, při srovnávání mezi těmito savčími modely je nutné informaci o dni určité události poměrově vztáhnout k délce gestace daného druhu. Hlavní milníky ontogenetického vývoje cirkadiálního systému potkana jsou zobrazeny na obr. 3 (Sumova et al., 2012).

Základním předpokladem pro vývoj cirkadiálního systému je funkční molekulární hodinový mechanismus. V tomto výzkumu bylo v myších oocytech pozorováno mRNA hodinových genů, které pocházelo od matky, a jenž se do oocytu dostalo během oogeneze. V procesu oogeneze byly produkty hodinových genů potřeba pro správné provedení meiózy. Po oplození pak produkty nenastavují rytmus nového jedince a mRNA tam zůstává jako reziduum. Hladina mRNA hodinových genů a současně i jejich produktů klesne na minimum dříve, než má embryo funkční transkripční mašinerii (Amano et al., 2009). Po fertilizaci a následném dělení buněk nastává diferenciaci do specifických buněčných linií. U myši embryonální buněčné line nebyla prokázána funkčnost molekulárního mechanismu cirkadiálních hodin, ale u následné neurální prekurzorové linie a neurální linie již byla nalezena rytmicita molekulárního hodinového mechanismu (Kowalska et al., 2010). Rytmicitu po diferenciaci potvrzuje i další výzkum na myších modelech. V něm se mimo jiné ukázalo, že oscilace jednotlivých buněk vymizely poté, co byly buňky pomocí specifických morfogenů dediferenciovány (Yagita et al., 2010). Nastartování molekulárního hodinového mechanismu v SCN bylo předvedeno na myších tkáňových kulturách metodou real-time imaging a jeho funkčnost se stanovovalo základě množství PER2 v jednotlivých buňkách. První rytmické buňky se objevily v tkáni poblíž SCN, v dorsálním hypotalamu, v embryonálním dni 13,5 (E13,5), zatímco v samotném SCN nebyla rytmická ještě žádná buňka. O den později, v E14,5, již polovina buněk SCN vykazovala rytmus a v E15,5 se už rytmicky projevovaly všechny buňky SCN, zatímco ve stejnou dobu v ostatních částech hypotalamu nebyly už žádné buňky rytmické. To naznačuje, že první rytmické buňky migrují z dorsálního hypotalamu do SCN. Že se jedná o rytmus jednotlivých buněk bylo potvrzeno zablokováním GABAergní a VIP signalizace, kdy buňky vykazovaly stejnou rytmicitu

(Carmona-Alcocer et al., 2018). Avšak dokud není rytmus jednotlivých buněk synchronizován, nelze jej označovat za funkční výstup.

Do doby, než je utvořeno SCN embrya s fungujícím výstupem, dodává potřebný rytmus mateřské SCN. To bylo ukázáno na křeččím modelu, kdy bylo mateřské SCN do E7 svými oscilacemi důležité pro vývoj plodu. Následně mateřské SCN do E14 sloužilo k určení rytmu embryonálního SCN (Davis a Gorski, 1988). U potkanů byla provedena v E7 denervace maternální epifýzy. Denervace způsobila desynchronizaci v příjmu tekutin embryi vůči kontrolním jedincům. To opět poukazuje na určení rytmu mateřským SCN v raném fetálním období. V tomto období je rytmus zárodku udáván velikostí hladiny matkou sekretovaného melatoninu (Bellavia et al., 2006).

U myši dochází k vývoji hypotalamu, jehož součástí je SCN, mezi E10 a E16. Neurony hypotalamu prolifерují v buněčné vrstvě obklopující 3. mozkovou komoru. Většina neuronů přemigruje do cílové pozice do jednoho dne (Shimada a Nakamura, 1973). Na myším modelu bylo také ukázáno, že formování SCN probíhá od E12 do E15 – morfologicky kompletní je tak 5 dní před porodem. Buněčné vrstvy se na sebe postupně od středu nabalují, tedy od vl-SCN až po dm-SCN. Po úspěšném zformování nastává migrace buněk v SCN, které pak vytvářejí odlišné buněčné populace (Kabrita and Davis, 2008). Potvrzení o tvorbě v těchto embryonálních dnech podává i další výzkum, kde byl růst SCN stanovován podle množství exprese homeoboxového genu *Six3* v kombinaci s dalšími specifickými morfogeny. První zvýšení jejich exprese bylo zaznamenáno v E12 a nárůst morfogenů pokračoval i v dalších dnech maturace plodu (VanDunk et al., 2011). Ačkoliv je vývoj SCN potkana morfologicky kompletní již v embryonálním stádiu, při udávání rytmu zůstává stále neaktivní.

Stále ještě nefunkční výstup v pozdních dnech embryogeneze vidíme na následujících výzkumech. Ve dni E19 bylo u potkana v SCN měřeno množství synaptických spojení pomocí markeru SYNAPSIN-1, to však bylo ještě téměř nulové (Moore and Bernstein, 1989). Taktéž u potkana a v E19 sice již bylo ve značné míře transkribováno mRNA hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Bmal1* a *Clock*, avšak bez rytmické aktivity. Exprese hodinových genů tedy probíhala, ale buňky ještě nebyly spřaženy pro jednotný výstup (Sládek et al., 2004). Ke stejné situaci dochází i na periférii, kdy se u myšního modelu v E18 nedokázal prokázat cirkadiánní rytmus v periferních orgánech (játra, ledviny, srdce), i když k expresi hodinových genů v těchto tkáních docházelo již dlouhou dobu (Dolatshad et al., 2010).

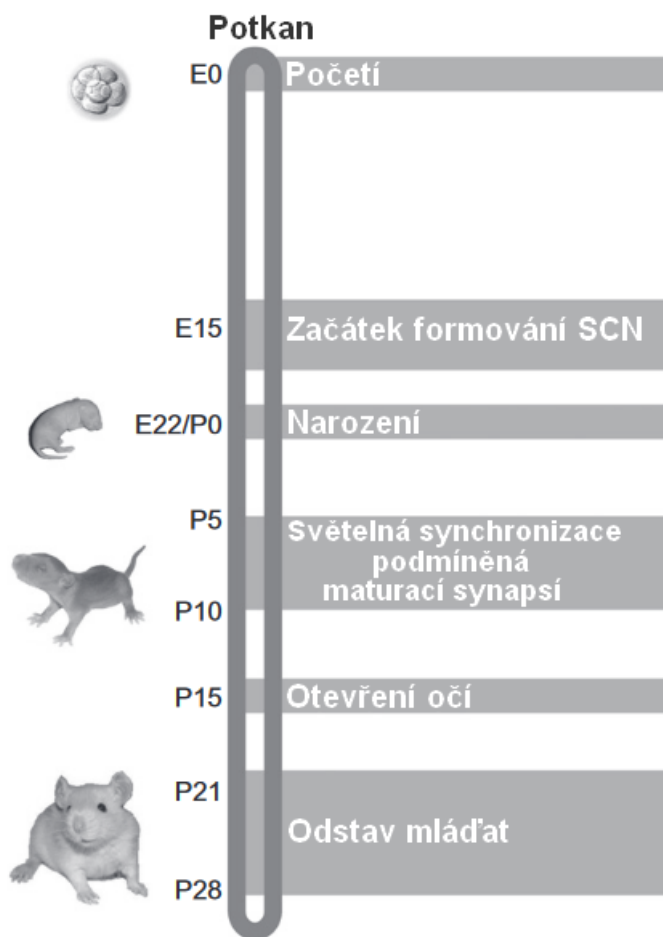
První zaznamenaný cirkadiánní rytmus celého SCN nastává u potkana v E20, přičemž rytmus dále přetrvával. Za použití značené <sup>14</sup>C-deoxyglukózy byl detekován rytmus v metabolické aktivitě SCN. Během subjektivního dne SCN vykazovalo aktivitu, zatímco v

subjektivní noci bylo SCN neaktivní. Tato aktivita embryonálního SCN byla zachována, i když byl cirkadiální rytmus matky uprostřed noci narušen světelným pulzem (Reppert and Schwartz, 1984). V této době, kdy SCN jako celek začíná mít jednotný výstup, dochází k hojně tvorbě nových synapsí. Současně proliferují astrocyty, což lze vidět na experimentu s potkany v E20, kdy se významně zvýšil počet radiálních glií a tento trend přetrvával až do postnatálního věku. U zdravých jedinců se v této periodě také zvyšuje počet synapsí mezi neurony a astrocyty (Munekawa et al., 2000).

Po porodu se již SCN vyznačuje morfologickou dozrálostí. V tomto stádiu od 3. postnatálního dne (P3) postupně dozrává exprese hodinových genů. Plynule se zvyšuje množství mRNA Per1, Per2, Cry1, Bmal1 a Clock až do P10, kdy se hladina ustálí (Sládek et al., 2004). Ve stejném časovém období se také postupně zvyšuje množství synaptických spojení mezi neurony SCN a od P10 se tvorba dalších synaptických spojení již definitivně zastavuje. I přesto SCN od tohoto okamžiku dále zvětšuje svoji velikost a během období adolescence se SCN stává o třetinu větší (Moore and Bernstein, 1989). Pro funkční zralost je důležitá synchronizace SCN světelným zeitgeberem. Tento proces nastává ihned po porodu. Vnitřně fotosenzitivní buňky sítnice (ipRGC) začínají po světelném impulsu růst svými axony ke SCN, s nímž se propojují do prvního týdne po porodu (P7). Do druhého týdne (P14) je následně dokončena bilaterální inervace (McNeill et al., 2011).

Pro jednotný cirkadiální výstup z SCN je potřeba synchronizace jeho buněk. Tak se děje v prvních dnech postnatálního vývoje, kdy začíná maturovat sekrece neuropeptidů SCN. V nočních hodinách je sekrece VIP odpovídající sekreci dospělého jedince již v P4, hladina denní sekrece tohoto neuropeptidu je hladině dospělého v P15. U neuropeptidu AVP dozrává sekrece do množství shodného s dospělci v P15 (Isobe a Muramatsu, 1995). Funkční výstup SCN lze vidět v následujícím experimentu, kdy na potkanech bylo zjištěno pomocí analýzy AANAT (aralkylamin N-acetyltransferáza; enzym rate-limiting reakce v kaskádě syntézy melatoninu), že mládě v P4 již tvoří dostatek melatoninu. Přesto ale dochází k postupnému růstu množství sekretovaného melatoninu až do dospělosti. V brzkých postnatálních dnech je již dostatečně zralý neuronální obvod vedoucí z SCN skrz PVN a SCG do epifýzy (Wongchitrat et al., 2012).

V novější studii provedené na myších se ukázalo, že ačkoliv je již vývoj SCN v této fázi dokončen, rozhodující vliv na synchronizaci periferních hodin mláděte mají, během postnatálního období, mateřské kojící návyky. Pomocí laktace jsou ovlivněny periferní hodiny až do období mezi P20 a P30, kdy se původně mládě stává dospělcem (Canaple et al., 2018). To je ve shodě s následujícím pokusem na potkanech, kde se zjistilo, že rytmická exprese hodinových genů periferních orgánů dozrává pozvolna od porodu až do dospělosti. V P10 oscilují geny *Per1* a *Rev-Erb*, v P20 se k nim přidává *Per2* a *Bmal1* a v P30 je konečně doplňuje i *Cry1* a *Clock*. Zralý hodinový mechanismus u jater, jakožto periferního orgánu, je v P30 (Sládek et al., 2007).



*Obr. 3* Hlavní stádia vývoje cirkadiálního systému potkana (Sumova et al., 2012). Dělení zygoty je datováno jako E0, poté probíhá ontogenetický vývoj plodu, kdy několik dní před E15 se větší mírou vyvíjí hypotalamus a v E15 se začíná formovat i samotné SCN. Morfologický vývoj SCN je dokončen ještě před narozením. Po narození, jež je datováno jako P0, stále probíhá dozrávání ve smyslu zapojení synapsí SCN. Na to plynule od P5 do P10 navazuje světelná synchronizace mláděte.



### 3 GABA ve vývoji mozku

Během ontogenetického vývoje mozkových struktur zastává GABA nezastupitelnou funkci excitačního neuropřenašeče, zatímco glutamátergní signalizace, jež je hlavní excitační signalizací dospělé CNS, v tomto období ještě není plně vyvinuta. GABAergní signalizace tak umožňuje dozrání nejen jednotlivých neuronů, ale i jejich správné zapojení do nově vznikajících neuronálních sítí (Barker et al., 1998).

Ontogeneticky časnější aktivitu GABAergní signalizace než pomoci jiného neuropřenašeče, lze doložit na tomto výzkumu, kdy byla na kultuře hypotalamických neuronů potkana zkoumána jejich senzitivita k neuropřenašečům. V E15 byla senzitivita těchto neuronů vůči GABA výrazně vyšší než vůči glutamátu či glycinu, přičemž iontové proudy těchto dvou neuropřenašečů nabývají na významu až v pozdějším stádiu vývoje (Chen et al., 1996). Poměr GABA<sub>A</sub> a GABA<sub>B</sub> receptorů je v každé mozkové struktuře odlišný, což způsobuje, že každá struktura reaguje na GABA rozdílným způsobem. V rámci dané tkáně se hustota obou receptorů odlišuje mezi dendrity a axon (Obrietan a Van den Pol, 1998).

#### 3.1 Role GABA ve vývoji SCN

Podobně jako v jiných částech mozku, i v neuronální kultuře SCN potkana bylo zjištěno, že GABA v embryonálním stádiu zvyšuje hladinu intracelulárního  $Ca^{2+}$  a působí excitačně. Od pozdního embryonálního stádia (E18) však neurony přestaly reagovat excitačně na GABA, jež dále začíná působit inhibičním způsobem. Tato přeměna vlastností z excitačních na inhibiční platí pro celý mozek, právě ale kvůli hojnému zastoupení GABAergních neuronů byla prvně zaznamenána v SCN (Obrietan a Van den Pol, 1995). Ve stejném dni embryonálního stádia tatož výzkumná skupina provedla na kultuře hypotalamu další pokus. V něm zjistili, že zvyšování hladiny  $Ca^{2+}$  během ontogenetického vývoje zprostředkovávají ionotropní GABA<sub>A</sub> receptory. Oproti tomu aktivace metabotropních GABA<sub>B</sub> receptorů vykazuje tonický charakter a působí v tomto vývojovém stádiu antagonisticky vůči GABA<sub>A</sub>. Již v časném vývojovém stádiu jsou GABA<sub>B</sub> receptory v hypotalamu hustě rozsety v presynaptických i postsynaptických částech neuronů. Během vývoje se fyziologicky GABA po vylití váže na oba typy receptorů, následkem čehož nejprve dochází k prudkému zvýšení vnitrobuněčné koncentrace vápenatých iontů díky vazbě na GABA<sub>A</sub>. V dalším sledu dochází k prudkému zbrzdění růstu hladiny vápníku a jejímu snížení následkem vazby na GABA<sub>B</sub>. Ve vývoji je tento mechanismus využit tím způsobem, že rostoucí axon svojí aktivitou sám sebe podporuje a současně inhibuje okolní axony (Obrietan

a Van den Pol, 1998). Následné experimenty ukázaly, že GABA, právě díky zvýšení intracelulární hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, indukovala v E15 tvorbu růstového kuželu neuronového výběžku. Ovšem neurony procházejí procesem maturace a reagují vznikem růstového kuželu na GABA pouze v určité fázi svého vývoje. V tomto vývojovém stádiu se růstový kužel zvětšoval dokonce více po indukci neuropřenašečem GABA než po indukci glutamátem, jenž je následně v dospělosti hlavním neuropřenašečem indukujícím růstový kužel, přičemž GABA nikoliv (Obrietan a Van den Pol, 1996). Proti excitační signalizaci  $\text{GABA}_A$  působí antagonisticky během vývoje nejen  $\text{GABA}_B$ , ale i neuropeptid Y. To bylo předvedeno na kultuře SCN potkanů v E20. Neuropeptid Y snížil intracelulární hladinu  $\text{Ca}^{2+}$ , čímž inhiboval onen excitační účinek GABA. Tento efekt je dlouhodobý a přetrvává několik desítek minut, i po vymytí neuropeptidu Y ze tkáňové kultury (Obrietan a Van den Pol, 1996).

V návaznosti na objevení excitační funkce GABA se hledal princip, jakým se z GABA stává inhibiční neuropřenašeč poté, co je dovršen vývoj. Na kultuře potkaního hypotalamu byl demonstrován princip, který se u savců ukázal shodný pro celou CNS, a jenž je mezi savci fylogeneticky konzervován. Podstatou tohoto mechanismu je odlišná koncentrace jednotlivých iontů vně a uvnitř buňky během vývoje a v dospělosti. To způsobuje posun rovnovážného potenciálu  $\text{Cl}^-$  iontů z -40 až -50 mV v rané fázi na zhruba -70 mV u dospělého jedince. Tento postupně probíhající vývojový posun je příčinou toho, zda GABA, umožňující otevření  $\text{GABA}_A$  chloridových kanálů, působí excitačně nebo inhibičně (Chen et al., 1996). Na embryonálním hypotalamu myši byla elektrofyziologicky otestována reakce jednotlivých neuronů na GABA. Reakce některých neuronů vypadala na elektrofyziologickém měření jako jeden velký spike, zatímco reakce jiných neuronů se skládala z velkého spiku následovaného několika menšími. Facilitace a následná několikanásobná reakce byla způsobena nejen zvýšením intracelulární hladiny  $\text{Ca}^{2+}$ , ale i vtokem  $\text{Na}^+$  iontů do buňky. Jak tyto neurony dozrávají, zvyšuje se míra, kterou sodné ionty přispívají k vyvolání akčního potenciálu a snižuje se váha příspěvku vápenatých iontů, jež vtečou do buňky po otevření iontového kanálu navázáním GABA. Tak to postupně pokračuje až do doby, kdy  $\text{GABA}_A$  kanálem protékají především ionty  $\text{Cl}^-$ , což znamená, že GABA se stává inhibičním neuropřenašečem (Wang et al., 2001). Charakteristiky této změny byly podrobněji popsány v nedávném výzkumu specificky zaměřeném na SCN, v němž autoři pomocí patch-clamp metody zkoumali inhibiční postsynaptické proudy ve vl-SCN a dm-SCN na neuronech potkanů ve vývojových stádiích P4, P8, P13 a P22 se zaměřením na den a noc. Se stárnutím jedince docházelo ke zvyšování frekvence inhibičních vzruchů  $\text{GABA}_A$ ergních neuronů, znatelněji více především ve vl-SCN. Amplituda vzruchu se zvyšovala v obou částech podobně, přičemž

její zvýšení bylo výraznější v nočních hodinách. V obou částech SCN se zkrátila doba trvání inhibičního proudu (signalizace se zrychlila), a to hlavně přes den. S vývojem jedince se tedy zvyšuje aktivita GABAergních neuronů v SCN, což pravděpodobně odráží rostoucí význam světelné synchronizace po porodu s rostoucí mírou zralosti jedince. Mění se parametry GABAergní signalizace na synapsích na takové, jež jsou nutné pro správné fungování GABA systému v SCN v dospělosti (Osuna-Lopez et al., 2021).

V návazné sérii pokusů byla u buněčné kultury SCN myši v E18 narušena funkce GABAergní signalizace pomocí knockoutu VGAT, přičemž v dřívějších dnech je tato delece letální. U VGAT<sup>-/-</sup> skupiny se mezi neurony spustila vzájemná desynchronizace cirkadiálních rytmů a některé začaly fázově předbíhat ostatní. Mezi kontrolní a knockout skupinou nebyl nalezen rozdíl v rytmicitě Per2, což znamená, že knockoutem nebyly ovlivněny molekulární hodiny. Neurony knockoutovaných jedinců pálily spíše v rychlých dávkách několika po sobě jdoucích vzruchů, což způsobovalo rychlé změny v intracelulární koncentraci Ca<sup>2+</sup>. S exogenním podáním GABA tato reakce VGAT<sup>-/-</sup> neuronů vymizela. Obdobné výsledky byly zaznamenány i při podání GABA antagonistů kontrolní skupině. To tedy naznačuje, že během vývoje je GABA důležitá pro synchronizaci jednotlivých neuronů SCN, ale nezasahuje až do molekulární hodinové smyčky. GABA je také důležitá pro pozvolné změny v síle výstupního signálu bez náhlých velkých výkyvů. Zde však není jasné, zda se to týká pouze plodu nebo i dospělého jedince (Ono et al., 2019).

### 3.2 GABAergní neurony ve vývoji předního mozku

GABAergní neurony předního mozku se do své oblasti působení dostávají migrací. U myšího modelu byly první GABAergní neurony pomocí imunohistochemických metod pozorovány v E12 ve vnější vrstvě korové oblasti proliferující z progenitorových buněk. Během dní E14–E19 u těchto neuronů docházelo k radiální migraci mediálním směrem do subventrikulární zóny a současně se dostávaly frontálním směrem tak, jak se zvětšují korové oblasti plodu. Ve dnech P0–P8 následuje výrazná prořízka, kdy se redukuje počet GABAergních neuronů neokortexu, zatímco v limbickém kortexu ke většímu úbytku nedochází. Tento poměr GABAergních neuronů zůstává až do dospělosti (Del Rio et al., 1992). U člověka se populace progenitorových buněk, z nichž se diferencují korové GABAergní neurony, nachází na dvou místech. První populace se nachází v dorsální části předního mozku ve subventrikulární a ventrikulární zóně a představuje dvě třetiny těchto progenitorových buněk. Zbývající třetina se rozprostírá ve ventrální části předního mozku (Letinic et al., 2002). Na řezech kortexu potkana bylo ukázáno, že GABAergní neurony

mohou svojí aktivitou zpětně snížit mitotickou aktivitu neurálních progenitorových buněk, z nichž byly diferenciovány. Příčinou je téměř excitotoxický stav vyvolaný zvýšeným vtokem  $\text{Ca}^{2+}$  skrz  $\text{GABA}_A$  receptory na synapsi mezi GABAergními neurony a mateřskou populací progenitorových buněk. Pravděpodobně v pozdní fázi embryonálního vývoje již není potřeba zvýšené proliferace korových progenitorových buněk, jelikož počet GABAergních neuronů bude stejně vlivem prořízky zredukován (LoTurco et al., 1995).

Na buněčné úrovni je GABAergní signalizace zásadní pro maturaci neuronů předního mozku. Pokud dochází v embryonální fázi k excitaci buňky neuropřenašečem GABA, tak u daného neuronu dochází k nárůstu počtu dendritů a k jejich prodloužení (Cancedda et al., 2007). Na vzorcích lidského kortexu pak byla zkoumána velikost a hustota GABAergních neuronů v různých fázích časného ontogenetického vývoje. Během prvního trimestru těhotenství byly tyto neurony malé se zakulaceným tvarem a v korových oblastech se vyskytovaly pouze zřídka. Ve druhém trimestru se neurony zvětšily a narostl i počet jejich výběžků, výrazně se zvýšila jejich hustota a také začaly migrovat do svých cílových oblastí. Ve třetím trimestru GABAergní neurony již velikostí dosahovaly parametrů maturovaných neuronů. Po porodu začalo množství těchto neuronů pozvolna klesat a jejich migrace kompletně zmizela půl roku po porodu. Hustota  $\text{GABA}_A$  receptorů korespondovala s aktivitou GABAergních neuronů, v prvním a druhém trimestru byla nízká a začala se zvyšovat až počátkem třetího trimestru. Lidský GABAergní signalizační systém se tak v korových oblastech a bílé hmotě vyvíjí od poloviny těhotenství a plně vyvinutý je až v prvních letech života jedince (Xu et al., 2011).

Na řezu hipokampu potkaního embrya v pozdním fetálním období byl demonstrován význam neuropřenašeče GABA pro tvorbu prvních fungujících neurálních sítí. Většina interneuronů, které tvořily především GABAergní synapse, byla během E18 již synapticky propojena s dalšími interneurony, zatímco glutamatergní pyramidální buňky, jež jsou odpovědné za tvorbu neurálních sítí v dalších fázích života, byly v tomto dni ještě z drtivé většiny neaktivní. O 4 dny později, při porodu, vykazovaly aktivitu již všechny interneurony, přičemž pyramidální buňky byly aktivní pouze z 15 %. V tomto období interneurony, s axony vedoucími především na GABAergní synapse, navíc dokázaly už na synapsích na konci jiných axonů sekretovat glutamát, avšak tento typ synapse zůstal v minoritě (Hennou et al., 2002). Tvorba neuronových sítí je usnadněna díky aktivitě  $\text{GABA}_A$  receptorů, přes které může ještě na konci fetálního období docházet ke silnému vtoku  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Takto silný vtok  $\text{Ca}^{2+}$  významně posiluje ještě nezralé synapse. V prvním postnatálním týdnu se tento jev přestává vyskytovat, což je dáno překlopením polarity GABAergní signalizace. Při

elektrofyzilogickém měření, jež probíhalo na hipokampálních neuronech potkana, tvořil tento vtok specifické velké spiky. Ty byly pozorovány i v dalších strukturách předního mozku – v kortexu a thalamu, ale také v míše či retině. Tímto způsobem neurony sekretující GABA přeměňují tiché neurony na neurony aktivní (Kasyanov et al., 2004). V předchozích odstavcích byly zmíněny především hipokampus a kortex, ačkoliv tyto principy jsou platné pro celý přední mozek.

Jeden z dobrých příkladů vlivu GABAergní signalizace na neurogenezi představují olfaktorické laloky. Na myším modelu byla měřena koncentrace GABA v této mozkové struktuře v různých stádiích vývoje. Nejvyšší koncentrace byla zaznamenána mezi E13 a E21, od té doby koncentrace začala postupně klesat a, při porodu došlo k náhlému, prudkému snížení na poloviční hladinu a poté klesající trend pokračoval až do dospělosti (Miranda-Contreras et al., 2000). Množství GABAergních receptorů je vůči zmíněné koncentraci GABA v téměř recipročním vztahu, což dokazují dva návazné výzkumy na řezech olfaktorického laloku potkana. V olfaktorickém laloku je řízena laterální inhibice mezi mitrálními a granulózními neurony, přes synapse obsahující GABA<sub>A</sub> receptory. Od P3 do P15 dochází k nárůstu počtu těchto GABAergních inhibičních synapsí, čímž se zvyšuje souhrnná míra inhibice. Od P15 do P30 počet synapsí sice stále roste, ale následkem nižší frekvence vzruchů velikost inhibice klesá. Počet GABA<sub>A</sub> receptorů tak od porodu do P30 narůstá (Dietz et al., 2011). Receptory GABA<sub>B</sub> byly ve dnech E16–18 objeveny pouze v povrchových vrstvách olfaktorického laloku. Množství GABA<sub>B</sub> v těchto povrchových vrstvách se ve dnech P2, P7, P10 zvětšovalo a v P12 bylo množství srovnatelné s množstvím u dospělého jedince (Panzanelli et al., 2004). Do porodu se v olfaktorickém laloku tedy zvyšuje koncentrace GABA a následně klesá, zatímco množství GABAergních receptorů významněji roste až od narození.

## 4 Benzodiazepiny

BDZ jsou sedativní anxiolytická farmaka, jejichž působení je založeno na potenciaci účinku neuropřenašeče GABA. Běžně jsou předepisována při epilepsii, při úzkostných stavech, proti nespavosti, proti bolesti nebo jako anestetika. Ačkoliv jejich chronické užívání není doporučováno, v běžné praxi tomu tak vždy není a někdy bývají BDZ předepisovány dlouhodobě. Doporučené užívání je v současné době omezeno na dobu maximálně 4 týdnů, přičemž žádné rozsáhlejší klinické zkoušky netestovaly užívání po dobu delší než 8 týdnů. Nebezpečí spočívá jednak v tvorbě závislosti na BDZ, která svou intenzitou odpovídá závislosti na alkoholu, ale také v přímém poškození fyziologických funkcí organismu. Byly zaznamenány negativní vlivy na kognitivní schopnosti, zhoršení psychického stavu, zvýšená pravděpodobnost výskytu demence či častější zranění způsobená pády. I přesto jsou BDZ u téměř jedné třetiny starších lidí předepisovány dlouhodobě a tento trend roste. V čele tohoto trendu stojí USA, kde se za poslední dekádu ztrojnásobil počet uživatelů a významný podíl z nich užívá BDZ dlouhodobě. Ani Evropa v tomto trendu nezůstává pozadu, kdy podle odůvodněných odhadů 15 % dospělých z evropských zemí alespoň jednou ročně dostalo předepsaný recept na BDZ. Tato skupina farmak bývá často předepisována společně s antidepresivy, ovšem na jejich vzájemné potenciální farmakologické interakce taktéž chybí klientské studie (Lim et al., 2020).

Nedávno provedená metaanalýza ze 14 studií se zabývala negativními vlivy BDZ na lidská embrya a zaměřovala se 8 nejčastěji užívaných BDZ. Metaanalýza zkoumala několik kritérií a každé z nich muselo být vyhodnocováno alespoň ze 3 studií. S 95% konfidenčním intervalem se počítal poměr šancí výskytu jednotlivých patologií. Poměr šancí výskytu spontánního potratu při vystavení plodu BDZ byl vypočítán na 1,86 (tedy o 86 % větší šance na potrat) ze vzorku 3400 plodů vystavených BDZ a 1.200.000 kontrolních. Poměru šancí výskytu dalších kritérií – předčasného porodu: 1,96 (z 2700 exponovaných a 1.300.000 kontrol), nízké porodní váhy: 2,34 (z 2700 exponovaných a 1.300.000 kontrol). U těchto i dalších kritérií se poměr šancí výskytu pohyboval okolo čísla 2, přičemž překročení tohoto čísla či číslo blízké se mu bývá interpretováno jako negativní působení zkoumaného jevu na populační zdraví (Grigoriadis et al., 2020).

Další nedávná metaanalýza zjišťovala prevalenci užití BDZ matkou do 12 měsíců před těhotenstvím, během těhotenství a do 12 měsíců po těhotenství. Data byla získána ze 32 studií provedených ve 28 zemích a z celkem 7.300.000 porodů. Prevalence užití BDZ do 12 měsíců před těhotenstvím dosahovala 0,9 %. Během těhotenství byla souhrnná prevalence 1,9 %

s tím, že byla nerovnoměrně rozložena – první trimestr byla 0,5 %, druhý trimestr 0,3 % a třetí trimestr vystoupala na 3,1 %. Do 12 měsíců po porodu se prevalence snížila na 0,5 %. Během těhotenství představoval nejvíce užívaný BDZ Lorazepam, následoval Zolpidem a poté Oxazepam. Prevalence byla nerovnoměrně rozložena také mezi regiony a ve východní Evropě významně převyšovala prevalenci v ostatních regionech na planetě. Toto rozložení ale může být dáno užitím alternativních farmak v regionech s nižší prevalencí BDZ (Bais et al., 2020).

#### 4.1 Farmakokinetika benzodiazepinů

Na základě farmakokinetických vlastností můžeme BDZ rozdělit do skupin podle struktury, doby trvání účinku či podle poločasu eliminace. Benzodiazepiny, kam nyní spadá již více než 60 druhů látek, obsahují na úrovni chemických struktur diazepinový kruh. Dělí se podle toho, zda jako další strukturu obsahují benzenové jádro, pyridyn nebo thiofenol. Doba trvání účinků dělí BDZ na krátkodobé, jež působí do 24h a dlouhodobé, jejichž účinek trvá déle než 24h. Podle poločasu eliminace ( $t_{1/2}$ ) se rozdělují na ultrakrátké ( $t_{1/2} < 6h$ ), krátké ( $t_{1/2} = 6h$ ), střednědobé ( $t_{1/2} = 6-24h$ ) a dlouhodobé ( $t_{1/2} > 24h$ ), přičemž platí, že k téměř úplné eliminaci je potřeba doba zhruba pěti poločasů eliminace.

Prvním krokem farmakokinetiky látek je absorpce, která závisí na způsobu podání. Nejčastějším způsobem podání BDZ je perorální, využívá se ale také intravenózního, intramuskulárního a rektálního způsobu podávání. U perorálního podání se mezi látkami této skupiny výrazně liší doba do nástupu účinku či doba do maxima účinku ( $t_{max}$ ), kdy phenazepam dosahuje maximálního účinku po 3 hodinách, zatímco flubrozepam po 12 hodinách (Lomas a Maskell, 2015; Moosmann et al., 2013). Podání v různou denní dobu je faktorem, jenž výrazně ovlivňuje  $t_{max}$  a  $t_{1/2}$ , u triazolamu podaného v ranní hodiny bylo  $t_{max} = 13$  min a  $t_{1/2} = 2,9$  h, zatímco při večerním podání došlo k prodloužení hodnot na  $t_{max} = 22$  min a  $t_{1/2} = 3,8$  h (Smith et al., 1986)

Dalším farmakokinetickým krokem je distribuce, jejíž parametry se u jednotlivých BDZ výrazně liší. Biodostupnost triazolamu při perorálním podání dosahuje 44 %, načež biodostupnost diazepamu je velmi vysokých 97 % (Kroboth et al., 1995; Ochs et al., 1982). Vazba na plazmatické bílkoviny dosahuje u alprazolamu 70 % a u diazepamu je téměř absolutní (Garzone a Kroboth, 1989; Klotz et al., 1976). Mezi jednotlivými látkami se velmi liší i distribuční objemy ( $V_d$ ), oxazepam má  $V_d = 0,27$  l/kg, zatímco flunitrazepam je  $V_d = 4,4$  l/kg (Sonne et al., 1988; Drouet-Coassolo et al., 1990), budou tedy odlišně pronikat do cílových kompartmentů.

Následujícím krokem je biotransformace, ta pro BDZ probíhá s největší měrou v játrech. Během I. fáze biotransformace, kdy se především zvyšuje hydrofilnost látky, bylo u většiny BDZ pozorováno, že procházejí oxidací. Tato reakce je nejčastěji katalyzována enzymy rodiny cytochromů P450, především zástupcem CYP3A4, dále pak CYP3A5, CYP2C19, CYP2B6, CYP2C18 a CYP2C9. Nejaktivnější z nich – CYP3A4 může katalyzovat konjugaci glutationu s těmi BDZ, jež mají ve své struktuře zabudovanou nitrátovou skupinu, a způsobit tak jaterní cytotoxicitu (Mizuno et al., 2009). Polymorfismy jednotlivých cytochromů P450 způsobují u postižených jedinců značné rozdíly ve schopnosti metabolizace BDZ. V některých případech byl diazepam metabolizován dvakrát déle než u jedinců se standardní alelou (Goldstein, 2001). Ve II. biotransformační fázi často působí enzym uridin 5-difosfo-glukuronosyltransferáza, který katalyzuje konjugaci metabolitu první fáze s glukuronidem. Některé BDZ, jež obsahují hydroxylovou skupinu, např. lorazepam a oxazepam, přeskakují I. fázi a účastní se přímo této reakce. To z nich činí BDZ s kratší dobou účinku (Court et al., 2002).

Posledním farmakokinetickým krokem je eliminace. BDZ se svými vlastnostmi v tomto kroku od sebe opět velmi odlišují. To lze vidět na již zmíněné klasifikaci BDZ dle  $t_{1/2}$ , kde každá z kategorií je široce zastoupena. Metabolity BDZ v těle kolují i několikanásobně déle než samotná podaná látka, eliminační doba metabolitu flubromazepam společného pro několik BDZ dosahuje až 28 dní (Moosmann et al., 2013). Hlavní exkrece cestou BDZ a jejich metabolitů je exkrece močí, v níž se nachází 1–20 % původního biologicky aktivního BDZ, další cestou je exkrece stolicí (Manchester et al., 2018).

Tato práce využívá jako modelovou látku benzodiazepinů clonazepam (CZP), a tak bude přiblížena jeho farmakokinetika. V jedné ze základních studií byla 12 zdravým subjektům se stářím mezi 23 a 50 lety podána perorálně, intravenózně či intramuskulárně jednorázově dávka 2 mg CZP. Krevní vzorky jim byly odebírány několik desítek minut před podáním, po podání prvně každou hodinu se snižující se frekvencí až po 120 hodin od podání. Při perorálním a intramuskulárním podání CZP vykazoval 90% biologickou dostupnost, čímž se řadí mezi BDZ s vyšší biologickou dostupností. Pro perorální podání bylo změřeno  $t_{max} = 1,7$  hod, absorpční poločas trval 24 min, a při intramuskulární aplikaci  $t_{max} = 3,1$  hod. Všechny způsoby podání měly eliminační poločas shodně  $t_{1/2} = 40$  h. Plazmatická clearance (CL), tedy množství krevní plazmy očištěné od CZP, dosahovala hodnoty 50 ml/min. Distribuční objem činil  $V_d = 2,3$  l/kg, v čemž zastává CZP mezi BDZ pozici s průměrnou hodnotou (Crevoisier et al., 2003). Další farmakokinetická studie byla vedena podobně, avšak se zaměřením na dlouhodobější podávání farmaka. Vystupovalo v ní 9 zdravých subjektů



mezi 18 a 40 lety a perorálně jim bylo podáváno 3x denně 0,5 mg CZP po dobu 7 dní – běžné klinické dávkování. Krevní vzorky jim byly odebírány v průběhu prvního, třetího a sedmého dne, načež byli subjekty 7 dní bez farmaka a jednou denně jim byla odebrána krev. Výsledkem bylo vypočtení absorpčního poločasu na 24 min,  $t_{1/2} = 40$  h,  $CL = 72$  ml/min. Dalším stanoveným parametrem byl akumulací poměr, kdy 1 znamená nulové hromadění látky v těle. Pro CZP se stanovila hodnota na 3,3, což tuto látku řadí mezi poměrně vysoce se akumulující látky a autoři naznačují, že dávkování jednou denně je dostačující, aby se CZP při chronickém užívání neakumuloval (Greenblatt et al., 2005). Obě studie došly až k překvapivě podobným výsledkům, a tak z toho lze usoudit, že tyto farmakokinetické parametry jsou platné. Ovšem obě byly provedeny na dospělých lidech, přičemž následující výzkum na potkanech ukázal, že farmakokinetika CZP se mění v závislosti na ontogenetických fázích organismu (Wang et al., 1992).

Na základě hypotézy o závislosti farmakokinetiky CZP na věku byl proveden výzkum na 300 potkanech ve věku P7, P14 a P28, jimž byla jednorázově aplikována subkutánní injekce v koncentraci 2,5 mg/kg. Výsledky byly porovnány s dospělci, jimž však byl podán 1 mg/kg a dopočítán na koncentraci CZP podanou mláďatům. Autoři několikrát provedli krevní odběr s postupně se prodlužujícími intervaly, kdy poslední byl proveden 8 h od aplikace a následně byl potkanům vypreparován mozek. Doba nástupu maximálního účinku se s vývojem potkanů snižovala: pro P7  $t_{max} = 61$  min, pro P14  $t_{max} = 53$  min a pro P28  $t_{max} = 25$  min. Došlo ke zvyšování distribučního objemu: P7  $V_d = 2,4$  l/kg, P14  $V_d = 2,5$  l/kg, P28  $V_d = 3,4$  l/kg, s maturací se tedy více farmaka dostávalo do tkání. Eliminační poločas se s přibývajícím věkem snižoval: P7  $t_{1/2} = 79$  min, P14  $t_{1/2} = 65$  min, P28  $t_{1/2} = 37$  min. Souhlasně s tím se tak zvyšovala plazmatická clearance: P7  $CL = 20$  ml/min/kg, P14  $CL = 30$  ml/min/kg, P28  $CL = 60$  ml/min/kg. Z odebraných mozků výzkumníci potvrdili tyto výsledky. Během ontogenetického vývoje tak dochází k rozvoji mechanismu distribuce a metabolizace farmaka – nástup maximálního účinku se zrychluje, více CZP se dostává do tkání, načež je také rychleji metabolizován a rychleji vyplavován z krevního oběhu do moči. Rozvoj těchto parametrů ovšem vrcholí s přechodem do dospělosti (P28) a poté se účinnost těchto systémů postupně zase snižuje. Dospělec má tak delší  $t_{max}$ , vyšší  $t_{1/2}$ , nižší  $CL$  a nižší  $V_d$  než P28. Věk hraje tedy u farmakokinetiky CZP zásadní roli (Wang et al., 1992). U lidí byla provedena méně obsáhlá farmakokinetická studie na 22 plodech a novorozencích od 28. do 41. gestačního týdne, respektive do 23 dní po narození. Protokol zahrnoval podávání 0,1 mg/kg CZP jednou denně po dobu až 11 dní. Tato dávka dostatočně potlačovala epileptických záchvatů u 19 jedinců. Zajímavé je, že zbylí 3 jedinci, u nichž se nepodařilo

záchvaty potlačit, vykazovali buď velmi nízkou nebo velmi vysokou plazmatickou koncentraci v porovnání s ostatními (André et al., 1991). Podrobněji se farmakokinetikou CZP zabývala retrospektivní studie na 137 dětských a mladistvých pacientech, kdy 31 z nich užívalo pouze CZP a zbylí pacienti užívali CZP v kombinaci s jiným anti-epileptickými léky. Pacienti užívali léky několikrát denně po dlouho dobu, přičemž výzkumníci se zde zaměřovali především na poměr koncentrace CZP v krvi (level; ng/ml) a užití dávky ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$ ); tedy L/D. S rostoucím věkem se ve skupině užívající pouze CZP tento poměr mírně zvyšoval: pro stáří 0–4 let L/D = 0,46, pro 5–9 let L/D = 0,48, pro 10–14 let L/D = 0,51 a pro 15–18 let L/D = 0,57. Stejný trend navyšování se prokázal i u zbylých pacientů. Během dospívání se tak mírným tempem zvyšuje množství biologicky aktivního CZP z podané dávky. Za zmínku stojí, že s rostoucí aplikační dávkou CZP se zvyšovala odchylka v krevní koncentraci od průměru – ať již kladným či záporným směrem. Více se tak začaly projevovat individuální rozdíly v metabolizaci tohoto farmaka (Yukawa et al., 2001).

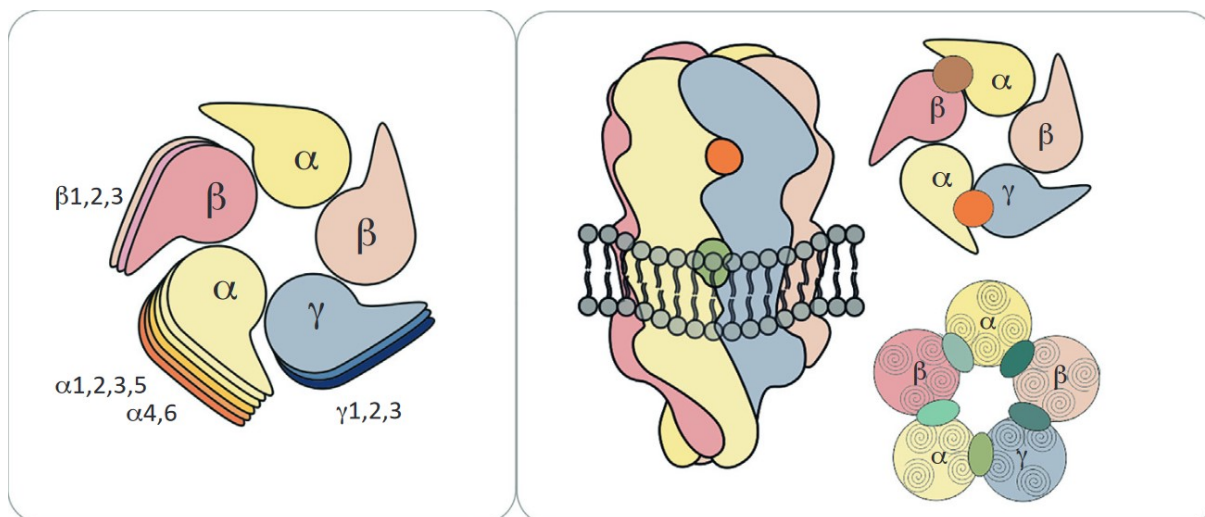
Na základě výše zmíněných dat, tedy schopnosti jednotlivých kohort potkanů distribuovat a metabolizovat CZP, a především trend s vrcholem těchto schopností na konci dospívání (Wang et al., 1992), L/D zmíněné výzkumu na dětských a mladistvých pacientech a jeho trend (Yukawa et al., 2001) a L/D dopočítané na hodnotu 0,25 z dospělých lidských subjektů (Crevoisier et al., 2003) lze předpokládat, že trend schopnosti distribuovat a metabolizovat CZP v různých fázích ontogeneze je u lidí obdobný jako u potkanů. Tyto schopnosti se vyvíjejí a zesilují s tím, jak plod a poté mládě stárne a maturuje, ale to pouze do doby, než plně dospěje. V dospělosti se tyto schopnosti opět postupně začínají snižovat.

## 4.2 Mechanismus působení benzodiazepinů a souvislost s GABA

Benzodiazepiny se vážou na své receptory s poměrně vysokou specifitou. Zpravidla jako agonisté pozitivně modulují GABA<sub>A</sub> receptory a cílí na specifické struktury CNS, které jsou proto hlavním cílem pro jejich terapeutickém užívání. Také se s různou afinitou vážou na periferní benzodiazepinové receptory (PBR), přičemž klinický význam této vazby bývá zpravidla zanedbatelný.

Hlavním vazebným místem pro BDZ jsou specifické podjednotky GABA<sub>A</sub> receptorů. Je dobré zmínit, že BDZ nejsou jediné látky, jež modulují aktivitu těchto receptorů. Dalšími jsou všemožné druhy toxinů, barbituráty, anestetika, neurosteroidy, insekticidy, rostlinné látky či ethanol. GABA<sub>A</sub> receptory jsou nejvíce exprimovány v nervové tkáni a specificky CNS, ale lze je nalézt i v dalších orgánech. Všechny tyto receptory také nejsou stejné – jsou tvořeny z tří až pěti různých podjednotek. V současné době jsou u savců známy isoformy

podjednotek alfa ( $\alpha$ ) 1–6, beta ( $\beta$ ) 1–3, gama ( $\gamma$ ) 1–3, delta ( $\delta$ ), ró ( $\rho$ ) 1–3, epsilon ( $\epsilon$ ), ypsilon ( $\upsilon$ ) a pí ( $\pi$ ). Z nich je utvořen prstencovitý komplex s centrálně umístěným iontovým kanálem selektivním pro chloridové a hydrogenuhličitanové ionty. Většina GABA<sub>A</sub> receptorů se skládá z kombinace isoform podjednotek  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (nejrozšířenější kombinaci představují dvě  $\alpha$ -2, dvě  $\beta$ -2 a jedna  $\gamma$ -2), ale některé makromolekuly receptorů mají zabudované i zbylé podjednotky, anebo jsou z nich kompletně poskládány. Z hlediska funkční struktury nás zajímají především kapsy, jež jsou utvořeny na extracelulární straně prstencovitého komplexu mezi každými dvěma sousedícími podjednotkami. Tyto kapsy fungují jako vazebné místo a iontový kanál GABA<sub>A</sub> se fyziologicky otevírá, pokud se GABA naváže na rozhraní podjednotek  $\alpha/\beta$ . Afinita BDZ k rozhraní dvou sousedících podjednotek určuje míru modulace iontového kanálu. Při těchto alosterických modulacích se BDZ zpravidla vážou na  $\alpha/\gamma$ , některé BDZ se ale mohou vázat i na jinou kombinaci. Působení BDZ na GABA<sub>A</sub> receptor bývá většinou případů aktivační a zvýší tak tok Cl<sup>-</sup> a HCO<sup>3-</sup> iontů do buňky. Nicméně několik látek této skupiny při vazbě na specifickou kombinaci podjednotek působí antagonisticky s následkem zablokování vazebného místa, či přímo inhibičně na aktivitu GABA<sub>A</sub>, kdy se sníží tok Cl<sup>-</sup> a HCO<sup>3-</sup> iontů do buňky. Příkladem je vazba diazepamu na  $\alpha$ -4/ $\gamma$ , kdy nedochází ke změně aktivity receptoru, přitom při vazbě na jiná rozhraní působí aktivačně. Diazepam je jedním z nejméně selektivních BDZ s širokou paletou účinků, jež jsou hypnotické, sedační, anxiolytické či svaly uvolňující. Na základě specifity afinity k podjednotkám byly pokusy vytvořit vysoce selektivní BDZ s cílem navodit pouze úzké spektrum účinků, avšak ukázalo se, že vazebné místo určitých sousedících podjednotek není jedinou proměnnou určující výsledný efekt na kognitivní schopnosti. Dalším velmi významným faktorem je odlišná míra exprese jednotlivých isoform podjednotek v různých částech CNS. Nezávisí pak pouze na účinku na jednotlivou buňku ale na souhře komunikace buněk z různých struktur CNS pro požadovaný efekt na kognitivní schopnosti. Vyšší specifity účinku lze pak dosáhnout tvorbou BDZ, jež se bude vázat na kombinaci méně exprimovaných podjednotek nebo podjednotek s vyšší strukturální odlišností od ostatních, tedy např. rozhraní  $\gamma$ -2/  $\gamma$ -3 (obr. 4; Sigel a Ernst, 2018).



*Obr. 4* Podjednotky GABA<sub>A</sub> receptoru (Sigel a Ernst, 2018). Levá část obrázku ukazuje nejrozšířenější kombinaci podjednotek GABA<sub>A</sub>, tedy dvě  $\alpha$ , dvě  $\beta$  a jedna  $\gamma$ , u podjednotek jsou vypsány jejich známé isoformy. Pravá část obrázku ukazuje vazebná místa (ovály různých odstínů zelené) na GABA<sub>A</sub>, která jsou na rozhraní podjednotek. Ukazuje také vazebné místo pro GABA, které se nachází na rozhraní podjednotek  $\alpha/\beta$  (hnědý kruh) a nejčastější vazebné místo pro BDZ, jenž se nachází na rozhraní  $\alpha/\gamma$  (oranžový kruh).

Dalším vazebným místem BDZ je periferní benzodiazepinový receptor (PBR), jež se nachází téměř ve všech tkáních a představuje vazebné místo specifické téměř výhradně pro benzodiazepiny. Mezi tkáněmi se široce odlišuje míra jeho exprese – ve velmi malém množství se nachází v CNS, zatímco ve vysoké míře je exprimován v sekrečních tkáních jako jsou adrenergní žlázy, slinné žlázy, nosní epitel, či varlata. Vyšší hustota v míše je pak kontrastem k jeho nižší míře v mozku, ovšem při některých neurodegenerativních onemocněních dochází i tam ke zvýšení jeho exprese. To bylo prokázáno na excitotoxických modelech potkana a na striatu pacientů trpících Alzheimerovou či Huntingtonovou chorobou. Gen PBR je evolučně velmi konzervován. Na buněčné úrovni se PBR nachází především ve vnější mitochondriální membráně, kde je součástí komplexu trimerního napětově závislého aniontového kanálu (VDAC) nebo přenašeče adeninových nukleotidů (ANC). Svou činností se PBR podílí na dějích steroidogeneze, mitochondriální respirace, apoptózy a buněčné proliferace. Koncentrace ligandů PBR pak udává, jaký z těchto dějů je podpořen, při vyšších koncentracích dochází k podpoře růstu buňky, zatímco při nižších je růst buňky inhibován. Mezi BDZ panují velké odlišnosti v afinitě ke PBR – diazepam se váže s vysokou afinitou ke GABA<sub>A</sub> i k PBR, zatímco CZP vykazuje vysokou afinitu pouze ke GABA<sub>A</sub>, ke PBR nikoliv (Corsi et al., 2008).

Jak již bylo zmíněno, BDZ se v případě GABA<sub>A</sub> nejvíce vážou na rozhraní podjednotek  $\alpha/\gamma$ . CZP v tomto není výjimkou, což bylo potvrzeno v následujících studiích.

Pomocí metody imunoprecipitace výzkumníci na mozkové tkáni potkana zkoumali afinitu CZP k různým isoformám  $\alpha$  podjednotek GABA<sub>A</sub> receptoru. Nejvyšší afinitu vykazoval CZP k podjednotce  $\alpha$ -3, zhruba poloviční poté k  $\alpha$ -1 a  $\alpha$ -2, přičemž k  $\alpha$ -5 byla jeho afinita téměř nulová (McKernan et al., 1991). Stejnou metodou na modelu potkana byla zkoumána i afinita ke  $\gamma$  podjednotkám. CZP, který bývá považován díky svým účinkům za silného agonistu, měl velmi silnou afinitu ke  $\gamma$ -2 podjednotce, sníženou poté ke  $\gamma$ -1 a  $\gamma$ -3. Isoforma  $\gamma$ -2 je také v mozku dospělého potkana nejvíce exprimovanou isoformou, v mnohem menší míře jsou poté exprimovány  $\gamma$ -1 a  $\gamma$ -3 (Benke et al., 1996). Na mozkové tkáni lidských epileptických pacientů post mortem se zkoumalo pomocí patch-clamp a měřením proudu při vazbě GABA ke GABA<sub>A</sub> a po modulaci CZP. Výzkumníci potvrdili, že CZP se s vyšší afinitou váže k podjednotkám  $\alpha$ -1 a  $\alpha$ -2 a navíc zjistili, že CZP vykazuje nízkou afinitu k  $\alpha$ -4 a  $\delta$  podjednotkám GABA<sub>A</sub> receptoru (Brooks-Kayal et al., 1999). Zjišťovala se také míra afinity CZP ke PBR pomocí testu vazby ligandu na periferní tkáň potkanů, jimiž byly ledviny, srdce, adrenergní žlázy a trombocyty. Afinita CZP ke PBR byla v tomto případě téměř nedetekovatelná (Le Fur et al., 1983). Shrnutí – CZP se velmi dobře váže k  $\alpha$ -3 a  $\gamma$ -2, dobře pak k  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2,  $\gamma$ -1 a  $\gamma$ -3. Nejčastější kombinace podjednotek GABA<sub>A</sub> receptoru v mozku se skládá ze dvou  $\alpha$ -2, dvou  $\beta$ -2 a jedné  $\gamma$ -2, což znamená, že CZP se k těmto receptorům dobře váže v celé CNS. Farmakodynamika BDZ a specificky CZP nám pomůže pochopit, jak jednotlivé struktury CNS reagují na tyto látky.

## 5 Cíle práce

Předchozí výsledky naší a spolupracující laboratoře ukázaly, že systémové podání klonazepamu (CZP) mláďatům potkana mezi P7 a P11 vede v kortexu a hipokampu ke změnám v expresní hladině některých podjednotek glutamátových a GABA receptorů (Kubová et al., 2020, 2018). **Cílem této diplomové práce bylo posoudit, zda podávání CZP v tomto vývojovém stádiu ovlivní vývoj cirkadiánních rytmů v hipokampu, frontálním kortexu a čichových lalocích.**

Na příkladu tří hodinových genů jsme sledovali vliv subchronického podání CZP na vývoj cirkadiánního hodinového mechanismu, a dvě podjednotky GABA receptorů byly zvoleny pro své spojení se vznikem neurovývojových onemocnění. Exprese genu *Stat3* byla studována pro případné propojení mezi GABAergní neurotransmisí a neuroinflamatorními změnami v mozku.

Srovnání mezi skupinami kontrolními a ovlivněnými CZP bylo prováděno v P18, tedy sedm dní po aplikaci CZP a v P60, tedy u dospělých zvířat.

## 6 Metodika

### 6.1 Experimentální paradigma

Pokus byl proveden na dvou kohortách potkanů kmene Wistar. První kohorta zahrnovala 56 osmnácti-denních samců (dále jako P18). Z nichž 28 zvířat bylo kontrolních a zbylým 28 zvířatům byl mezi 7. a 11. dnem po narození každý den aplikován CZP (skupina dále jako CZP). CZP byl podáván v množství 1 mg/kg/den ve formě suspenze ve fyziologickém roztoku s příměsí Tween 20. Shodně u obou skupin P18 byli vždy 4 potkani usmrceni po 4 hodinách jejich CT, aby časový rozsah pokrýval celý den. Po usmrcení bylo pokusné zvíře v rádech minut zpracováno a byla z něj extrahována a uchována příslušná část mozku. Kontrolní i CZP skupina zahrnují čtveřice zvířat v časových intervalech CT0, CT4, CT8, CT12, CT16, CT20 a CT24.

Druhá kohorta zahrnovala 40 šedesáti-denních potkanů (dále jako P60). Kontrolní skupinu zde tvořilo 20 zvířat. CZP skupině tvořené 20 potkany byl podáván CZP ve stejném schématu jako v případě P18. Průběh usmrcení, extrakce a uchování potřebných částí mozku byl totožný jako u P18. Kontrolní i CZP skupiny byly tvořeny pěticemi zvířat, z nichž byli vždy 3 samci a 2 samice. Tyto pětice mají mezi sebou rozdíl 6 hodin CT, časové intervaly jsou tedy CT6, CT12, CT18 a CT24. Vzhledem k periodicitě je při vyhodnocování použito CT24 i jako CT0.

Zkoumanými geny byly *B2m*, *Bmall*, *Per1*, *Nr1d1*, *Gabrd*, *Gabbr2* a *Stat3*.

### 6.2 Izolace RNA

Tkáň byla rozmrazena po skladování při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ve všech krocích byly používány sterilní zkumavky a pracovní nástroje. Prvním krokem je homogenizace tkáně, kdy bylo do zkumavek napipetováno 1000  $\mu\text{l}$  RNazolů, přidány homogenizační kuličky a zhruba 100 mg tkáně, která byla po přidání nůžkami rozstříhána na drobné kousky. Samotná homogenizace probíhala v oscilačním mlýnu Retsch MM2000 a to při frekvenci 30Hz a po dobu 10 minut. Po homogenizaci byly vzorky stočeny na centrifuze (11000g, 10 minut,  $4^{\circ}\text{C}$ ) a následně se z původní zkumavky odebralo 800  $\mu\text{l}$  supernatantu do nové zkumavky a k tomu se přidalo 320  $\mu\text{l}$  ultračisté vody. Roztok byl protřepán a nechal se inkubovat po dobu 10 minut při pokojové teplotě ( $25^{\circ}\text{C}$ ). Následovalo stáčení vzorku na centrifuze (12000g, 15 minut,  $4^{\circ}\text{C}$ ) a opětovné odebrání supernatantu – nyní 1000  $\mu\text{l}$  – do nové zkumavky. Pro

vysrážení RNA se k supernatantu přidalo 1000  $\mu$ l isopropanolu, roztok se promíchal a opět se nechal inkubovat 10 minut při pokojové teplotě. Poté byl vzorek centrifugován (12000g, 10 minut, 4°C) a ze zkumavky byl opatrně odpipetován a vyhozen supernatant. Ve zkumavce zbyl pouze sediment, k němuž bylo přidáno 500  $\mu$ l 75% EtOH a načež byla směs ručně promíchána tak, aby sraženina z původního sedimentu nyní plavala v EtOH. Následovala centrifugace (8000g, 2 minuty, 4°C) a odpipetování EtOH ze zkumavky. Poslední krok se opakoval – opět se přidalo 500  $\mu$ l 75% EtOH, vše bylo ručně promícháno, zkumavka se centrifugovala (8000g, 2 minuty, 4°C) a poté byl veškerý EtOH odebrán. Do zkumavky bylo přidáno 200  $\mu$ l ultračisté Aq a celý obsah zkumavky se promíchal. Pak byl vzorek vložen k inkubaci do termobločku na 10 minut při teplotě 55°C.

### **6.3 Přepis RNA do cDNA**

Na nanodropu byla změřena koncentrace vzorku. Poté byly vyřazeny vzorky s velmi nízkou koncentrací. Dle vzorku s nejnižší použitelnou koncentrací se dopočítalo naředění zbývajících platných vzorků tak, aby výsledný objem byl 10  $\mu$ l. Do malé cyclerové zkumavky byla napipetována ultračistá Aq a také vzorek dle předchozích výpočtů. K tomu se napipetovalo 10  $\mu$ l mastermixu (2  $\mu$ l 10x RT pufr, 0,8  $\mu$ l 25x dNTP mix, 2  $\mu$ l 10x RT náhodný primer, 1  $\mu$ l reverzní transkriptáza, 4,2  $\mu$ l ultračistá Aq). Následoval přepis RNA do cDNA – vzorek byl vložen do přístroje Bio-Rad T100 ThermoCycleru, na němž byl spuštěn následující program: 25°C, 10 min; 37°C, 120 min; 65°C, 5 min; 4°C do doby vyndání vzorku.

### **6.4 Kvantitativní real-time PCR**

Vzorek se naředil napipetováním 80  $\mu$ l ultračisté Aq do mikrozkušavky, v níž bylo 20  $\mu$ l vzorku. Poté byl vytvořen v nové mikrozkušavce vytvořen vzorkový pool, jenž obsahoval 2  $\mu$ l od každého vzorku dané kohorty. Podle protokolu bylo vypočítáno množství jednotlivých komponent PCR master mixu specificky pro sledované geny. Dle výpočtu byly do čisté zkumavky v odpovídajícím množství napipetovány komponenty master mixu v poměrech 12,3  $\mu$ l ultračisté Aq, 1,5  $\mu$ l polymerázy a 0,2  $\mu$ l próby pro 60x koncentrovanou genovou próbu, případně 11,9  $\mu$ l ultračisté Aq, 1,5  $\mu$ l polymerázy a 0,6  $\mu$ l 20x koncentrované próby. Následně bylo ve sterilním boxu vždy do třech jamek PCR destičky přidáno po 14  $\mu$ l master mixu a 2  $\mu$ l vzorku (nebo poolu či Aq jako negativní kontroly) a na destičku byla nalepena příslušná termofólie. Destičku byla vložena do kyvadlové centrifugy na 3000 RPM po dobu 1:30 minuty. Poté následovala RT-qPCR pomocí stroje LightCycler 480 instrument, která byla podle protokolu: denaturace DNA po dobu 15 min při 95°C a poté 60x cyklus



sestavající z 18s trvající denaturace při 95°C a z 60s trvající amplifikace DNA. Následně byla výstupní data exportována pro účely provedení analýzy.

## 6.5 Analýza dat a statistické vyhodnocení

Analýza dat probíhala pro každý den, mozkovou strukturu a skupinu zvlášť podle metody  $2(-\Delta\Delta C(T))$  v programu Microsoft Office Excel. Hodnota  $2(-\Delta\Delta C(T))$  značí relativní hladinu mRNA (Livak and Schmittgen, 2001). Z vyexportovaných dat byla hodnota  $C(T)$  získána zprůměrováním počtu provedených amplifikačních cyklů pro daný triplet každého vzorku. Tato hodnota, pro housekeepingový gen *B2m*, byla použita jako referenční hodnota, která byla odečtena od hodnoty jiného zkoumaného genu, čímž získáme  $\Delta C(T)$ . Následovalo odečtení nejnižšího hodnoty  $\Delta C(T)$  skupiny od sledované hodnoty  $\Delta C(T)$ , z čeho dostáváme  $\Delta\Delta C(T)$ . Výslednou hodnotu  $2(-\Delta\Delta C(T))$  získáváme po uvedení  $\Delta\Delta C(T)$  jako exponentu obrácené hodnoty čísla 2.

Hodnoty  $2(-\Delta\Delta C(T))$  byly použity jako vstupní hodnoty do programu Graphpad Prism. Ke zjištění, zda vykazuje CZP či kontrolní část dané skupiny rytmicitu v genové expresi, byla použita současně jednocestná analýza rozptylu (1W ANOVA) a Cosinorova analýza, kdy jako hladina významnosti pro zamítnutí nulté hypotézy byla stanovena hodnota  $p=0,05$ . Cosinorova analýza zjišťuje, zda lze proložit sinusoidní křivku body, jež jsou udány relativní hladinou mRNA v určitém CT. Výpočet pracuje s hodnotami amplitudy, mesoru, akrofáze a délky periody, přičemž nultou hypotézu pro Cosinorovu analýzu představuje horizontální čára. Genová exprese je tedy rytmická v případě, že obě analýzy určí současně hodnotu  $p<0,05$ .

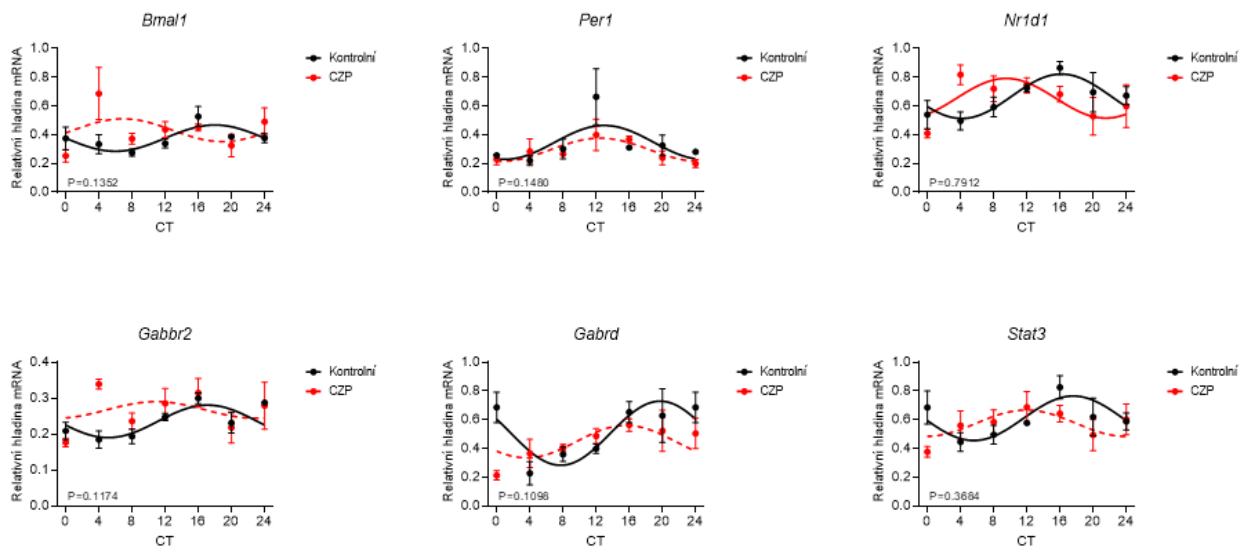
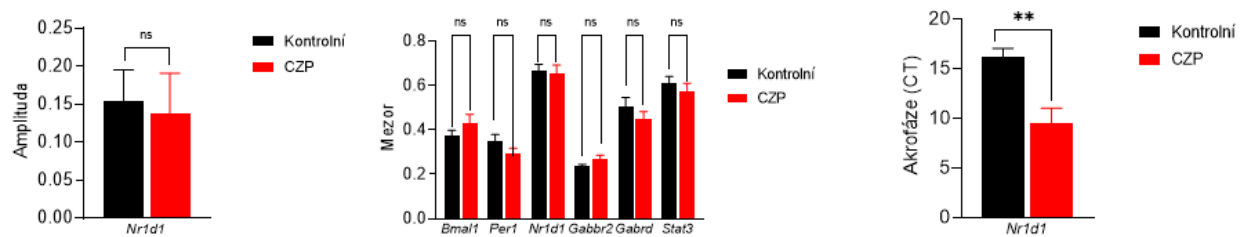
Stejně vstupní hodnoty byly použity i při určení, zda je v dané skupině statisticky významný rozdíl v profilu genové exprese mezi CZP a kontrolami. Zde byla použita 2W ANOVA, kdy hladina pro zamítnutí nulté hypotézy byla opět  $p<0,05$ .

## 7 Výsledky

### 7.1 Hipokampus P18

Obr. 5A zobrazuje expresní profily sledovaných genů v hipokampu potkanů v P18. V kontrolní skupině kosinorova analýza a současně 1W ANOVA potvrdily cirkadiánní rytmicitu pro všechny sledované geny, tedy *Bmall*, *Per1*, *Nr1d1*, *Gabrd*, *Gabbr2* a *Stat3*. Po aplikaci CZP vykazovala rytmicitu pouze exprese genu *Nr1d1*. Rozdíly mezi skupinami testované 2W ANOVA nebyly u žádného z genů signifikantní. Obr. 5B ukazuje cirkadiánní parametry rytmu genu, jenž byl rytmický pro kontrolní i CZP skupinu, tedy *Nr1d1*. U *Nr1d1* nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly v amplitudě, ale statisticky významný rozdíl ( $P < 0,01$ ) byl zaznamenán pro CT akrofáze. Rozdíl ve velikost mezoru mezi kontrolní a CZP skupinou u žádného ze sledovaných genů nepřekročil statistickou hladinu významnosti.

V tab. 1A jsou zobrazeny výsledky testů 1W ANOVA a kosinorovy analýzy. V testu rytmicity profilu exprese byly pomocí 1W ANOVA jako signifikantní v kontrolní skupině vyhodnoceny geny *Per1* ( $P=0,0204$ ), *Nr1d1* ( $P=0,047$ ), *Gabbr2* ( $P=0,0043$ ), *Gabrd* ( $P=0,017$ ) a *Stat3* ( $P=0,047$ ), ve skupině CZP pouze *Bmall* ( $P=0,0489$ ). Kosinorova analýza vyhodnotila jako signifikantní v kontrolní skupině *Bmall* ( $P=0,0367$ ), *Per1* ( $P=0,0498$ ), *Nr1d1* ( $P=0,0178$ ), *Gabbr2* ( $P=0,0101$ ), *Gabrd* ( $P=0,0033$ ) a *Stat3* ( $P=0,0088$ ), ve skupině CZP *Bmall* ( $P=0,4054$ ), *Per1* ( $P=0,0378$ ) a *Nr1d1* ( $P=0,0476$ ). Rytmicita v profilu exprese byla potvrzena u genů, které v obou testech současně překročily statistickou hladinu významnosti. Pro kontrolní skupinu to jsou geny *Per1*, *Nr1d1*, *Gabbr2*, *Gabrd* a *Stat3*, pro CZP skupinu je to gen *Bmall*. V tab. 1B jsou uvedeny výsledky 2W ANOVA, přičemž tento test neodhalil signifikantní rozdíly ve velikosti mezoru mezi skupinami pro žádný ze sledovaných genů.

**A****B**

*Obr. 5 A)* Cirkadiální profily v expresi vybraných genů v hipokampu potkanů v P18. Grafy zobrazují kosinorovu křivku pro kontrolní skupinu (černé křivky) a skupinu s aplikovaným CZP (červené křivky). Křivka je proložena průměry relativních hladin mRNA v jednotlivých časových bodech ( $n=4 \pm \text{SEM}$ ). Sinusoida je v grafu značena přerušovaně, pokud byla statistickými testy (kosinorovou analýzou a jednocestnou ANOVA) zamítnuta rytmicita exprese. Hodnota P značí rozdíl mezi skupinami podle dvoucestné ANOVA. **B)** Srovnání hodnot amplitudy, mezoru a akrofáze rytmu mezi kontrolní skupinou (černé sloupce) a skupinou s aplikovaným CZP (červené sloupce). \*\* značí statisticky významný rozdíl mezi skupinami získaný Studentovým t-testem,  $p<0,01$ .

<b>A</b>	1W ANOVA				Cosinor	
	Kontrolní		CZP		Kontrolní	CZP
<i>Bmal1</i>	F (6, 19) = 1,967	P=0,1214	F (6, 18) = 2,679	<b>P=0,0489</b>	<b>P=0,0367</b>	<b>P=0,4054</b>
<i>Per1</i>	F (6, 18) = 3,391	<b>P=0,0204</b>	F (6, 18) = 1,487	P=0,2382	<b>P=0,0498</b>	<b>P=0,0378</b>
<i>Nr1d1</i>	F (6, 18) = 2,711	<b>P=0,0470</b>	F (6, 19) = 2,037	P=0,1104	<b>P=0,0178</b>	<b>P=0,0476</b>
<i>Gabbr2</i>	F (6, 20) = 4,613	<b>P=0,0043</b>	F (6, 17) = 1,718	P=0,1774	<b>P=0,0101</b>	P=0,6683
<i>Gabrd</i>	F (6, 21) = 3,386	<b>P=0,0170</b>	F (6, 20) = 2,066	P=0,1036	<b>P=0,0033</b>	P=0,0939
<i>Stat3</i>	F (6, 18) = 2,710	<b>P=0,0470</b>	F (6, 20) = 1,282	P=0,3099	<b>P=0,0088</b>	P=0,1697

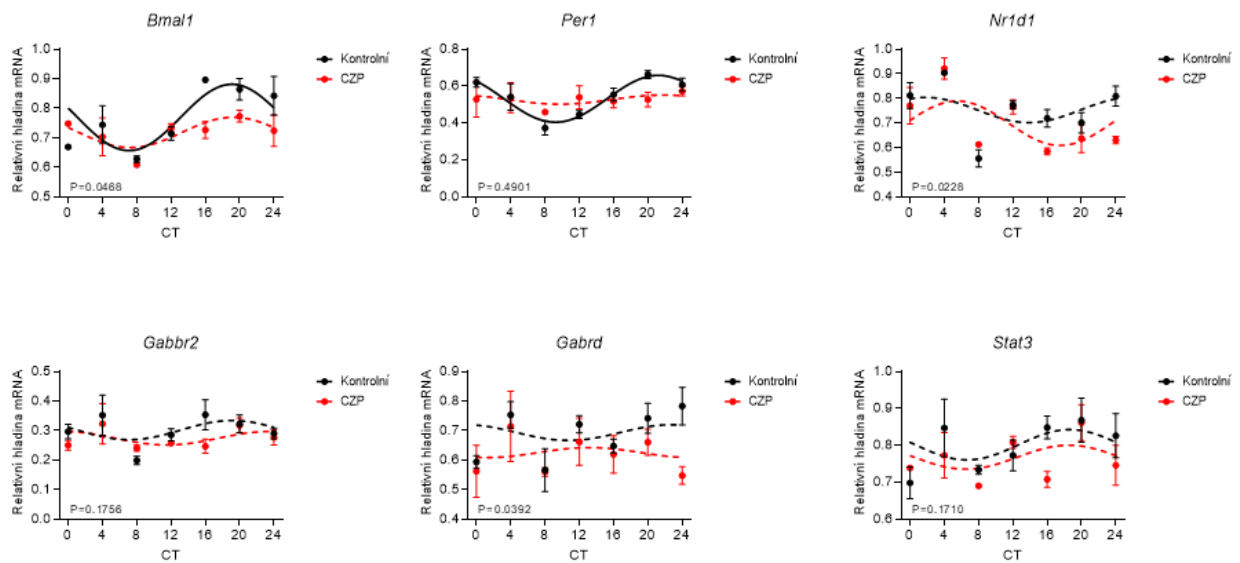
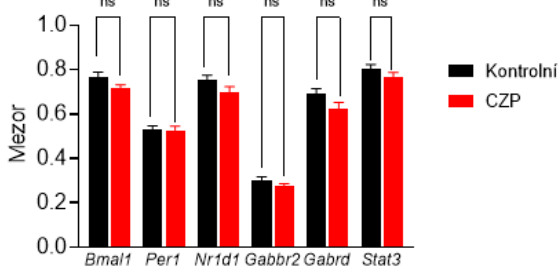
<b>B</b>	2W ANOVA	
<i>Bmal1</i>	F (1, 37) = 2,333	P=0,1352
<i>Per1</i>	F (1, 36) = 2,185	P=0,1480
<i>Nr1d1</i>	F (1, 37) = 0,071	P=0,7912
<i>Gabbr2</i>	F (1, 37) = 2,570	P=0,1174
<i>Gabrd</i>	F (1, 41) = 2,671	P=0,1098
<i>Stat3</i>	F (1, 38) = 0,829	P=0,3684

Tab. 1 **A)** Statistické vyhodnocení cirkadiánní rytmicity expresních profilů v hipokampu potkanů v P18 pomocí 1W ANOVA a kosinorovy analýzy. **B)** Statistické srovnání časových profilů exprese mezi skupinami na základě 2W ANOVA. Statisticky signifikantní hodnoty jsou tučně zvýrazněny.

## 7.2 Čichové laloky P18

Obr. 6A zobrazuje expresní profily sledovaných genů v čichových lalocích potkanů v P18. V kontrolní skupině kosinorova analýza a současně 1W ANOVA potvrdily cirkadiánní rytmicitu pro *Bmal1* a *Per1*. Po aplikaci CZP nevykazoval rytmicitu v expresi žádný ze sledovaných genů. Rozdíly mezi skupinami testované 2W ANOVA byly signifikantní u genů *Bmal1*, *Nr1d1* a *Gabrd*. Obr. 6B ukazuje rozdíl ve velikosti mezeru pro kontrolní a CZP skupinu. Rozdíl hodnotu u žádného ze sledovaných genů nepřekročil statistickou hladinu významnosti.

V tab. 2A jsou zobrazeny výsledky testů 1W ANOVA a kosinorovy analýzy. V testu rytmicity profilu exprese byly pomocí 1W ANOVA jako signifikantní v kontrolní skupině vyhodnoceny geny *Bmal1* ( $P=0,009$ ), *Per1* ( $P=0,002$ ), *Nr1d1* ( $P=0,0027$ ), *Gabrd* ( $P=0,039$ ), ve skupině CZP pouze *Nr1d1* ( $P=0,0001$ ). Kosinorova analýza vyhodnotila jako signifikantní v kontrolní skupině *Bmal1* ( $P=0,0063$ ) a *Per1* ( $P<0,0001$ ), ve skupině CZP hodnota u žádného z genů nepřekročila statistickou hladinu významnosti. Rytmicita v profilu exprese byla potvrzena u genů, které v obou testech současně překročily statistickou hladinu významnosti. Pro kontrolní skupinu to jsou geny *Bmal1* a *Per1*, v CZP skupině se žádné takové geny nenalézají. V tab. 2B jsou uvedeny výsledky 2W ANOVA. Tento test zaznamenal signifikantní rozdíly ve velikosti mezeru mezi skupinami pro *Bmal1* ( $P=0,0468$ ), *Nr1d1* ( $P=0,0228$ ) a *Gabrd* ( $P=0,0392$ ).

**A****B**

**Obr. 6 A)** Cirkadiánní profily v expresi vybraných genů čichových laloků potkanů v P18. Grafy zobrazují kosinorovou křivku pro kontrolní skupinu (černé křivky) a skupinu s aplikovaným CZP (červené křivky). Křivka je proložena průměry relativních hladin mRNA v jednotlivých časových bodech ( $n=4 \pm \text{SEM}$ ). Sinusoida je v grafu značena přerušovaně, pokud byla statistickými testy (kosinorovou analýzou a jednocestnou ANOVA) zamítnuta rytmicita exprese. Hodnota P značí rozdíl mezi skupinami podle dvoucestné ANOVA. **B)** Srovnání hodnot mezoru mezi kontrolní skupinou (černé sloupce) a skupinou s aplikovaným CZP (červené sloupce).

<b>A</b>	1W ANOVA				Cosinor	
	Kontrolní		CZP		Kontrolní	CZP
	<i>Bmal1</i>	F (6, 15) = 4,427	<b>P=0,0090</b>	F (6, 13) = 1,555	P=0,2369	<b>P=0,0063</b>
<i>Per1</i>	F (6, 16) = 5,970	<b>P=0,0020</b>	F (6, 15) = 0,4419	P=0,8395	<b>P&lt;0,0001</b>	P=0,6323
<i>Nr1d1</i>	F (6, 16) = 5,580	<b>P=0,0027</b>	F (6, 16) = 9,685	<b>P=0,0001</b>	P=0,2239	P=0,0754
<i>Gabbr2</i>	F (6, 17) = 1,436	P=0,2584	F (6, 14) = 1,061	P=0,4296	P=0,4241	P=0,3862
<i>Gabrd</i>	F (6, 17) = 2,902	<b>P=0,0390</b>	F (6, 15) = 0,7807	P=0,5978	P=0,6772	P=0,9002
<i>Stat3</i>	F (6, 17) = 1,344	P=0,2919	F (6, 15) = 1,836	P=0,1591	P=0,4991	P=0,5662

<b>B</b>	2W ANOVA	
<i>Bmal1</i>	F (1, 28) = 4,327	<b>P=0,0468</b>
<i>Per1</i>	F (1, 31) = 0,4879	P=0,4901
<i>Nr1d1</i>	F (1, 32) = 5,721	<b>P=0,0228</b>
<i>Gabbr2</i>	F (1, 32) = 1,919	P=0,1756
<i>Gabrd</i>	F (1, 32) = 4,621	<b>P=0,0392</b>
<i>Stat3</i>	F (1, 32) = 1,962	P=0,1710

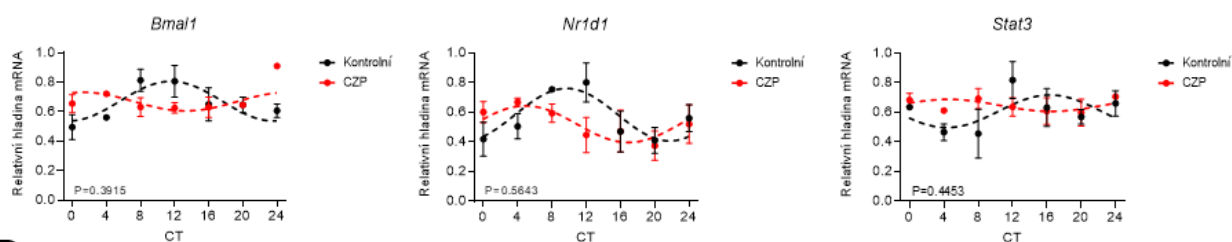
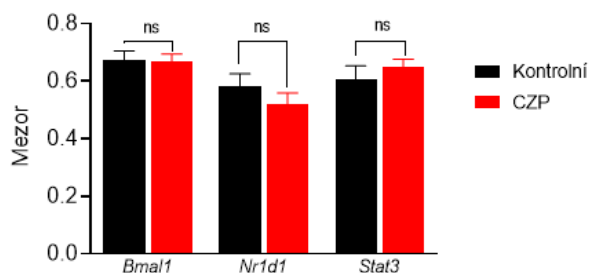
Tab. 2 **A)** Statistické vyhodnocení cirkadiánní rytmicity expresních profilů v čichových lalocích potkanů v P18 pomocí 1W ANOVA a kosinorovy analýzy. **B)** Statistické srovnání mezi skupinami na základě 2W ANOVA. Statisticky signifikantní hodnoty jsou tučně zvýrazněny.

### 7.3 Frontální kortex P18

Obr. 7A zobrazuje expresní profily sledovaných genů ve frontálním kortexu potkanů v P18. V kontrolní skupině kosinorova analýza a současně 1W ANOVA nepotvrdily rytmicitu u žádného ze sledovaných genů. Taktéž u CZP skupiny nebyla u žádného z genů potvrzena rytmicita. Ani rozdíly mezi skupinami testované 2W ANOVA nebyly u žádného z genů signifikantní. Obr. 7B ukazuje rozdíl ve velikost mezoru mezi kontrolní a CZP skupinou, přičemž u žádného ze sledovaných genů rozdíl nepřekročil statistickou hladinu významnosti.

V tab. 3A jsou zobrazeny výsledky testů 1W ANOVA a kosinorovy analýzy. V testu rytmicity profilu exprese nebyly pomocí 1W ANOVA jako signifikantní vyhodnoceny žádné geny v kontrolní skupině, ani CZP skupině. Kosinorova analýza vyhodnotila jako signifikantní v kontrolní skupině *Bmall* ( $P=0,0173$ ) a *Nr1d1* ( $P=0,186$ ), v CZP skupině takto nebyl vyhodnocen žádný z genů. Rytmicita v profilu exprese byla zamítnuta u všech genů, jelikož žádný z nich nepřekročil současně v obou testech statistickou hladinu významnosti. V tab. 3B jsou uvedeny výsledky 2W ANOVA, přičemž tento test neodhalil signifikantní rozdíly ve velikosti mezoru mezi skupinami pro žádný ze sledovaných genů.



**A****B**

*Obr. 7 A)* Cirkadiální profily v expresi vybraných genů ve frontálním kortexu potkanů v P18. Grafy zobrazují kosinorovou křivku pro kontrolní skupinu (černé křivky) a skupinu s aplikovaným CZP (červené křivky). Křivka je proložena průměry relativních hladin mRNA v jednotlivých časových bodech ( $n=4 \pm \text{SEM}$ ). Sinusoida je v grafu značena přerušovaně, pokud byla statistickými testy (kosinorovou analýzou a jednocestnou ANOVA) zamítnuta rytmicita exprese. Hodnota P značí rozdíl mezi skupinami podle dvoucestné ANOVA. **B)** Srovnání hodnot mezoru mezi kontrolní skupinou (černé sloupce) a skupinou s aplikovaným CZP (červené sloupce).

<b>A</b>	1W ANOVA				Cosinor	
	Kontrolní		CZP		Kontrolní	CZP
	<i>Bmal1</i> <i>Per1</i>	F (6, 11) = 2,072	P = 0,1398	F (6, 10) = 1,706	P=0,2171	<b>P=0,0173</b>
<i>Nr1d1</i> <i>Gabbr2</i> <i>Gabrd</i>	F (6, 14) = 2,111	P = 0,1169	F (6, 19) = 0,8676	P = 0,5361	<b>P=0,0186</b>	P=0,1353
<i>Stat3</i>	F (6, 14) = 1,308	P = 0,3161	F (6, 14) = 0,3272	P = 0,9116	P=0,2926	P=0,6095

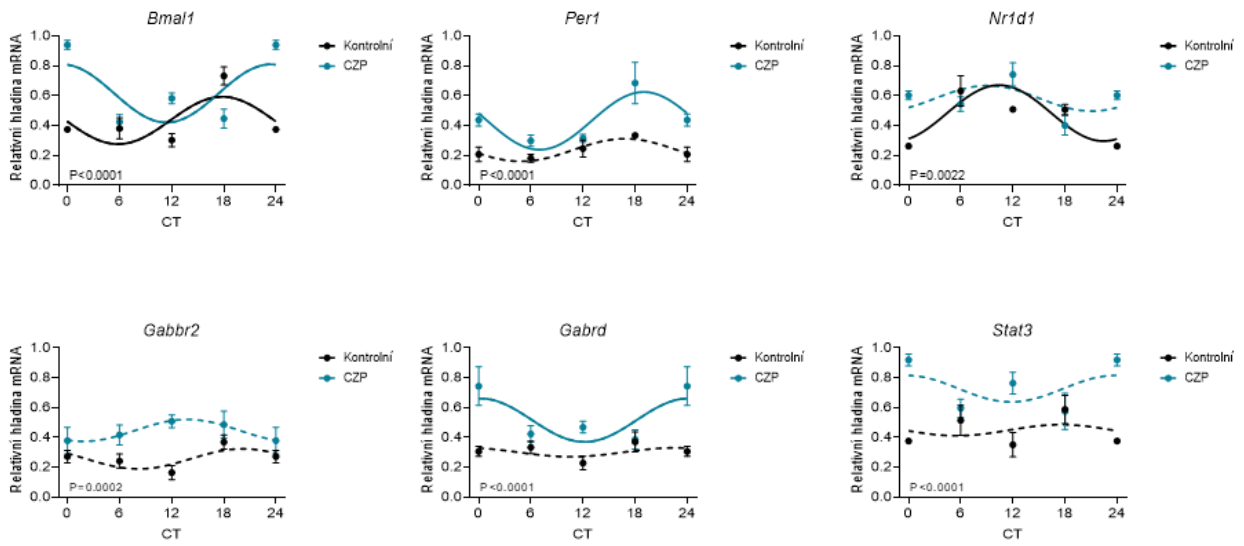
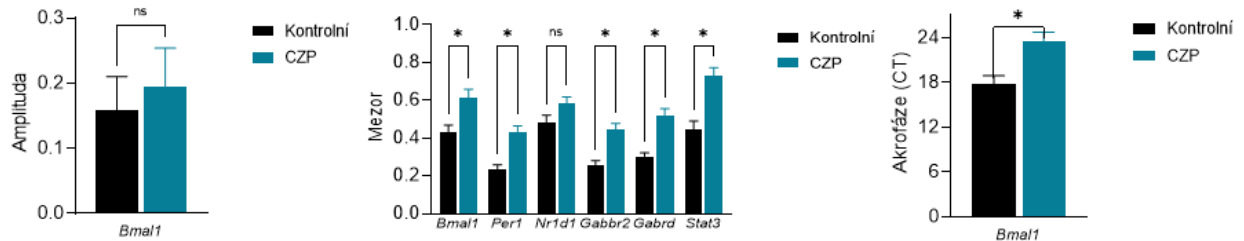
<b>B</b>	2W ANOVA	
<i>Bmal1</i> <i>Per1</i>	F (1, 25) = 0,7605	P = 0,3915
<i>Nr1d1</i> <i>Gabbr2</i> <i>Gabrd</i>	F (1, 33) = 0,3391	P = 0,5643
<i>Stat3</i>	F (1, 28) = 0,5994	P = 0,4453

Tab. 3 **A)** Statistické vyhodnocení cirkadiánní rytmicity expresních profilů ve frontálním kortexu potkanů v P18 pomocí 1W ANOVA a kosinorovy analýzy. **B)** Statistické srovnání mezi skupinami na základě 2W ANOVA. Statisticky signifikantní hodnoty jsou tučně zvýrazněny.

## 7.4 Hipokampus P60

Obr. 8A zobrazuje expresní profily sledovaných genů v hipokampu potkanů v P60. V kontrolní skupině kosinorova analýza a současně 1W ANOVA potvrdily cirkadiánní rytmicitu pro geny *Bmall* a *Nr1d1*. Po aplikaci CZP vykazovaly rytmicitu v expresi geny *Bmall*, *Per1* a *Gabrd*. Rozdíly mezi skupinami testované 2W ANOVA byly signifikantní u všech sledovaných genů, tedy u *Bmall*, *Per1*, *Nr1d1*, *Gabbr2*, *Gabrd* a *Stat3*. Obr. 8B ukazuje cirkadiánní parametry rytmu genu, jenž byl rytmický pro kontrolní i CZP skupinu, tím je *Bmall*. U *Bmall* nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly v amplitudě, ale statisticky významný rozdíl ( $P < 0,01$ ) byl zaznamenán pro CT akrofáze. Statisticky významný rozdíl ve velikosti mezoru mezi kontrolní a CZP skupinou byl prokázán u genů *Bmall*, *Per1*, *Gabbr2*, *Gabrd* a *Stat3*.

V tab. 4A jsou zobrazeny výsledky testů 1W ANOVA a kosinorovy analýzy. V testu rytmicity profilu exprese byly pomocí 1W ANOVA jako signifikantní v kontrolní skupině vyhodnoceny geny *Bmall* ( $P=0,0006$ ) a *Nr1d1* ( $P=0,0063$ ). Ve skupině CZP to byly geny *Bmall* ( $P < 0,0001$ ), *Per1* ( $P=0,0113$ ), *Nr1d1* ( $P=0,0154$ ) a *Gabrd* ( $P=0,0115$ ). Kosinorova analýza vyhodnotila jako signifikantní v kontrolní skupině geny *Bmall* ( $P=0,0267$ ) a *Nr1d1* ( $P=0,0136$ ), ve skupině CZP *Bmall* ( $P=0,0165$ ), *Per1* ( $P=0,0044$ ) a *Gabrd* ( $P=0,0482$ ). Rytmicita v profilu exprese byla potvrzena u genů, které v obou testech současně překročily statistickou hladinu významnosti. Pro kontrolní skupinu to jsou geny *Bmall* a *Nr1d1*, pro CZP skupinu to představují *Bmall*, *Per1* a *Gabrd*. V tab. 4B jsou uvedeny výsledky 2W ANOVA. Tento test odhalil signifikantní rozdíly ve velikosti mezoru mezi skupinami pro všechny ze sledovaných genů – *Bmall* ( $P < 0,0001$ ), *Per1* ( $P < 0,0001$ ), *Nr1d1* ( $P=0,0022$ ), *Gabbr2* ( $P=0,0002$ ), *Gabrd* ( $P < 0,0001$ ) a *Stat3* ( $P < 0,0001$ ).

**A****B**

**Obr. 8 A)** Cirkadiální profily v expresi vybraných genů v hipokampu potkanů v P60. Grafy zobrazují kosinorovu křivku pro kontrolní skupinu (černé křivky) a skupinu s aplikovaným CZP (modré křivky). Křivka je proložena průměry relativních hladin mRNA v jednotlivých časových bodech ( $n=6 \pm \text{SEM}$ ). Sinusoida je v grafu značena přerušovaně, pokud byla statistickými testy (kosinorovou analýzou a jednocestnou ANOVA) zamítnuta rytmicita exprese. Hodnota P značí rozdíl mezi skupinami podle dvoucestné ANOVA.

**B)** Srovnání hodnot amplitudy, mezoru a akrofáze rytmu mezi kontrolní skupinou (černé sloupce) a skupinou s aplikovaným CZP (modré sloupce). \* značí statisticky významný rozdíl mezi skupinami získaný Studentovým t-testem,  $p < 0,05$ .

<b>A</b>	1W ANOVA				Cosinor	
	Kontrolní		CZP		Kontrolní	CZP
<i>Bmal1</i>	F (4, 13) = 10,23	<b>P=0,0006</b>	F (4, 15) = 28,18	<b>P&lt;0,0001</b>	<b>P=0,0267</b>	<b>P=0,0165</b>
<i>Per1</i>	F (4, 11) = 1,456	P=0,2804	F (4, 14) = 4,873	<b>P=0,0113</b>	P=0,1609	<b>P=0,0044</b>
<i>Nr1d1</i>	F (4, 10) = 6,862	<b>P=0,0063</b>	F (4, 15) = 4,365	<b>P=0,0154</b>	<b>P=0,0136</b>	P=0,261
<i>Gabbr2</i>	F (4, 13) = 2,197	P=0,1262	F (4, 14) = 0,7098	P=0,5986	P=0,1516	P=0,2301
<i>Gabrd</i>	F (4, 14) = 1,353	P=0,2994	F (4, 15) = 4,715	<b>P=0,0115</b>	P=0,572	<b>P=0,0482</b>
<i>Stat3</i>	F (4, 13) = 1,734	P=0,2025	F (4, 17) = 0,6544	P=0,6318	P=0,8386	P=0,3731

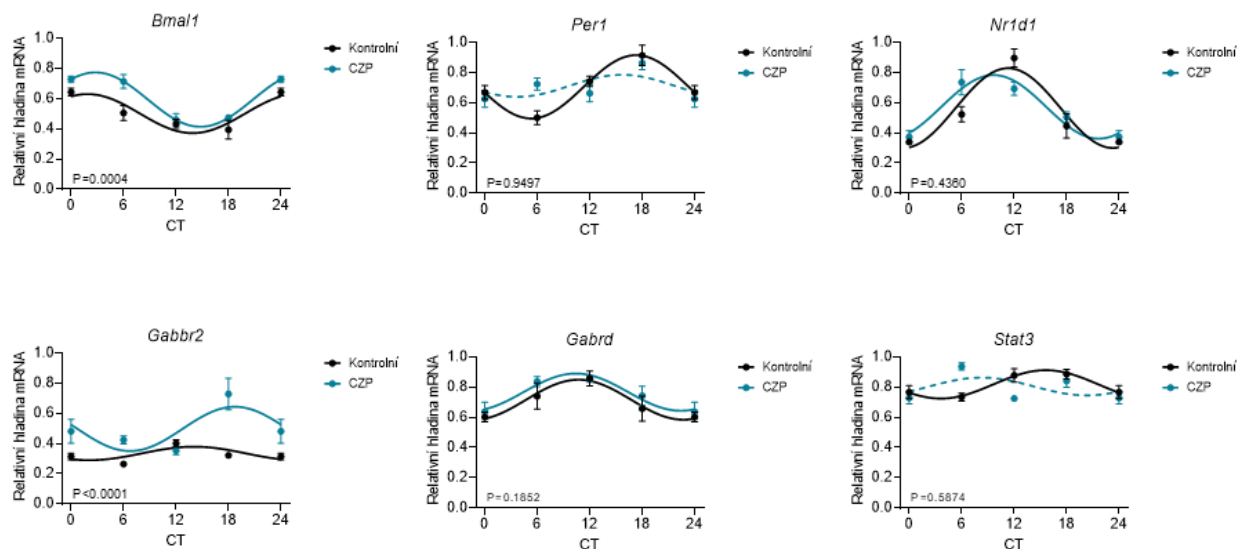
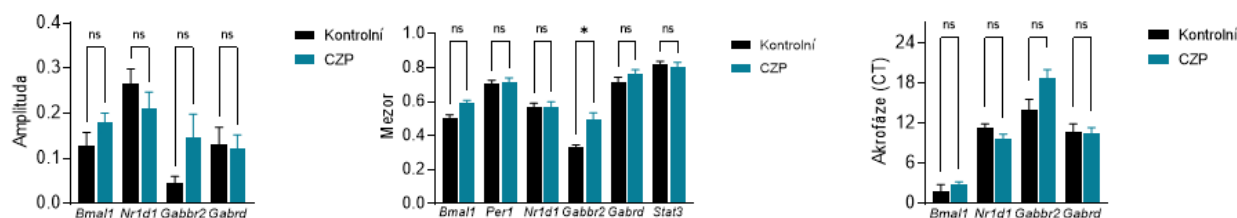
<b>B</b>	2W ANOVA	
<i>Bmal1</i>	F (1, 28) = 56,06	<b>P&lt;0,0001</b>
<i>Per1</i>	F (1, 26) = 22,68	<b>P&lt;0,0001</b>
<i>Nr1d1</i>	F (1, 25) = 11,67	<b>P=0,0022</b>
<i>Gabbr2</i>	F (1, 27) = 18,84	<b>P=0,0002</b>
<i>Gabrd</i>	F (1, 29) = 36,69	<b>P&lt;0,0001</b>
<i>Stat3</i>	F (1, 28) = 36,84	<b>P&lt;0,0001</b>

Tab. 4 **A)** Statistické vyhodnocení cirkadiánní rytmicity expresních profilů v hipokampu potkanů v P60 pomocí 1W ANOVA a kosinorovy analýzy. **B)** Statistické srovnání mezi skupinami na základě 2W ANOVA. Statisticky signifikantní hodnoty jsou tučně zvýrazněny.

## 7.5 Čichové laloky P60

Obr. 9A zobrazuje expresní profily sledovaných genů v čichových lalocích potkanů v P60. V kontrolní skupině kosinorova analýza a současně 1W ANOVA potvrdily cirkadiánní rytmicitu pro všechny sledované geny, tedy *Bmall*, *Per1*, *Nr1d1*, *Gabbr2*, *Gabrd* a *Stat3*. Po aplikaci CZP vykazovaly rytmickou expresi geny *Bmall*, *Nr1d1*, *Gabbr2* a *Gabrd*. Rozdíly mezi skupinami testované 2W ANOVA byly signifikantní u genů *Bmall* a *Gabbr2*. Obr. 9B ukazuje cirkadiánní parametry rytmu genů, které byly rytmické pro kontrolní i CZP skupinu, tedy *Bmall*, *Nr1d1*, *Gabbr2* a *Gabrd*. U žádného z vyjmenovaných genů nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v amplitudě, ani signifikantní rozdíly v CT akrofáze. Dále obr. 9B ukazuje rozdíl ve velikosti mezoru mezi kontrolní a CZP skupinou pro všechny sledované geny, z nichž pouze rozdíl mezoru u genu *Gabbr2* překročil statisticky významnou hladinu.

V tab. 5A jsou zobrazeny výsledky testů 1W ANOVA a kosinorovy analýzy. V testu rytmicity profilu exprese byly pomocí 1W ANOVA jako signifikantní v kontrolní skupině vyhodnoceny všechny geny, tedy *Bmall* ( $P=0,0013$ ), *Per1* ( $P=0,0007$ ), *Nr1d1* ( $P<0,0001$ ), *Gabbr2* ( $P=0,0044$ ), *Gabrd* ( $P=0,0413$ ) a *Stat3* ( $P=0,0178$ ). Ve skupině CZP signifikanci vykazovaly taktéž všechny geny – *Bmall* ( $P<0,0001$ ), *Per1* ( $P=0,0248$ ), *Nr1d1* ( $P=0,0004$ ), *Gabbr2* ( $P=0,025$ ), *Gabrd* ( $P=0,0156$ ) a *Stat3* ( $P=0,0027$ ). Kosinorova analýza vyhodnotila jako signifikantní v kontrolní skupině všechny geny, s hodnotami *Bmall* ( $P=0,0009$ ), *Per1* ( $P<0,0001$ ), *Nr1d1* ( $P<0,0001$ ), *Gabbr2* ( $P=0,0301$ ), *Gabrd* ( $P=0,0006$ ) a *Stat3* ( $P=0,014$ ). Ve skupině CZP byly signifikantní geny *Bmall* ( $P<0,0001$ ), *Nr1d1* ( $P<0,0001$ ), *Gabbr2* ( $P=0,0375$ ) a *Gabrd* ( $P=0,0025$ ). Rytmicita v profilu exprese byla potvrzena u genů, které v obou testech současně překročily statistickou hladinu významnosti. Pro kontrolní skupinu to jsou všechny sledované geny, pro CZP skupinu to jsou geny *Bmall*, *Nr1d1*, *Gabbr2* a *Gabrd*. V tab. 5B jsou uvedeny výsledky 2W ANOVA, přičemž tento test odhalil signifikantní rozdíly ve velikosti mezoru mezi skupinami pro geny *Bmall* ( $P=0,0004$ ) a *Gabbr2* ( $P<0,0001$ ).

**A****B**

**Obr. 9 A)** Cirkadiánní profily v expresi vybraných genů čichových laloků potkanů v P60. Grafy zobrazují kosinorovu křivku pro kontrolní skupinu (černé křivky) a skupinu s aplikovaným CZP (modré křivky). Křivka je proložena průměry relativních hladin mRNA v jednotlivých časových bodech ( $n=6 \pm \text{SEM}$ ). Sinusoida je v grafu značena přerušovaně, pokud byla statistickými testy (kosinorovou analýzou a jednocestnou ANOVA) zamítnuta rytmicita exprese. Hodnota P značí rozdíl mezi skupinami podle dvoucestné ANOVA. **B)** Srovnání hodnot amplitudy, mezoru a akrofáze rytmu mezi kontrolní skupinou (černé sloupce) a skupinou s aplikovaným CZP (modré sloupce). \* značí statisticky významný rozdíl mezi skupinami získaný Studentovým t-testem,  $p<0,05$ .

<b>A</b>	1W ANOVA				Cosinor	
	Kontrolní		CZP		Kontrolní	CZP
	<i>Bmal1</i>	F (4, 17) = 7,265	<b>P=0,0013</b>	F (4, 16) = 17,13	<b>P&lt;0,0001</b>	<b>P=0,0009</b>
<i>Per1</i>	F (4, 17) = 8,151	<b>P=0,0007</b>	F (4, 16) = 3,737	<b>P=0,0248</b>	<b>P&lt;0,0001</b>	P=0,2207
<i>Nr1d1</i>	F (4, 19) = 21,23	<b>P&lt;0,0001</b>	F (4, 16) = 9,351	<b>P=0,0004</b>	<b>P&lt;0,0001</b>	<b>P&lt;0,0001</b>
<i>Gabbr2</i>	F (4, 15) = 5,977	<b>P=0,0044</b>	F (4, 15) = 3,804	<b>P=0,0250</b>	<b>P=0,0301</b>	<b>P=0,0375</b>
<i>Gabrd</i>	F (4, 17) = 3,153	<b>P=0,0413</b>	F (4, 14) = 4,460	<b>P=0,0156</b>	<b>P=0,006</b>	<b>P=0,0025</b>
<i>Stat3</i>	F (4, 15) = 4,196	<b>P=0,0178</b>	F (4, 14) = 6,913	<b>P=0,0027</b>	<b>P=0,014</b>	P=0,2977

<b>B</b>	2W ANOVA	
<i>Bmal1</i>	F (1, 33) = 15,35	<b>P=0,0004</b>
<i>Per1</i>	F (1, 33) = 0,004048	P=0,9497
<i>Nr1d1</i>	F (1, 35) = 0,6210	P=0,4360
<i>Gabbr2</i>	F (1, 30) = 25,96	<b>P&lt;0,0001</b>
<i>Gabrd</i>	F (1, 31) = 1,836	P=0,1852
<i>Stat3</i>	F (1, 30) = 0,3008	P=0,5874

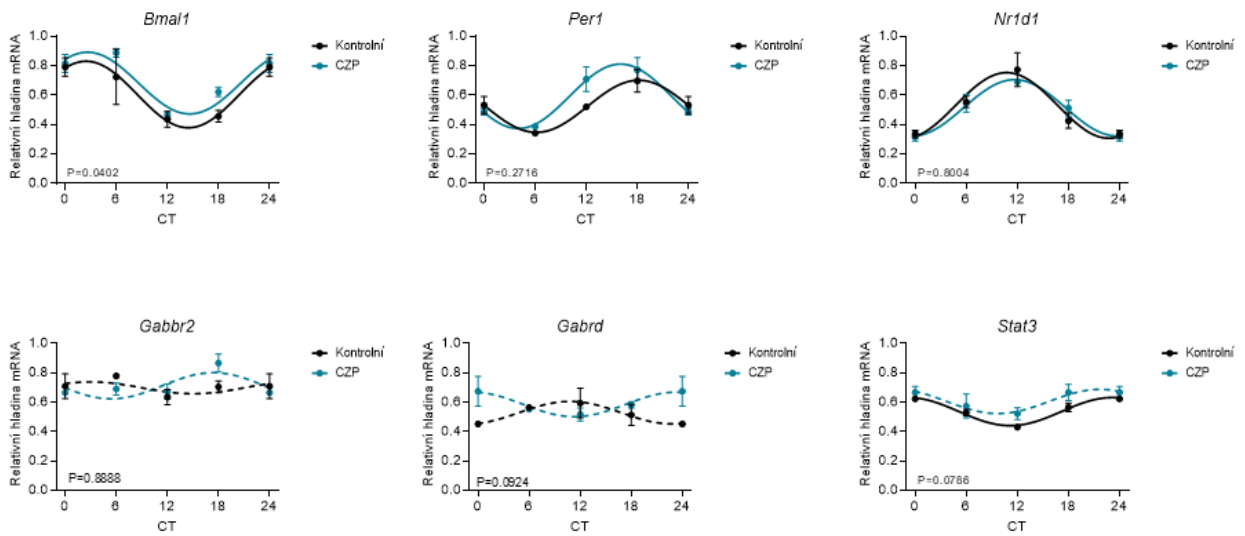
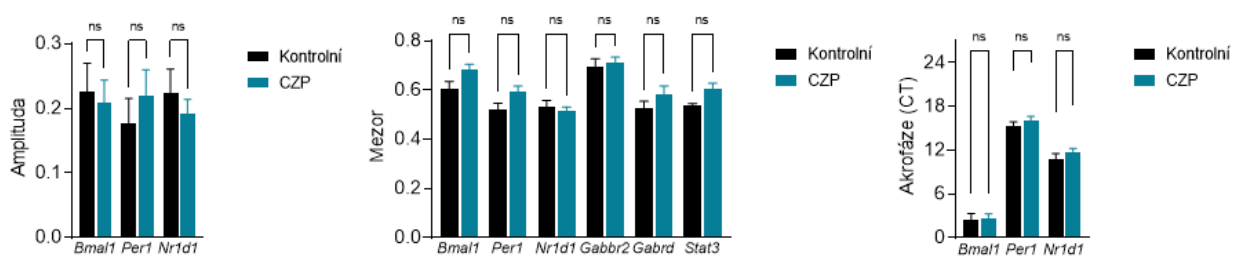
*Tab. 5 A)* Statistické vyhodnocení cirkadiánní rytmicity expresních profilů v čichových lalocích potkanů v P60 pomocí 1W ANOVA a kosinorovy analýzy. **B)** Statistické srovnání mezi skupinami na základě 2W ANOVA. Statisticky signifikantní hodnoty jsou tučně zvýrazněny.



## 7.6 Frontální kortex P60

Obr. 10A zobrazuje expresní profily sledovaných genů ve frontálním kortexu potkanů v P60. V kontrolní skupině kosinorova analýza a současně 1W ANOVA potvrdily cirkadiální rytmicitu pro geny *Bmall*, *Per1*, *Nr1d1* a *Stat3*. Po aplikaci CZP vykazovaly rytmicitu v expresi geny *Bmall*, *Per1* a *Nr1d1*. Rozdíly mezi skupinami testované 2W ANOVA nebyly u žádného z genů signifikantní. Obr. 10B ukazuje cirkadiální parametry rytmu genů, které byly rytmické pro kontrolní i CZP skupinu, tedy *Bmall*, *Per1* a *Nr1d1*. Ani jeden z nich nevykazoval signifikantní rozdíly v amplitudě či v CT akrofáze. Rozdíl ve velikost mezoru mezi kontrolní a CZP skupinou u žádného ze sledovaných genů nepřekročil statisticky významnou hladinu.

V tab. 6A jsou zobrazeny výsledky testů 1W ANOVA a kosinorovy analýzy. V testu rytmicity profilu exprese byly pomocí 1W ANOVA jako signifikantní v kontrolní skupině vyhodnoceny geny *Bmall* ( $P=0,0128$ ), *Per1* ( $P=0,0294$ ), *Nr1d1* ( $P=0,0039$ ) a *Stat3* ( $P=0,0056$ ). Tento test ve skupině CZP jako signifikantní vyhodnotil *Bmall* ( $P<0,0001$ ), *Per1* ( $P=0,0013$ ), *Nr1d1* ( $P<0,0001$ ) a *Gabbr2* ( $P=0,0194$ ). Kosinorova analýza vyhodnotila jako signifikantní v kontrolní skupině *Bmall* ( $P=0,0009$ ), *Per1* ( $P=0,0025$ ), *Nr1d1* ( $P=0,0003$ ) a *Stat3* ( $P=0,0003$ ). Ve skupině CZP byly jako signifikantní vyhodnoceny geny *Bmall* ( $P<0,0001$ ), *Per1* ( $P<0,0001$ ) a *Nr1d1* ( $P<0,0001$ ). Rytmicita v profilu exprese byla potvrzena u genů, které v obou testech současně překročily statistickou hladinu významnosti. Pro kontrolní skupinu to jsou geny *Bmall*, *Per1*, *Nr1d1* a *Stat3*, pro CZP skupinu to představují geny *Bmall*, *Per1* a *Nr1d1*. V tab. 6B jsou uvedeny výsledky 2W ANOVA, přičemž tento test odhalil signifikantní rozdíl ve velikosti mezoru mezi skupinami u genu *Bmall* ( $P=0,0402$ ).

**A****B**

**Obr. 10 A)** Cirkadiální profily v expresi vybraných genů ve frontálním kortexu potkanů v P60. Grafy zobrazují kosinorovou křivku pro kontrolní skupinu (černé křivky) a skupinu s aplikovaným CZP (modré). Křivka je proložena průměry relativních hladin mRNA v jednotlivých časových bodech ( $n=6 \pm \text{SEM}$ ). Sinusoida je v grafu značena přerušovaně, pokud byla statistickými testy (kosinorovou analýzou a jednocestnou ANOVA) zamítnuta rytmicita exprese. Hodnota P značí rozdíl mezi skupinami podle dvoucestné ANOVA. **B)** Srovnání hodnot amplitudy, mezoru a akrofáze rytmu mezi kontrolní skupinou (černé sloupce) a skupinou s aplikovaným CZP (modré sloupce).

<b>A</b>	1W ANOVA				Cosinor	
	Kontrolní		CZP		Kontrolní	CZP
<i>Bmal1</i>	F (4, 9) = 5,932	<b>P=0,0128</b>	F (4, 18) = 14,17	<b>P&lt;0,0001</b>	<b>P=0,0009</b>	<b>P&lt;0,0001</b>
<i>Per1</i>	F (4, 9) = 4,449	<b>P=0,0294</b>	F (4, 17) = 7,281	<b>P=0,0013</b>	<b>P=0,0025</b>	<b>P&lt;0,0001</b>
<i>Nr1d1</i>	F (4, 9) = 8,564	<b>P=0,0039</b>	F (4, 17) = 16,60	<b>P&lt;0,0001</b>	<b>P=0,0003</b>	<b>P&lt;0,0001</b>
<i>Gabbr2</i>	F (4, 9) = 0,5249	P=0,7205	F (4, 16) = 4,007	<b>P=0,0194</b>	P=0,6273	P=0,0635
<i>Gabrd</i>	F (4, 9) = 1,137	P=0,3985	F (4, 18) = 0,4173	P=0,7937	P=0,1101	P=0,1485
<i>Stat3</i>	F (4, 6) = 11,55	<b>P=0,0056</b>	F (4, 17) = 1,631	P=0,2123	<b>P=0,0003</b>	P=0,0527

<b>B</b>	2W ANOVA	
<i>Bmal1</i>	F (1, 27) = 4,644	<b>P=0,0402</b>
<i>Per1</i>	F (1, 26) = 1,261	P=0,2716
<i>Nr1d1</i>	F (1, 26) = 0,06524	P=0,8004
<i>Gabbr2</i>	F (1, 25) = 0,01994	P=0,8888
<i>Gabrd</i>	F (1, 27) = 3,044	P=0,0924
<i>Stat3</i>	F (1, 23) = 3,387	P=0,0786

Tab. 6 **A)** Statistické vyhodnocení cirkadiánní rytmicity expresních profilů ve frontálním kortexu potkanů v P60 pomocí 1W ANOVA a kosinorovy analýzy. **B)** Statistické srovnání mezi skupinami na základě 2W ANOVA. Statisticky signifikantní hodnoty jsou tučně zvýrazněny.

## 8 Diskuze

### 8.1 Experimentální paradigma

Tato diplomová práce navazuje na předchozí experimenty naší a spolupracující laboratoře ve Fyziologickém ústavu AVČR. Předmětem předchozího výzkumu bylo hledání změny v expresi GABAergních receptorů v hipokampu po pětidenním podávání CZP v časné ontogenezi (Kubová et al., 2020). Tato diplomová práce se zaměřuje na vliv podávání CZP v časné postnatální ontogenezi na vývoj cirkadiánní rytmicity v expresi hodinových genů a také na vzorové podjednotky GABA receptorů.

Geny, jejichž cirkadiánní profil byl sledován, jsou *Bmal1*, *Per1*, *Nr1d1*, *Gabrd*, *Gabbr2* a *Stat3*. „Housekeepingový“ gen *B2m* byl vybrán na základě předchozích studií (Boda et al., 2009) a výběr byl ověřen v programu NormFinder.

Geny *Bmal1*, *Per1* a *Nr1d1* představují základní interakční jednotky v molekulárním hodinovém mechanismu. Profil jejich exprese a rozdíly v jejich fázích tak umožní zjistit v jakém stavu se nachází cirkadiánní systém v testovaných strukturách mozku.

Změny ve fungování GABAergního systému může naznačit změněná exprese genu *Gabrd*, jenž je genem pro podjednotku  $\delta$  GABA<sub>A</sub> receptoru, a genu *Gabbr2*, který kóduje druhou podjednotku receptoru GABA<sub>B</sub>. Ačkoliv se CZP váže k  $\delta$  podjednotce s nižší afinitou než k jiným podjednotkám (Brooks-Kayal et al., 1999), byla  $\delta$  podjednotka zvolena z několika důvodů. Receptor GABA<sub>A</sub> je testován jako terapeutický cíl pro léčbu neurovývojových onemocnění (Braat and Kooy, 2015), jež jsou studovány také v souvislosti s prenatálním a postnatálním užíváním BDZ (Wang et al., 2022). Nedávné studie ukazují přímou vazbu některých neurovývojových postižení ke změněné expresi specificky  $\delta$  podjednotky (Ahring et al., 2022). Ukázalo se také, že snížení exprese  $\delta$  podjednotky ve frontálním kortexu během kritické periody vede k rozvoji psychických poruch (Maldonado-Avilés et al., 2009; He et al., 2019). V předchozím výzkumu naší laboratoře byla po opakované injekci CZP ve dnech P7–P11 exprese této podjednotky pozměněna ve větší míře, než exprese podjednotek  $\alpha$  či  $\gamma$ . Po 48 hodinách od poslední aplikace CZP bylo zaznamenáno statisticky významné snížení exprese *Gabrd* v kortexu a hipokampu (Kubová et al., 2020). Změna exprese *Gabrd* v našich experimentech by tedy mohla naznačit mechanismus, kterým BDZ napomáhá k rozvoji neurovývojových onemocnění.

Receptory GABA<sub>A</sub>, jež obsahují podjednotku  $\delta$ , jsou schopny tonické inhibice. Tonická GABAergní signalizace je významným mechanismem umožňujícím synchronizaci buněk SCN a jednotnost výstupního signálu (DeWoskin et al., 2015) a mohla by hrát

podobnou úlohu také v cirkadiánních hodinách jiných struktur mozku. Tonická GABAergní signalizace je důležitá pro vývoj neuronových sítí hipokampu, což může být podstatou neurovývojových změn (Holter et al., 2010).

Gen *Gabbr2* je genem pro podjednotku 2 heterodimerního receptoru GABA<sub>B</sub>. Podjednotka 2 GABA<sub>B</sub> je obligátně komplementární k podjednotce 1 tohoto receptoru, a proto postačuje ke zjištění míry exprese celého heterodimeru (Evenseth et al., 2020).

Transkripční faktor STAT3 je studován zejména v souvislosti s funkcí imunitního systému (Hillmer et al., 2016), avšak význam jeho fyziologické hladiny, která osciluje v cirkadiánním rytmu (Moravcová et al., 2016, 2018; Kubištová et al., 2020), není znám. Některé výsledky naznačují, že STAT3 inhibičním působením napomáhá regulovat určité procesy v organismu. Např. zvýšená exprese *Stat3* během subjektivní noci inhibuje enzym AANAT, čímž potlačuje syntézu melatoninu v epifyze (Moravcová et al., 2021). Změna jeho rytmické exprese v tomto experimentu může naznačit způsob, jakým GABAergní signalizace ovlivňuje imunitní a jiné regulační procesy v mozku.

Aplikace CZP byla zvolena mezi P7 a P11, jelikož se jedná o kritickou periodu vývoje CNS. V tomto období vrcholí neuronální prořizka a stávající neurony rozšiřují hustotu svých axonů a dendritů. K tomu je zapotřebí velké množství funkčních gliových buněk, jejichž proliferace v tuto dobu vrcholí a také dochází k dozrávání oligodendrocytů. Tyto výrazné změny činí CNS velmi zranitelnou v P7 – P11 (Semple et al., 2013). Jelikož během kritické periody neprobíhají vždy všechny výše zmíněné procesy současně, byl zvolen časový interval 5 dní, aby došlo k zásahu do co nejvíce vývojových procesů. Taktéž řada již existujících výzkumů se zabývá účinkem akutní či chronické aplikace BDZ na postnatální vývoj, ovšem ne mnoho jich popisuje účinky subchronické aplikace BDZ. V experimentech spolupracující laboratoře se ukázalo, že při použití stejného aplikačního schématu, jaké je použito v této diplomové práci, byl potkanům způsoben mírný kognitivní deficit, došlo ke změnám v emočním chování, k navození hyperaktivity a k poruchám pozornosti. Některé z těchto změn přetrvaly až do dospělosti (Mikulecká et al., 2014a, 2014b).

## 8.2 Cirkadiánní rytmus genové exprese kontrolní skupiny

Během P18 je sice již ukončen vývoj SCN a jeho cirkadiánní rytmus by již měl být z většiny synchronizován světelným zeitgeberem, ovšem jeho výstupní signál ještě nemusí dosahovat plné síly (Canaple et al., 2018). Zda je v tomto vývojové stádiu v jiné mozkové struktuře rytmická genová exprese nezáleží pouze na signálu z SCN, ale také zda je již dokončen vývoj dané struktury a její synaptická spojení.

Naše výsledky ukazují, že v P18 nejsou cirkadiánní rytmy průkazné ve všech testovaných strukturách mozku. Kontrolní skupiny ukazují, že hipokampus je nejvíce maturován a již v této vývojové fázi dosahuje rytmicity u všech sledovaných genů. Čichové laloky vykazují rytmicitu pouze u hodinových genů *Bmall* a *Per1*, což naznačuje pozvolný vývoj amplitudy rytmu genové exprese. Frontální kortex v P18 nevykazuje cirkadiánní rytmus, ačkoliv testovaná skupina genů byla u této struktury menší z důvodu technické chyby a nedostatečného objemu vzorku.

Naše data ukazují že hipokampus, jehož cirkadiánní rytmus v genové expresi byl ze sledovaných struktur jako jediný v P18 kompletní, vykazuje v P60 rytmus pouze u *Bmall* a *Nr1d1*. Vývoj exprese *Bmall* a *Nr1d1* v hipokampu je v souladu s výsledky, jež publikovaly skupiny výzkumníků Pramong et al. (2015) a da Rocha et al. (2022), avšak dle jejich výsledků by v P60 měla být rytmická i exprese *Per1*. Cirkadiánním profilem exprese dalších námi sledovaných genů v hipokampu se tyto ani jiné práce nezabývaly. Tento rozdíl mezi naší a publikovanými pracemi může vyplývat z malého počtu časových bodů pro odběr tkáně v našich experimentech a tím i možného zkreslení amplitudy rytmu přeskočením časových bodů s maximální nebo minimální expresní hladinou.

Čichové bulby v P60 dosahují rytmu u všech sledovaných genů. Taktéž u frontálního kortexu v P60 je již rytmická exprese hodinových genů a *Stat3*, nicméně tam geny *Gabbr2* a *Gabrd* nevykazují cirkadiánní rytmus.

Odlišná maturace cirkadiánních rytmů mezi strukturami může korespondovat s morfologickým vývojem těchto struktur. Zobrazovacími technikami bylo např. ukázáno, že frontální kortex člověka se vyvíjí jako jedna z poslední struktur mozku a bývá funkčně i morfologicky maturován až v postpubertálním věku (Arain et al., 2013). Naopak hipokampus je jedna ze prvních struktur, u nichž je dokončen vývoj, avšak zachovává si výraznou plasticitu během celého života (Lavenex a Lavenex, 2013).

### **8.3 Změny v expresi a rytmu genů po podání CZP**

Testem 2W ANOVA můžeme porovnat změny v expresním profilu genů mezi kontrolní a CZP skupinou pro danou mozkovou strukturu. Taktéž můžeme u genů, u nichž byla zjištěna rytmická exprese, porovnat změnu v cirkadiánních parametrech po aplikaci CZP.

V hipokampu v P18 došlo po podání CZP ke ztrátě rytmu u genů *Bmall*, *Per1*, *Gabbr2*, *Gabrd* a *Stat3*, výjimku tvořil gen *Nr1d1*. Ten rytmus zachoval a došlo u něj k fázovému posunu akrofáze. Čichové laloky v P18 po aplikaci CZP ztratily rytmus genů *Bmall* a *Per1*, které byly v kontrolní skupině jedinými rytmickými geny. Ve frontálním

kortexu v P18 nenastaly po CZP žádné změny, avšak ani v kontrolní skupině nebyl žádný gen rytmický.

Ve struktuře hipokampu v P60 nastalo po podání CZP několik změn. U všech sledovaných genů se zvýšila jejich exprese. Genu *Bmal1* se zvýšila amplituda rytmu a nastal fázový posun akrofáze. U genů *Per1* a *Gabrd* byl navozen rytmus a naopak gen *Nr1d1* prodělal ztrátu rytmu. U čichových laloků v P60 došlo po CZP ke ztrátě rytmu u *Per1* a *Stat3*. U genů *Bmal1* a *Gabbr2* došlo ke zvýšení exprese. Ve frontálním kortexu v P60 po aplikaci CZP došlo ke ztrátě rytmu pouze u *Stat3*.

#### 8.4 Rozdíly mezi strukturami a kohortami po podání CZP

Z předchozích odstavců vyplývá, že cirkadiánní rytmy v každé ze zkoumaných struktur reagují na CZP jiným způsobem. Nejmenší rozdíly v profilech genové exprese byly naměřeny ve frontálním kortexu. V P18 nebyly signifikantně odlišné expresní profily ani jednoho ze tří testovaných genů, v P60 se signifikantně lišila pouze exprese genu *Bmal1*, avšak ani jeden z cirkadiánních parametrů nebyl signifikantně odlišný od kontrol. O něco více reagoval cirkadiánní systém čichových laloků, kde se v P18 významně lišily tři ze šesti a v P60 dva ze šesti expresních profilů. Nejvíce reaktivní strukturu představuje hipokampus. Přesto, že v P18 nebyly zjištěny žádné signifikantní změny mezi expresními profily, došlo v CZP skupině u téměř všech genů, s výjimkou *Nr1d1*, ke ztrátě cirkadiánní rytmicity. Je velmi zajímavé, že všechny sledované geny se mezi skupinami významně lišily ve své expresi až v P60. Tato změna byla pravděpodobně podmíněna signifikantně vyšší expresní hladinou, posuzovanou jako hodnota mezoru, u všech genů s výjimkou *Nr1d1*.

První úvahou vedoucí k vysvětlení těchto rozdílů, můžeme posuzovat míru zasažení jednotlivých struktur zvolenou dávkou CZP. Jelikož se BDZ, včetně CZP, vážou především na  $\alpha$  či  $\gamma$  podjednotku GABA<sub>A</sub> receptoru, jedním z možných vysvětlení by byla odlišná hustota těchto podjednotek odpovídající pořadí reaktivity struktur – nejméně ve frontálním kortexu, více v čichových lalocích a nejvíce v hipokampu. Ovšem tak tomu není a rozložení receptorů je v pořadí – nejméně ve frontálním kortexu, více v hipokampu a nejvíce v čichových lalocích (Malherbe et al., 1990). Pokud by toto bylo alespoň částečným vysvětlením, že nízká hustota GABA<sub>A</sub> receptorů ve frontálním kortexu je příčinou jeho stability vůči CZP, tak by v rozdílné reaktivitě hipokampu a čichových laloků hrály roli ještě další faktory. Tím hlavním by mohl být fakt, že hipokampus mezi ostatními mozkovými strukturami vyniká svojí velikou schopností plasticity, která bývá odpovědí na externí

podněty (Neves et al., 2008). Farmakologický zásah CZP do GABAergního systému tak mohl v hipokampu vyvolat výraznější změny než čichovém kortexu.

Pokud došlo u dané mozkové struktury po aplikaci CZP ke změně v expresi, měla v každém z obou vývojových stádií jiný průběh. U skupiny P18 reagovaly změnou množství exprimovaných genů pouze čichové laloky, a to snížením genové exprese, zatímco v P60 se v hipokampu a čichových lalocích změna míry exprese projevila zvýšením. Je tedy možné, že reakce mozkových struktur na časný farmakologický zásah se v průběhu času mění a s vývojem jedince dochází určitým způsobem k adaptaci.

## 8.5 Citlivost genové exprese na CZP

Naše výsledky naznačují, že expresní mechanismus každého ze sledovaných genů má jinou citlivost k zásahu CZP. Nejvyšší stabilitu a zachování nezměněného expresního profilu podle 2W ANOVA vykazují shodně geny *Per1* a *Stat3*, jejichž expresní profily se liší mezi skupinami pouze u hipokampu v P60. Poměrně stabilní jsou také exprese genů *Gabbr2*, *Gabrd* a *Nr1dl*, naopak exprese *Bmall* se lišila významně ve čtyřech ze šesti testovaných srovnání. Jiným měřítkem pro porovnání změn bylo posouzení ztráty, či „nabytí“ cirkadiánní rytmicity, a změna některého z parametrů cirkadiánního rytmu. Z tohoto srovnání vychází naopak rytmus exprese *Bmall* jako jeden z nejméně ovlivněných a prokazatelně byl ztracen pouze ve dvou případech. Nejstabilnější rytmy mají však exprese *Nr1dl* a *Gabbr2*, které vymizely pouze v jednom případě. Nejvíce ztrát rytmické exprese po aplikaci CZP bylo zaznamenáno u genu *Per1*, a to konkrétně ve třech srovnáních. Jedenkrát, u genu *Per1*, podobně jako u *Gabrd*, došlo naopak ke zvýšení amplitudy, kdy byl rytmus statisticky potvrzen oproti kontrolám. Exprese genu *Stat3* ztratila rytmus ve třech případech. Fázový posun prodělal pouze gen *Nr1dl* a rytmus v expresi *Bmall* měl v jednom případě sníženou amplitudu. Z těchto dat nelze s jistotou usoudit, že některý z testovaných genů je výrazně citlivý na neonatální podání CZP a že některý nereaguje vůbec, ačkoliv citlivost exprese genu *Bmall* je, zdá se, o něco větší než ostatních genů. Cirkadiánní oscilace exprese *Bmall* je regulována dvěma transkripčními faktory. Negativně faktorem REV-ERB $\alpha$ , jenž je kódován genem *Nr1dl*, a pozitivně faktorem ROR $\alpha$ . Vzhledem k tomu, že exprese genu *Nr1dl* patří mezi nejméně ovlivněné ve všech strukturách, je možné, že za sníženou expresí *Bmall* stojí snížená exprese jeho pozitivního regulátoru ROR $\alpha$ . Ačkoliv data o přímém vztahu mezi expresní hladinou *Rora* a podáním BDZ nejsou dohledatelné, existuje řada prací, které ukazují potlačení exprese tohoto genu jinými stimuly, např. pilokarpinem v hipokampu



(Rocha et al., 2016). Je proto možné, že podobný mechanismus zodpovídá také za změny v expresi *Bmal1* v našich experimentech.

Dle přechozích výsledků naší laboratoře by po aplikaci CZP mělo dojít k náhlému snížení exprese *Gabrd* v hipokampu a kortexu, která se po 2 měsících vrací na původní hladinu (Kubová et al., 2020). Prvotní snížení exprese *Gabrd* je shodné se snížením exprese v čichových lalocích P18, avšak v rozporu je další fáze, kdy po 2 měsících je exprese již na vyšší než původní hladině, např. v hipokampu P60. K jistému rozporu také dochází u exprese *Gabbr2*, která má po 2 měsících od aplikace CZP v korových strukturách vyšší expresi a současně v hipokampu dochází k nižší expresi (Kubová et al., 2020). V této práci zůstává exprese *Gabbr2* ve frontálním kortexu beze změn a v hipokampu je exprese naopak po CZP vyšší. Je však třeba zdůraznit, že v předchozí práci byly měřeny exprese pouze v jednom časovém bodě, a proto srovnání s mezorovými hodnotami v této práci úplně nekoresponduje. Je také nutno říci, že v případě *Gabbr2* porovnáваме spíše tendence k nějakým změnám, neboť v předchozí práci byly naměřeny změny pouze v jednotkách procent, které nedosahovaly statistické signifikance.

Naše výsledky také ukazují, že pokud byl u kontrolních zvířat potvrzen rytmus v expresi *Stat3*, tak došlo k jeho ztrátě po aplikaci CZP. Nepřímým potvrzením týkajícím se STAT3 je, že BDZ působí inhibičně na jeho aktivitu (Liu et al., 2015), avšak práce týkající se přímého vztahu BDZ k narušení rytmů exprese *Stat3* nebyly nalezeny.

## 9 Závěr

Výsledky této diplomové práce ukazují, že v období časně postnatální ontogeneze není cirkadiánní systém některých mozkových struktur dostatečně zralý, což zde bylo demonstrováno na čichových lalocích a frontálním kortexu. Naopak cirkadiánní systém hipokampu je v tomto období již maturovaný.

Vyzrálост cirkadiánního systému jednotlivých mozkových struktur může souviset s jejich celkovou maturací v průběhu morfologického vývoje. Vývoj frontálního kortexu přetrvává i v období adolescence, tedy ještě značnou dobu poté, co je dokončen vývoj hipokampu. To by mohlo poskytnout vysvětlení k výsledkům, ze kterých je patrné, že frontální kortex reagoval změnami expresních profilů na zásah CZP nejméně, zatímco u hipokampu došlo ke změně v expresi téměř u všech genů.

Po podání CZP došlo u obou podjednotek GABA receptorů ke ztrátě rytmické exprese ve frontálním kortexu a hipokampu. U čichových laloků v pozdějším vývojovém stádiu zůstal rytmus exprese těchto podjednotek beze změny. Z mnoha prací je známo, že čichové laloky vykazují jistý stupeň autonomie v rámci cirkadiánního systému, fungují jako autonomní oscilátory, a tedy pokud je narušen rytmus SCN, dokáží si jej samy udržet. Pokud čichové laloky ke své intercelulární synchronizaci využívají také GABAergní systém, tak je pravděpodobně v tomto post-pubertálním věku jejich cirkadiánní systém již vyvinut natolik, že si i po zásahu CZP byly schopny udržet rytmickou expresi těchto podjednotek.

Aplikace CZP během kritické periody ovlivnila ze všech sledovaných genů nejvíce rytmus v expresi genu *Per1*, a to konkrétně v hipokampu a čichových lalocích, a také genu *Bmall*. Rytmus v expresi každého z obou genů, tedy *Per1* a *Bmall*, je přímým ukazatelem funkce molekulárního hodinového mechanismu. Tímto lze odpovědět na stanovené cíle práce, že aplikace CZP v časně postnatální periodě zasahuje v CNS do fungování cirkadiánního systému a ovlivňuje jeho vývoj.

Mělo by se tedy zvážit, zda je podávání benzodiazepinů novorozencům opravdu nezbytné a zda stojí za podstoupení rizika narušení cirkadiánního systému.

## 10 Použitá literatura

Použitá reviews jsou značena \*

Abrahamson, E.E., Moore, R.Y., 2001. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res* 916, 172–191.

Aguilar-Roblero, R., Verduzco-Carbajal, L., Rodríguez, C., Mendez-Franco, J., Morán, J., de la Mora, M.P., 1993. Circadian rhythmicity in the GABAergic system in the suprachiasmatic nuclei of the rat. *Neurosci Lett* 157, 199–202.

Ahring, P.K., Liao, V.W.Y., Gardella, E., Johannesen, K.M., Krey, I., Selmer, K.K., Stadheim, B.F., Davis, H., Peinhardt, C., Koko, M., Coorg, R.K., Syrbe, S., Bertsche, A., Santiago-Sim, T., Diemer, T., Fenger, C.D., Platzer, K., Eichler, E.E., Lerche, H., Lemke, J.R., Chebib, M., Møller, R.S., 2022. Gain-of-function variants in GABRD reveal a novel pathway for neurodevelopmental disorders and epilepsy. *Brain* 145, 1299–1309.

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 Regulation. *Biology of Reproduction* 80, 473–483.

André, M., Boutroy, M.J., Bianchetti, G., Vert, P., Morselli, P.L., 1991. Clonazepam in neonatal seizures: dose regimens and therapeutic efficacy. *Eur J Clin Pharmacol* 40, 193–195.

Arain, M., Haque, M., Johal, L., Mathur, P., Nel, W., Rais, A., Sandhu, R., Sharma, S., 2013. Maturation of the adolescent brain. *Neuropsychiatr Dis Treat* 9, 449–461.

Aton, S.J., Colwell, C.S., Harmar, A.J., Waschek, J., Herzog, E.D., 2005. Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci* 8, 476–483.

Aton, S.J., Huettner, J.E., Straume, M., Herzog, E.D., 2006. GABA and Gi/o differentially control circadian rhythms and synchrony in clock neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 19188–19193.

Bais, B., Molenaar, N.M., Bijma, H.H., Hoogendijk, W.J.G., Mulder, C.L., Luik, A.I., Lambregtse-van den Berg, M.P., Kamperman, A.M., 2020. Prevalence of benzodiazepines and benzodiazepine-related drugs exposure before, during and after pregnancy: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Affective Disorders* 269, 18–27.

\* Barker, J.L., Behar, T., Li, Y.X., Liu, Q.Y., Ma, W., Maric, D., Maric, I., Schaffner, A.E., Serafini, R., Smith, S.V., Somogyi, R., Vautrin, J.Y., Wen, X.L., Xian, H., 1998. GABAergic cells and signals in CNS development. *Perspect Dev Neurobiol* 5, 305–322.

Bellavía, S.L., Carpentieri, A.R., Vaqué, A.M., Macchione, A.F., Vermouth, N.T., 2006. Pup circadian rhythm entrainment--effect of maternal ganglionectomy or pinealectomy. *Physiol Behav* 89, 342–349.

Benke, D., Honer, M., Michel, C., Mohler, H., 1996. GABAA receptor subtypes differentiated by their gamma-subunit variants: prevalence, pharmacology and subunit architecture. *Neuropharmacology* 35, 1413–1423.

Bittman, E.L., Bartness, T.J., Goldman, B.D., DeVries, G.J., 1991. Suprachiasmatic and paraventricular control of photoperiodism in Siberian hamsters. *Am J Physiol* 260, R90-101.

Boda, E., Pini, A., Hoxha, E., Parolisi, R., Tempia, F., 2009. Selection of Reference Genes for Quantitative Real-time RT-PCR Studies in Mouse Brain. *J Mol Neurosci* 37, 238–253.

\* Braat, S., Kooy, R.F., 2015. The GABAA Receptor as a Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders. *Neuron* 86, 1119–1130.

Brooks-Kayal, A.R., Shumate, M.D., Jin, H., Lin, D.D., Rikhter, T.Y., Holloway, K.L., Coulter, D.A., 1999. Human Neuronal  $\gamma$ -Aminobutyric AcidA Receptors: Coordinated Subunit mRNA Expression and Functional Correlates in Individual Dentate Granule Cells. *J Neurosci* 19, 8312–8318.

Brown, M.H., Nunez, A.A., 1989. Vasopressin-deficient rats show a reduced amplitude of the circadian sleep rhythm. *Physiol Behav* 46, 759–762.

Canaple, L., Gréchez-Cassiau, A., Delaunay, F., Dkhissi-Benyahya, O., Samarut, J., 2018. Maternal eating behavior is a major synchronizer of fetal and postnatal peripheral clocks in mice. *Cell Mol Life Sci* 75, 3991–4005.

Cancedda, L., Fiumelli, H., Chen, K., Poo, M., 2007. Excitatory GABA Action Is Essential for Morphological Maturation of Cortical Neurons In Vivo. *J Neurosci* 27, 5224–5235.

Carmona-Alcocer, V., Abel, J.H., Sun, T.C., Petzold, L.R., Doyle, F.J., Simms, C.L., Herzog, E.D., 2018. Ontogeny of Circadian Rhythms and Synchrony in the Suprachiasmatic Nucleus. *J Neurosci* 38, 1326–1334.

Chen, G., Trombley, P.Q., van den Pol, A.N., 1996. Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. *J Physiol* 494, 451–464.

\* Cipolla-Neto, J., Amaral, F.G. do, 2018. Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. *Endocrine Reviews* 39, 990–1028.

\* Corsi, L., Geminiani, E., Baraldi, M., 2008. Peripheral benzodiazepine receptor (PBR) new insight in cell proliferation and cell differentiation review. *Curr Clin Pharmacol* 3, 38–45.

Court, M.H., Duan, S.X., Guillemette, C., Journault, K., Krishnaswamy, S., Von Moltke, L.L., Greenblatt, D.J., 2002. Stereoselective conjugation of oxazepam by human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): S-oxazepam is glucuronidated by UGT2B15, while R-oxazepam is glucuronidated by UGT2B7 and UGT1A9. *Drug Metab Dispos* 30, 1257–1265.

- Crevoisier, C., Delisle, M.C., Joseph, I., Foletti, G., 2003. Comparative single-dose pharmacokinetics of clonazepam following intravenous, intramuscular and oral administration to healthy volunteers. *Eur Neurol* 49, 173–177.
- da Rocha, A.L., Pinto, A.P., Bedo, B.L.S., Morais, G.P., Oliveira, L.C., Carolino, R.O.G., Pauli, J.R., Simabuco, F.M., de Moura, L.P., Ropelle, E.R., Cintra, D.E., Rivas, D.A., da Silva, A.S.R., 2022. Exercise alters the circadian rhythm of REV-ERB- $\alpha$  and downregulates autophagy-related genes in peripheral and central tissues. *Sci Rep* 12, 20006.
- Damiola, F., Minh, N.L., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., Schibler, U., 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes & Development* 14, 2950.
- Davis, F.C., Gorski, R.A., 1988. Development of hamster circadian rhythms: Role of the maternal suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Physiol.* 162, 601–610.
- de la Iglesia, H.O., Meyer, J., Schwartz, W.J., 2003. Lateralization of Circadian Pacemaker Output: Activation of Left- and Right-Sided Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Neurons Involves a Neural Rather Than a Humoral Pathway. *J Neurosci* 23, 7412–7414.
- de Vries, J., Visser, G., Mulder, E., Prechtel, H., 1987. Diurnal and other variations in fetal movement and heart rate patterns at 20-22 weeks. *Early human development* 15.
- Del Rio, J.A., Soriano, E., Ferrer, I., 1992. Development of GABA-immunoreactivity in the neocortex of the mouse. *J Comp Neurol* 326, 501–526.
- DeWoskin, D., Myung, J., Belle, M.D.C., Piggins, H.D., Takumi, T., Forger, D.B., 2015. Distinct roles for GABA across multiple timescales in mammalian circadian timekeeping. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E3911-3919.
- Dibner, C., Schibler, U., Albrecht, U., 2010. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol* 72, 517–549.
- Dietz, S.B., Markopoulos, F., Murthy, V.N., 2011. Postnatal development of dendrodendritic inhibition in the Mammalian olfactory bulb. *Front Cell Neurosci* 5, 10.
- Dolatshad, H., Cary, A.J., Davis, F.C., 2010. Differential Expression of the Circadian Clock in Maternal and Embryonic Tissues of Mice. *PLoS One* 5, e9855.
- Drouet-Coassolo, C., Iliadis, A., Coassolo, P., Antoni, M., Cano, J.P., 1990. Pharmacokinetics of flunitrazepam following single dose oral administration in liver disease patients compared with healthy volunteers. *Fundam Clin Pharmacol* 4, 643–651.
- Evans, J.A., Leise, T.L., Castanon-Cervantes, O., Davidson, A.J., 2013. Dynamic interactions mediated by non-redundant signaling mechanisms couple circadian clock neurons. *Neuron* 80, 10.1016/j.neuron.2013.08.022.

\* Evenseth, L.S.M., Gabrielsen, M., Sylte, I., 2020. The GABAB Receptor—Structure, Ligand Binding and Drug Development. *Molecules* 25, 3093.

Fernandez, F., Lu, D., Ha, P., Costacurta, P., Chavez, R., Heller, H.C., Ruby, N.F., 2014. Dysrhythmia in the suprachiasmatic nucleus inhibits memory processing. *Science* 346, 854–857.

Garzone, P.D., Kroboth, P.D., 1989. Pharmacokinetics of the newer benzodiazepines. *Clin Pharmacokinet* 16, 337–364.

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, 1564–1569.

Goldstein, J.A., 2001. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol* 52, 349–355.

Granados-Fuentes, D., Prolo, L.M., Abraham, U., Herzog, E.D., 2004. The Suprachiasmatic Nucleus Entrain, But Does Not Sustain, Circadian Rhythmicity in the Olfactory Bulb. *The Journal of Neuroscience* 24, 615.

Green, N.H., Jackson, C.R., Iwamoto, H., Tackenberg, M.C., McMahon, D.G., 2015. Photoperiod Programs Dorsal Raphe Serotonergic Neurons and Affective Behaviors. *Curr Biol* 25, 1389–1394.

Greenblatt, D.J., Blaskovich, P.D., Nuwayser, E.S., Harmatz, J.S., Chen, G., Zinny, M.A., 2005. Clonazepam pharmacokinetics: comparison of subcutaneous microsphere injection with multiple-dose oral administration. *J Clin Pharmacol* 45, 1288–1293.

Grigoriadis, S., Graves, L., Peer, M., Mamisashvili, L., Ruthirakuhan, M., Chan, P., Hennawy, M., Parikh, S., Vigod, S.N., Dennis, C.-L., Steiner, M., Brown, C., Cheung, A., Dawson, H., Rector, N., Guenette, M., Richter, M., 2020. Pregnancy and Delivery Outcomes Following Benzodiazepine Exposure: A Systematic Review and Meta-analysis. *Canadian Journal of Psychiatry. Revue Canadienne de Psychiatrie* 65, 821.

Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V., Cermakian, N., 2005. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms* 20, 391–403.

Hardeland, R., Pandi-Perumal, S., 2005. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr Metab (Lond)* 2, 22.

Harmar, A.J., Marston, H.M., Shen, S., Spratt, C., West, K.M., Sheward, W.J., Morrison, C.F., Dorin, J.R., Piggins, H.D., Reubi, J.-C., Kelly, J.S., Maywood, E.S., Hastings, M.H., 2002. The VPAC2 Receptor Is Essential for Circadian Function in the Mouse Suprachiasmatic Nuclei. *Cell* 109, 497–508.

He, Y., Li, Y., Zhou, F., Qi, J., Wu, M., 2020. Decreased circadian fluctuation in cognitive behaviors and synaptic plasticity in APP/PS1 transgenic mice. *Metab Brain Dis* 35, 343–352.

He, Y., Zheng, Z.-H., Zhou, J., Hu, P., Huang, B.-W., Liu, W.-Z., You, W.-J., Pan, H.-Q., Pan, B.-X., Zhang, W.-H., 2019. Gender-dependent regulation of anxiety-like behavior by  $\delta$  subunit-containing GABAA receptor during postnatal development. *Neuroreport* 30, 753–759.

Heller, H.C., Ruby, N.F., 2019. Functional Interactions Between Sleep and Circadian Rhythms in Learning and Learning Disabilities. *Handb Exp Pharmacol* 253, 425–440.

Hennou, S., Khalilov, I., Diabira, D., Ben-Ari, Y., Gozlan, H., 2002. Early sequential formation of functional GABA(A) and glutamatergic synapses on CA1 interneurons of the rat foetal hippocampus. *Eur J Neurosci* 16, 197–208.

\* Hillmer, E.J., Zhang, H., Li, H.S., Watowich, S.S., 2016. STAT3 signaling in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 31, 1–15.

Holter, N.I., Zylla, M.M., Zuber, N., Bruehl, C., Draguhn, A., 2010. Tonic GABAergic control of mouse dentate granule cells during postnatal development. *Eur J Neurosci* 32, 1300–1309.

Houdek, P., Polidarová, L., Nováková, M., Matějů, K., Kubík, Š., Sumová, A., 2015. Melatonin administered during the fetal stage affects circadian clock in the suprachiasmatic nucleus but not in the liver. *Dev Neurobiol* 75, 131–144.

Ikeda, R., Tsuchiya, Y., Koike, N., Umemura, Y., Inokawa, H., Ono, R., Inoue, M., Sasawaki, Y., Grieten, T., Okubo, N., Ikoma, K., Fujiwara, H., Kubo, T., Yagita, K., 2019. REV-ERB $\alpha$  and REV-ERB $\beta$  function as key factors regulating Mammalian Circadian Output. *Sci Rep* 9, 10171.

Isobe, Y., Muramatsu, K., 1995. Day-night differences in the contents of vasoactive intestinal peptide, gastrin-releasing peptide and Arg-vasopressin in the suprachiasmatic nucleus of rat pups during postnatal development. *Neurosci Lett* 188, 45–48.

Jones, J.R., Simon, T., Lones, L., Herzog, E.D., 2018. SCN VIP Neurons Are Essential for Normal Light-Mediated Resetting of the Circadian System. *J Neurosci* 38, 7986–7995.

Kabrita, C.S., Davis, F.C., 2008. Development of the mouse suprachiasmatic nucleus: determination of time of cell origin and spatial arrangements within the nucleus. *Brain Res* 1195, 20–27.

\* Kalsbeek, A., Buijs, R.M., 2002. Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res* 309, 109–118.

\* Kalsbeek, A., Palm, I.F., La Fleur, S.E., Scheer, F. a. J.L., Perreau-Lenz, S., Ruitter, M., Kreier, F., Cailotto, C., Buijs, R.M., 2006. SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J Biol Rhythms* 21, 458–469.

Kalsbeek, A., Strubbe, J.H., 1998. Circadian control of insulin secretion is independent of the temporal distribution of feeding. *Physiology & behavior* 63.

Kalsbeek, A., Teclemariam-Mesbah, R., Pévet, P., 1993. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Comp Neurol* 332, 293–314.

Kasyanov, A.M., Safiulina, V.F., Voronin, L.L., Cherubini, E., 2004. GABA-mediated giant depolarizing potentials as coincidence detectors for enhancing synaptic efficacy in the developing hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 3967–3972.

Klotz, U., Antonin, K.H., Bieck, P.R., 1976. Pharmacokinetics and plasma binding of diazepam in man, dog, rabbit, guinea pig and rat. *J Pharmacol Exp Ther* 199, 67–73.

Kowalska, E., Moriggi, E., Bauer, C., Dibner, C., Brown, S.A., 2010. The Circadian Clock Starts Ticking at a Developmentally Early Stage. *J Biol Rhythms* 25, 442–449.

Kroboth, P.D., McAuley, J.W., Kroboth, F.J., Bertz, R.J., Smith, R.B., 1995. Triazolam pharmacokinetics after intravenous, oral, and sublingual administration. *J Clin Psychopharmacol* 15, 259–262.

Kruisbrink, J., Mirmiran, M., Van der Woude, T.P., Boer, G.J., 1987. Effects of enhanced cerebrospinal fluid levels of vasopressin, vasopressin antagonist or vasoactive intestinal polypeptide on circadian sleep-wake rhythm in the rat. *Brain Res* 419, 76–86.

Kubišťová, A., Spišská, V., Petrželková, L., Hrubcová, L., Moravcová, S., Maierová, L., Bendová, Z., 2020. Constant Light in Critical Postnatal Days Affects Circadian Rhythms in Locomotion and Gene Expression in the Suprachiasmatic Nucleus, Retina, and Pineal Gland Later in Life. *Biomedicines* 8, 579.

Kubová, H., Bendová, Z., Moravcová, S., Pačesová, D., Rocha, L., Mareš, P., 2020. Neonatal Clonazepam Administration Induced Long-Lasting Changes in GABAA and GABAB Receptors. *Int J Mol Sci* 21, 3184.

Kubová, H., Bendová, Z., Moravcová, S., Pačesová, D., Rocha, L.L., Mareš, P., 2018. Neonatal Clonazepam Administration Induces Long-Lasting Changes in Glutamate Receptors. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11.

Kuhlman, S.J., Craig, L.M., Duffy, J.F., 2018. Introduction to Chronobiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10.

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, 193–205.



Ladizesky, M.G., Cutrera, R.A., Boggio, V., Somoza, J., Centrella, J.M., Mautalen, C., Cardinali, D.P., 2001. Effect of melatonin on bone metabolism in ovariectomized rats. *Life Sci* 70, 557–565.

Larsen, P.J., Enquist, L.W., Card, J.P., 1998. Characterization of the multisynaptic neuronal control of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *The European journal of neuroscience* 10.

Laudon, M., Zisapel, N., 1987. Impact of circulating estradiol on melatonin binding sites in discrete areas of the female rat brain. *Brain Res* 402, 146–150.

\* Lavenex, P., Lavenex, P.B., 2013. Building hippocampal circuits to learn and remember: insights into the development of human memory. *Behav Brain Res* 254, 8–21.

Le Fur, G., Perrier, M.L., Vaucher, N., Imbault, F., Flamier, A., Benavides, J., Uzan, A., Renault, C., Dubroeuq, M.C., Guérémy, C., 1983. Peripheral benzodiazepine binding sites: Effect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-n-methyl-n-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide: I. In vitro studies. *Life Sciences* 32, 1839–1847.

Lee, C., Etchegaray, J.P., Cagampang, F.R., Loudon, A.S., Reppert, S.M., 2001. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107, 855–867.

Letinic, K., Zoncu, R., Rakic, P., 2002. Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* 417, 645–649.

Lewy, A.J., Sack, R.L., 1989. The dim light melatonin onset as a marker for circadian phase position. *Chronobiology international* 6.

\* Lim, B., Sproule, B.A., Zahra, Z., Sunderji, N., Kennedy, S.H., Rizvi, S.J., 2020. Understanding the effects of chronic benzodiazepine use in depression: a focus on neuropharmacology. *International Clinical Psychopharmacology* 35, 243.

Liou, S.Y., Albers, H.E., 1989. Single unit response of suprachiasmatic neurons to arginine vasopressin (AVP) is mediated by a V1-like receptor in the hamster. *Brain Res* 477, 336–343.

Liu, C., Reppert, S.M., 2000. GABA Synchronizes Clock Cells within the Suprachiasmatic Circadian Clock. *Neuron* 25, 123–128.

Liu, L., You, Q., Tu, Y., Li, Q., Zheng, L., Li, X., Gu, J., Wang, G., 2015. Midazolam inhibits the apoptosis of astrocytes induced by oxygen glucose deprivation via targeting JAK2-STAT3 signaling pathway. *Cell Physiol Biochem* 35, 126–136.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25, 402–408.

Lomas, E.C., Maskell, P.D., 2015. Phenazepam: More information coming in from the cold. *J Forensic Leg Med* 36, 61–62.

- LoTurco, J.J., Owens, D.F., Heath, M.J., Davis, M.B., Kriegstein, A.R., 1995. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 15, 1287–1298.
- Maldonado-Avilés, J.G., Curley, A.A., Hashimoto, T., Morrow, A.L., Ramsey, A.J., O'Donnell, P., Volk, D.W., Lewis, D.A., 2009. Altered Markers of Tonic Inhibition in the Dorsolateral Prefrontal Cortex of Subjects With Schizophrenia. *Am J Psychiatry* 166, 450–459.
- Malherbe, P., Sigel, E., Baur, R., Persohn, E., Richards, J., Mohler, H., 1990. Functional characteristics and sites of gene expression of the alpha 1, beta 1, gamma 2-isoform of the rat GABAA receptor. *J Neurosci* 10, 2330–2337.
- \* Manchester, K.R., Lomas, E.C., Waters, L., Dempsey, F.C., Maskell, P.D., 2018. The emergence of new psychoactive substance (NPS) benzodiazepines: A review. *Drug Test Anal* 10, 37–53.
- Masson-Pévet, M., George, D., Kalsbeek, A., Saboureau, M., Lakhdar-Ghazal, N., Pévet, P., 1994. An attempt to correlate brain areas containing melatonin-binding sites with rhythmic functions: a study in five hibernator species. *Cell Tissue Res* 278, 97–106.
- Mazuski, C., Chen, S.P., Herzog, E.D., 2020. Different roles for VIP neurons in the neonatal and adult suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 35, 465–475.
- McKernan, R.M., Quirk, K., Prince, R., Cox, P.A., Gillard, N.P., Ragan, C.I., Whiting, P., 1991. GABAA receptor subtypes immunopurified from rat brain with alpha subunit-specific antibodies have unique pharmacological properties. *Neuron* 7, 667–676.
- McNeill, D.S., Sheely, C.J., Ecker, J.L., Badea, Tudor C., Morhardt, D., Guido, W., Hattar, S., 2011. Development of melanopsin-based irradiance detecting circuitry. *Neural Development* 6, 8.
- Mieda, M., Ono, D., Hasegawa, E., Okamoto, H., Honma, K.-I., Honma, S., Sakurai, T., 2015. Cellular clocks in AVP neurons of the SCN are critical for interneuronal coupling regulating circadian behavior rhythm. *Neuron* 85, 1103–1116.
- Mihai, R., Juss, T.S., Ingram, C.D., 1994. Suppression of suprachiasmatic nucleus neurone activity with a vasopressin receptor antagonist: possible role for endogenous vasopressin in circadian activity cycles in vitro. *Neuroscience Letters* 179, 95–99.
- Mikulecká, A., Šubrt, M., Pařízková, M., Mareš, P., Kubová, H., 2014a. Consequences of early postnatal benzodiazepines exposure in rats. II. Social behavior. *Front Behav Neurosci* 8, 169.
- Mikulecká, A., Šubrt, M., Stuchlík, A., Kubová, H., 2014b. Consequences of early postnatal benzodiazepines exposure in rats. I. Cognitive-like behavior. *Front Behav Neurosci* 8, 101.

- Miller, S.C., Pandi, P.S.R., Esquifino, A.I., Cardinali, D.P., Maestroni, G.J.M., 2006. The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer. *Int J Exp Pathol* 87, 81–87.
- Miranda-Contreras, L., Ramírez-Martens, L.M., Benítez-Díaz, P.R., Peña-Contreras, Z.C., Mendoza-Briceño, R.V., Palacios-Prü, E.L., 2000. Levels of amino acid neurotransmitters during mouse olfactory bulb neurogenesis and in histotypic olfactory bulb cultures. *Int J Dev Neurosci* 18, 83–91.
- Mizuno, K., Katoh, M., Okumura, H., Nakagawa, N., Negishi, T., Hashizume, T., Nakajima, M., Yokoi, T., 2009. Metabolic activation of benzodiazepines by CYP3A4. *Drug Metab Dispos* 37, 345–351.
- Moga, M.M., Moore, R.Y., 1997. Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 389, 508–534.
- Moore, R.Y., Bernstein, M.E., 1989. Synaptogenesis in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrated by electron microscopy and synapsin I immunoreactivity. *J Neurosci* 9, 2151–2162.
- Moore, R.Y., Lenn, N.J., 1972. A retinohypothalamic projection in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 146, 1–14.
- Moore, R.Y., Speh, J.C., Patrick Card, J., 1995. The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *Journal of Comparative Neurology* 352, 351–366.
- Moosmann, B., Huppertz, L.M., Hutter, M., Buchwald, A., Ferlaino, S., Auwärter, V., 2013. Detection and identification of the designer benzodiazepine flubromazepam and preliminary data on its metabolism and pharmacokinetics. *J Mass Spectrom* 48, 1150–1159.
- Moravcová, S., Červená, K., Pačesová, D., Bendová, Z., 2016. Identification of STAT3 and STAT5 proteins in the rat suprachiasmatic nucleus and the Day/Night difference in astrocytic STAT3 phosphorylation in response to lipopolysaccharide. *J Neurosci Res* 94, 99–108.
- Moravcová, S., Filipovská, E., Spišská, V., Svobodová, I., Novotný, J., Bendová, Z., 2021. The Circadian Rhythms of STAT3 in the Rat Pineal Gland and Its Involvement in Arylalkylamine-N-Acetyltransferase Regulation. *Life (Basel)* 11, 1105.
- Moravcová, S., Pačesová, D., Melkes, B., Kyclerová, H., Spišská, V., Novotný, J., Bendová, Z., 2018. The day/night difference in the circadian clock's response to acute lipopolysaccharide and the rhythmic Stat3 expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *PLoS One* 13, e0199405.
- Mori, K., Miyazato, M., Ida, T., Murakami, N., Serino, R., Ueta, Y., Kojima, M., Kangawa, K., 2005. Identification of neuromedin S and its possible role in the mammalian circadian oscillator system. *EMBO J* 24, 325–335.

- Munekawa, K., Tamada, Y., Iijima, N., Hayashi, S., Ishihara, A., Inoue, K., Tanaka, 2000. Development of astroglial elements in the suprachiasmatic nucleus of the rat: with special reference to the involvement of the optic nerve. *Experimental neurology* 166.
- Neves, G., Cooke, S.F., Bliss, T.V.P., 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* 9, 65–75.
- Niiijima, A., Nagai, K., Nagai, N., Nakagawa, H., 1992. Light enhances sympathetic and suppresses vagal outflows and lesions including the suprachiasmatic nucleus eliminate these changes in rats. *J Auton Nerv Syst* 40, 155–160.
- Obrietan, K., Van den Pol, A., 1995. GABA neurotransmission in the hypothalamus: developmental reversal from Ca<sup>2+</sup> elevating to depressing. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15.
- Obrietan, K., Van den Pol, A.N., 1998. GABAB receptor-mediated inhibition of GABA<sub>A</sub> receptor calcium elevations in developing hypothalamic neurons. *J Neurophysiol* 79, 1360–1370.
- Obrietan, K., Van den Pol, A.N., 1996. Neuropeptide Y Depresses GABA-Mediated Calcium Transients in Developing Suprachiasmatic Nucleus Neurons: A Novel Form of Calcium Long-Term Depression. *J Neurosci* 16, 3521–3533.
- Ochs, H.R., Otten, H., Greenblatt, D.J., Dengler, H.J., 1982. Diazepam absorption: effects of age, sex, and Billroth gastrectomy. *Dig Dis Sci* 27, 225–230.
- Ono, D., Honma, K., Yanagawa, Y., Yamanaka, A., Honma, S., 2019. GABA in the suprachiasmatic nucleus refines circadian output rhythms in mice. *Commun Biol* 2, 232.
- Osuna-Lopez, F., Reyes-Mendez, M.E., Herrera-Zamora, J.M., Gongora-Alfaro, J.L., Moreno-Galindo, E.G., Alamilla, J., 2021. GABA Neurotransmission of the Suprachiasmatic Nucleus Is Modified During Rat Postnatal Development. *J Biol Rhythms* 36, 567–574.
- Panzanelli, P., López-Bendito, G., Luján, R., Sassoé-Pognetto, M., 2004. Localization and developmental expression of GABA(B) receptors in the rat olfactory bulb. *J Neurocytol* 33, 87–99.
- Pramong, R., Wongchitrat, P., Govitrapong, P., Phansuwan-Pujito, P., 2015. Development of Clock Genes Expression in Rat Hippocampus. *J Med Assoc Thai* 98 Suppl 9, S123-129.
- Preitner, N., Damiola, F., Luis-Lopez-Molina, Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., Schibler, U., 2002. The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB $\alpha$  Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Cell* 110, 251–260.
- Rasmussen, D.D., Boldt, B.M., Wilkinson, C.W., Yellon, S.M., Matsumoto, A.M., 1999. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology* 140, 1009–1012.

Rawashdeh, O., Jilg, A., Jedlicka, P., Slawska, J., Thomas, L., Saade, A., Schwarzacher, S.W., Stehle, J.H., 2014. PERIOD1 coordinates hippocampal rhythms and memory processing with daytime. *Hippocampus* 24, 712–723.

Reiter, R.J., Joshi, B.N., Heinzeller, T., Nürnberger, F., 1986. A single 1- or 5-second light pulse at night inhibits hamster pineal melatonin. *Endocrinology* 118, 1906–1909.

Reiter, R.J., Tan, D.-X., Maldonado, M.D., 2005. Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology. *J Pineal Res* 39, 215–216.

Reppert, S.M., Perlow, M.J., Tamarkin, L., Klein, D.C., 1979. A diurnal melatonin rhythm in primate cerebrospinal fluid. *Endocrinology* 104, 295–301.

Reppert, S.M., Schwartz, W.J., 1984. The suprachiasmatic nuclei of the fetal rat: characterization of a functional circadian clock using <sup>14</sup>C-labeled deoxyglucose. *J Neurosci* 4, 1677–1682.

Rocha, A.K.A. de A., de Lima, E., do Amaral, F.G., Peres, R., Cipolla-Neto, J., Amado, D., 2016. Pilocarpine-induced epilepsy alters the expression and daily variation of the nuclear receptor ROR $\alpha$  in the hippocampus of rats. *Epilepsy Behav* 55, 38–46.

Romijn, H.J., Sluiter, A.A., Pool, C.W., Wortel, J., Buijs, R.M., 1997. Evidence from confocal fluorescence microscopy for a dense, reciprocal innervation between AVP-, somatostatin-, VIP/PHI-, GRP-, and VIP/PHI/GRP-immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 9, 2613–2623.

Scheer, F. a. J.L., Pirovano, C., Van Someren, E.J.W., Buijs, R.M., 2005. Environmental light and suprachiasmatic nucleus interact in the regulation of body temperature. *Neuroscience* 132, 465–477.

Scheer, F.A., van Doornen, L.J., Buijs, R.M., 1999. Light and diurnal cycle affect human heart rate: possible role for the circadian pacemaker. *J Biol Rhythms* 14, 202–212.

Scheer, F.A.J.L., Van Montfrans, G.A., van Someren, E.J.W., Mairuhu, G., Buijs, R.M., 2004. Daily nighttime melatonin reduces blood pressure in male patients with essential hypertension. *Hypertension* 43, 192–197.

\* Semple, B.D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D.M., Noble-Haeusslein, L.J., 2013. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol* 0, 1–16.

Shimada, M., Nakamura, T., 1973. Time of neuron origin in mouse hypothalamic nuclei. *Exp Neurol* 41, 163–173.

\* Sigel, E., Ernst, M., 2018. The Benzodiazepine Binding Sites of GABA<sub>A</sub> Receptors. *Trends Pharmacol Sci* 39, 659–671.

Sjöblom, M., Jedstedt, G., Flemström, G., 2001. Peripheral melatonin mediates neural stimulation of duodenal mucosal bicarbonate secretion. *J Clin Invest* 108, 625–633.

Sládek, M., Jindráková, Z., Bendová, Z., Sumová, A., 2007. Postnatal ontogenesis of the circadian clock within the rat liver. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, R1224-1229.

Sládek, M., Sumová, A., Kováčiková, Z., Bendová, Z., Laurinová, K., Illnerová, H., 2004. Insight into molecular core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6231.

Smith, R.B., Kroboth, P.D., Phillips, J.P., 1986. Temporal variation in triazolam pharmacokinetics and pharmacodynamics after oral administration. *J Clin Pharmacol* 26, 120–124.

Sonne, J., Loft, S., Døssing, M., Vollmer-Larsen, A., Olesen, K.L., Victor, M., Andreasen, F., Andreasen, P.B., 1988. Bioavailability and pharmacokinetics of oxazepam. *Eur J Clin Pharmacol* 35, 385–389.

Stankov, B., Capsoni, S., Lucini, V., Fauteck, J., Gatti, S., Gridelli, B., Biella, G., Cozzi, B., Fraschini, F., 1993. Autoradiographic localization of putative melatonin receptors in the brains of two Old World primates: *Cercopithecus aethiops* and *Papio ursinus*. *Neuroscience* 52, 459–468.

\* Sumova, A., Sladek, M., Polidarova, L., Novakova, M., Houdek, P., 2012. Circadian system from conception till adulthood, in: *Progress in Brain Research*. Elsevier, pp. 83–103.

Sun, X., Whitefield, S., Rusak, B., Semba, K., 2001. Electrophysiological analysis of suprachiasmatic nucleus projections to the ventrolateral preoptic area in the rat. *Eur J Neurosci* 14, 1257–1274.

Sylvester, C.M., Krout, K.E., Loewy, A.D., 2002. Suprachiasmatic nucleus projection to the medial prefrontal cortex: a viral transneuronal tracing study. *Neuroscience* 114, 1071–1080.

Tam, S.K.E., Hasan, S., Choi, H.M.C., Brown, L.A., Jagannath, A., Hughes, S., Hankins, M.W., Foster, R.G., Vyazovskiy, V.V., Bannerman, D.M., Peirson, S.N., 2017. Constant Light Desynchronizes Olfactory versus Object and Visuospatial Recognition Memory Performance. *The Journal of Neuroscience* 37, 3555.

Taub, A., Carbajal, Y., Rimu, K., Holt, R., Yao, Y., Hernandez, A.L., LeSauter, J., Silver, R., 2021. Arginine Vasopressin-Containing Neurons of the Suprachiasmatic Nucleus Project to CSF. *eNeuro* 8, ENEURO.0363-20.2021.

\* Tordjman, S., Chokron, S., Delorme, R., Charrier, A., Bellissant, E., Jaafari, N., Fougere, C., 2017. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Curr Neuropharmacol* 15, 434–443.

Tosini, G., Menaker, M., 1996. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science (New York, N.Y.)* 272.

- \* Vadnie, C.A., McClung, C.A., 2017. Circadian Rhythm Disturbances in Mood Disorders: Insights into the Role of the Suprachiasmatic Nucleus. *Neural Plast* 2017, 1504507.
- VanDunk, C., Hunter, L.A., Gray, P.A., 2011. Development, Maturation, and Necessity of Transcription Factors in the Mouse Suprachiasmatic Nucleus. *J Neurosci* 31, 6457–6467.
- Vogelbaum, M., Menaker, M., 1992. Temporal chimeras produced by hypothalamic transplants. *J Neurosci* 12, 3619–3627.
- Wang, L., Edge, J.H., Ono, J., Walson, P.D., 1992. Pharmacokinetics of clonazepam in developing rats. *Chin Med J (Engl)* 105, 726–731.
- \* Wang, X., Zhang, T., Ekheden, I., Chang, Z., Hellner, C., Jan Hasselström, Jayaram-Lindström, N., M D’Onofrio, B., Larsson, H., Mataix-Cols, D., Sidorchuk, A., 2022. Prenatal exposure to benzodiazepines and Z-drugs in humans and risk of adverse neurodevelopmental outcomes in offspring: A systematic review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 137, 104647.
- Wang, Y.F., Gao, X.B., van den Pol, A.N., 2001. Membrane properties underlying patterns of GABA-dependent action potentials in developing mouse hypothalamic neurons. *J Neurophysiol* 86, 1252–1265.
- Weaver, D., Rivkees, S., Reppert, S., 1989. Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. *J Neurosci* 9, 2581–2590.
- Wongchitrat, P., Govitrapong, P., Phansuwan-Pujito, P., 2012. The expression of Per1 and Aa-nat genes in the pineal gland of postnatal rats. *J Med Assoc Thai* 95 Suppl 12, S69-75.
- Xu, G., Broadbelt, K.G., Haynes, R.L., Folkerth, R.D., Borenstein, N.S., Belliveau, R.A., Trachtenberg, F.L., Volpe, J.J., Kinney, H.C., 2011. Late Development of the GABAergic System in the Human Cerebral Cortex and White Matter. *J Neuropathol Exp Neurol* 70, 841–858.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3846–3851.
- Yamaguchi, S., Mitsui, S., Yan, L., Yagita, K., Miyake, S., Okamura, H., 2000. Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol Cell Biol* 20, 4773–4781.
- Yamaguchi, Y., Suzuki, T., Mizoro, Y., Kori, H., Okada, K., Chen, Y., Fustin, J.-M., Yamazaki, F., Mizuguchi, N., Zhang, J., Dong, X., Tsujimoto, G., Okuno, Y., Doi, M., Okamura, H., 2013. Mice genetically deficient in vasopressin V1a and V1b receptors are resistant to jet lag. *Science* 342, 85–90.

- Yoshikawa, T., Nakajima, Y., Yamada, Y., Enoki, R., Watanabe, K., Yamazaki, M., Sakimura, K., Honma, S., Honma, K., 2015. Spatiotemporal profiles of arginine vasopressin transcription in cultured suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 42, 2678–2689.
- Yoshitane, H., Asano, Y., Sagami, A., Sakai, S., Suzuki, Y., Okamura, H., Iwasaki, W., Ozaki, H., Fukada, Y., 2019. Functional D-box sequences reset the circadian clock and drive mRNA rhythms. *Commun Biol* 2, 300.
- Yukawa, E., Satou, M., Nonaka, T., Yukawa, M., Ohdo, S., Higuchi, S., Kuroda, T., Goto, Y., 2001. Influence of age and comedication on steady-state clonazepam serum level-dose ratios in Japanese epileptic patients. *J Clin Pharm Ther* 26, 375–379.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 16219–16224.
- Zhou, Y., Zhang, H., Liu, F., Lei, G., Liu, P., Jiao, T., Dang, Y., 2018. Altered Light Conditions Contribute to Abnormalities in Emotion and Cognition Through HINT1 Dysfunction in C57BL/6 Mice. *Front Behav Neurosci* 12, 110.
- Zucker, I., Boshes, M., Dark, J., 1983. Suprachiasmatic nuclei influence circannual and circadian rhythms of ground squirrels. *The American journal of physiology* 244.