

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

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Kristýna Kačínová**

Vliv prenatální expozice alkoholu na vývoj mozku a spánkové a cirkadiánní cykly  
The impact of prenatal alcohol exposure on brain development and sleep and circadian cycles

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel:

prof. PharmDr. Alena Sumová, DSc.

Praha, 2025

**Prohlášení:**

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

V Praze, 17.4.2025

Kristýna Kačínová

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala své školitelce prof. PharmDr. Aleně Sumové, DSc za vedení mé práce, cenné rady a připomínky. Také děkuji své rodině a blízkým za podporu a poskytnutí kvalitního zázemí při psaní této práce.

## **Abstrakt:**

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem prenatální expozice alkoholu na vývoj spánku a cirkadiánních rytmů. V první části jsou představeny základní mechanismy regulace spánku, cirkadiánních rytmů a REM a non-REM stavů v postnatálním i prenatálním období. Dále jsou shrnuty metody sledování spánku a rytmicity u plodu. Hlavní část práce se zaměřuje na analýzu odborné literatury týkající se neurobiologických účinků alkoholu na vyvíjející se nervový systém a mozek. Pozornost je věnována hlavně narušení spánkové architektury, potlačení REM spánku a změnám v oblasti cirkadiánních oscilátorů. Práce dále rozebírá důsledky těchto změn na molekulární, buněčné a behaviorální úrovni, včetně možného vlivu na vývoj poruch spánku, kognitivních funkcí a emoční regulace v postnatálním období. Práce prezentuje, že většina experimentálních i klinických studií dochází k závěru, že prenatální expozice alkoholu může výrazně narušit přirozený vývoj spánkových a časových struktur mozku, přičemž tyto zásahy mohou mít dlouhodobé důsledky pro zdraví a chování jedince.

**Klíčová slova:** REM spánek, prenatální vývoj, mozek, alkohol, cirkadiánní rytmy

## **Abstract:**

This bachelor's thesis explores the impact of prenatal alcohol exposure on the development of sleep and circadian rhythms. The theoretical section introduces key mechanisms involved in the regulation of sleep, including the development of REM and non-REM phases during the prenatal period, and describes the circadian system with a focus on the suprachiasmatic nuclei. It also summarizes current methods used to monitor sleep and rhythmicity in the fetus. The core of the thesis consists of a literature-based analysis of the neurobiological effects of alcohol on the developing nervous system. Special attention is given to the disruption of sleep architecture, suppression of REM sleep, and alterations in circadian oscillators. Furthermore, the work discusses the consequences of these disruptions at the molecular, cellular, and behavioral levels, including their potential contribution to postnatal sleep disorders, cognitive impairments, and emotional dysregulation. Based on the reviewed evidence, the study concludes that prenatal alcohol exposure can significantly interfere with the natural development of neural sleep and timing systems, with potential long-term consequences for the individual's health and behavior.

**Key words:** REM sleep, prenatal development, brain, alcohol, circadian rhythms

## Seznam zkratek:

ACTH	Adrenokortikotropní hormon
AS	Aktivní spánek (Active Sleep)
AVP	Arginin vasopresin
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor (mozkový neurotrofní růstový faktor)
BMAL1	Brain and muscle ARNT-like protein-1
CLOCK	Circadian locomotor output cycles kaput
CNS	Centrální nervová soustava
CRY	Cryptochrome (gen CRY1, CRY2)
CTG	Kardiotokografie
EEG	Elektroencefalografie
FASD	Fetální alkoholové spektrum poruch
fMEG	Fetální magnetoencefalografie
GABA	Kyselina $\gamma$ -aminomáselná (inhibiční neurotransmiter)
GHT	Genikulohypotalamický trakt
GRP	Gastrin releasing peptide (peptid uvolňující gastrin)
IGL	Intergenikulární listek thalamu
IL	Interleukin (např. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10)
ipRGCs	Intrinsically photosensitive Retinal Ganglion Cells
IS	Neurčitý spánek (Indeterminate Sleep)
LC	Locus coeruleus
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase (mitogenem aktivované proteinkinázy)

NF- $\kappa$ B	Nukleární faktor kappa B
NK buňky	Natural killer buňky
NMDA	N-methyl-D-aspartát (typ glutamátového receptoru)
NPC	Neuronální progenitorové buňky
NREM	Non-Rapid Eye Movement (fáze spánku bez rychlých pohybů očí)
PER	Period (gen PER1, PER2, PER3)
QS	Klidový spánek (Quiet Sleep)
REM	Rapid Eye Movement (fáze spánku s rychlými pohyby očí)
RHT	Retinohypotalamický trakt
S100B	Trofický faktor S100 beta
SCN	Suprachiasmatická jádra
TNF- $\alpha$	Tumor nekrotizující faktor alfa
TLR4	Toll-like receptor 4
TTFL	Transkripčně-translační zpětnovazebná smyčka
USG	Ultrasonografie
VIP	Vasoaktivní intestinální peptid

# Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. SPÁNEK A JEHO FYZIOLOGIE</b> .....	<b>2</b>
2.2. NREM SPÁNEK .....	2
2.2.1. Stádium N1 .....	2
2.2.2 Stádium N2 .....	3
2.2.3 Stádium N3 .....	3
2.3 REM SPÁNEK .....	3
2.3.1 Pgo vlny .....	4
2.3.2 Neuronální regenerace během REM spánku .....	5
<b>3. CIRKADIÁNNÍ RYTMY</b> .....	<b>5</b>
3.1 SUPRACHIASMATICKÁ JÁDRA .....	5
3.2 ZPĚTNOVAZEBNÉ SMYČKY .....	6
3.3 SEŘÍZENÍ SCN S PROSTŘEDÍM .....	7
3.4 PERIFENÍ HODINY .....	7
<b>4. PRENATÁLNÍ VÝVOJ SPÁNKOVÝCH RYTMŮ</b> .....	<b>8</b>
4.1 METODY POZOROVÁNÍ PLODU .....	8
4.2 DRUHY SPÁNKU V PRENATÁLNÍM OBDOBÍ .....	8
4.2.1 Aktivní spánek .....	9
4.2.2 Klidový spánek .....	9
4.2.3 Neurčitý spánek .....	9
4.3 POSTUPNÝ VÝVOJ SPÁNKOVÝCH CYKLŮ .....	9
<b>5. PRENATÁLNÍ VÝVOJ CIRKADIÁNNÍCH RYTMŮ</b> .....	<b>10</b>
5.1 VÝVOJ SCN .....	10
5.2 VÝVOJ EXPRESE HODINOVÝCH GENŮ .....	10
5.3 SEŘÍZENÍ CYKLŮ MATKOU .....	11
5.4 NARUŠENÍ SEŘÍZENÍ FETÁLNÍCH HODIN MATKOU .....	11
<b>6. PRENATÁLNÍ VYSTAVENÍ ALKOHOLU A FASD</b> .....	<b>12</b>
6.1 PORUCHY SPÁNKU A SPÁNKOVÉ ARCHITEKTURY ZPŮSOBENÉ ALKOHOLEM .....	12
6.1.1 Neurozánětlivá reakce indukovaná alkoholem a role REM spánku .....	13
6.1.2 Narušení homeostatické regulace spánku .....	14
6.2 VLIV ALKOHOLOVÉ EXPOZICE NA VYVÍJEJÍCÍ SE CIRKADIÁNNÍ RYTMY .....	15
6.2.1 Narušení behaviorálních funkcí .....	15
6.2.2 Narušení rytmů na molekulární úrovni .....	15
6.2.3 Epigenetické změny .....	16
6.3 VLIV PRENATÁLNÍ EXPOZICE ALKOHOLU NA VÝVOJ MOZKU .....	16
6.3.1 Apoptóza a neurodegenerace vyvolaná alkoholem .....	16
6.3.2 Neurogeneze a vývoj struktur středové linie .....	17
6.3.3 Alkoholový zásah do synaptogeneze .....	18
6.3.4 Nezralé a dysfunkční neuronální okruhy .....	19
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	<b>20</b>
<b>8. LITERATURA:</b> .....	<b>21</b>

# 1. Úvod

Spánek a cirkadiánní rytmy tvoří jeden z nejdůležitějších bodů fyziologického fungování organismu. Nezprostředkovávají pouze pasivní stav odpočinku, ale jsou to aktivní, rytmicky uspořádané procesy, které sehrávají zásadní roli v regulaci metabolismu, imunitních funkcí, a velice důležitou pozici mají ve vývoji centrální nervové soustavy. Již v průběhu prenatalního období probíhá v mozku řada přesně načasovaných událostí, které ovlivňují následnou postnatální funkčnost. Právě střídání spánkových stavů, stejně jako nastavování vnitřních biologických hodin, slouží jako nástroje, které pomáhají mozku správně zformovat a zorganizovat.

Prenatální vývoj je však mimořádně citlivý na působení vnějších vlivů. Jedním z nejběžnějších v lidské populaci je alkohol, jehož přítomnost v těle těhotné ženy může narušit různé důležité fáze zrání spánkových i cirkadiánních rytmů a následně i mozku. Fetální alkoholový syndrom zahrnuje širokou a detailně popsanou škálu potíží – od strukturálních a morfologických abnormalit až po poruchy chování, učení nebo emocí. Narušení spánkové architektury a rozladění biologických rytmů zůstává v odborné literatuře často upozaděno. Přitom právě poruchy spánku a cirkadiánní rytmicity mohou ještě prohlubovat nebo přímo způsobovat další problémy pozorované u dětí s FASD.

Cílem této práce je analyzovat, jak se během prenatalního období vyvíjejí spánkové a cirkadiánní rytmy, a následně poukázat na to, jak alkohol tento vývoj ovlivňuje. Práce se zaměřuje na fyziologické a neuroanatomické základy spánku a rytmické regulace, mechanismy, kterými alkohol působí na nervový a spánkový systém v různých vývojových fázích a důsledky těchto zásahů pro následné fungování kognitivních a behaviorálních vzorců v postnatálním životě. Důraz je kladen na spojení mezi molekulárními a systémovými klinickými daty, je poukázáno na to, jak narušení na mikroskopické úrovni může ovlivňovat chování a funkci jedince.

Vize této práce je propojení poznatků z neurovědy, chronobiologie a vývojové biologie k ucelnějšímu pohledu na to, jak důsledky této škodlivé expozice vznikají a proč mohou být tak závažná.

## 2. Spánek a jeho fyziologie

Spánek je přirozeně se opakující stav odpočinku charakterizovaný sníženým stavem vědomí a smyslového vnímání. Dochází během něj ke změnám v mozkové aktivitě a metabolismu. Na rozdíl od bezvědomí nebo kómatu je spánek reverzibilní, což znamená, že mozek může reagovat na vnější podněty a v případě potřeby přejít zpět do stavu bdělosti. Celý proces je výsledkem působení dvou navzájem se doplňujících regulačních systémů – homeostatického a cirkadiálního. Homeostatický mechanismus vyjadřuje nárůst potřeby spánku v závislosti na délce předchozího bdění: čím déle je organismus vzhůru, tím silnější je tlak k nástupu spánku. Cirkadiální složka naopak ovlivňuje načasování spánku během dne a noci na základě vnitřních biologických rytmů, které jsou řízeny suprachiasmatickými jádry v hypotalamu (SCN) – strukturou fungující jako centrální biologické hodiny (Borbély, 1982). Spánek probíhá ve dvou fázích, které se během spánku několikrát střídají – tzv. fáze NREM (z angl. non-rapid eye movement, přeloženo bez rychlých pohybů očí) a fáze REM (z angl. rapid-eye movement, přeloženo z angl. jako s rychlými pohyby očí) (Aserinsky & Kleitman, 1953). Spánku je zahájen fází NREM a po ní nastupuje fáze REM, kdy NREM zabírá přibližně 75% doby spánku a REM asi 25 %. (Dement & Kleitman, 1957).

### 2.2. NREM spánek

NREM fáze je klíčová složka spánku, charakterizovaná postupným přechodem z bdělého stavu s vysokofrekvenčním nízkovoltážním EEG (elektroencefalografie – metoda zaznamenávající mozkové elektrické potenciály, pomocí elektrod připevněných na hlavě) do stavu s pomalejšími vlnami a vyšší amplitudou. Mozková aktivita se synchronizuje, dochází k postupnému posunu EEG aktivity směrem k nižším frekvencím, až k dominanci pomalých delta vln s frekvencí 0,5–4 Hz. (Dement & Kleitman, 1957). NREM se podle manuálu pro hodnocení spánku a přidružených jevů vydaného Americkou akademií spánkové medicíny v roce 2007 dělí na tři stádia podle EEG vln a to N1, N2 a N3.

#### 2.2.1. Stádium N1

Stádium N1 trvá průměrně 1-7 minut a představuje přechod z bdělého stavu do první lehké fáze spánku. Lze jej snadno narušit a pozastavit různými zvuky nebo doteky okolí. V tomto stádiu se na EEG vyskytují alfa vlny charakteristické pro klidový bdělý stav, které postupně přecházejí v nízkonapěťové vlny s různou frekvencí, objevují se i theta vlny s frekvencí 4-8Hz (Carskadon & Dement, 2005). Stádium N1 je také spojováno s tzv. hypnagogickými záškuby, projevujícími se jako krátké mimovolní svalové kontrakce, které jedinec často spojuje s pocitem pádu. Tyto

záškuby jsou důsledkem dočasné neuronální desynchronizace při nástupu spánku (Chokroverty & Gupta, 2010).

### **2.2.2 Stádium N2**

Během stádia N2, které zabírá asi 45-55% jednoho spánkového cyklu, se spánek prohlubuje a probuzení v této fázi vyžaduje silnější stimul. Jsou zde charakteristické dva EEG fenomény – Spánková vřetena a K-komplexy. Spánková vřetena jsou krátké záblesky s vysokou frekvencí (12-14Hz), které jsou generovány retikulární částí thalamu (Hess et al., 1953) a mají význam pro synaptickou plasticitu a konsolidaci paměti (Gais et al., 2002). K-komplexy se na EEG objevují jako bifázické vlny s negativní a následně pozitivní složkou. Představují reakci mozku na okolní stimuly, přičemž reflektují neuronální procesy, které se podílejí na potlačení nepodstatných podnětů z okolí a zachování spánku (Loomis et al., 1938; Roth et al., 1956).

### **2.2.3 Stádium N3**

Stádium N3, někdy označované jako slow-wave sleep (spánek pomalých vln), je nejhlubší fází spánku. Zabírá asi 20-25 % spánkového cyklu, přičemž nejdelší úseky se vyskytují v první třetině noci a jak spánek postupuje, délka této fáze se zkracuje. Charakterizuje se přítomností delta vln (0,5-4 Hz), které se spojují s obnovou energie a paměťovou konsolidací (Carskadon & Dement, 2005).

NREM spánek je aktivně regulován mozkovými strukturami, zejména ventrolaterálním preoptickým jádrem (VLPO) a mediálním preoptickým jádrem (MnPO), které inhibují centra bdělosti prostřednictvím uvolňování GABA (kyselina  $\gamma$ -aminomáselná) a galaninu (Sherin et al., 1996; Suntsova et al., 2002). Homeostatickou regulaci NREM spánku dále podporuje akumulace adenosinu během bdění, což vede k jeho následnému poklesu během hlubokého spánku, čímž se moduluje rovnováha mezi spánkovými a bdelostnými stavy (Porkka-Heiskanen et al., 1997).

## **2.3 REM spánek**

V roce 1953 byl poprvé překonán pohled na spánek jako pasivní stav objevem dvou fází spánku – REM a již zmíněného non-REM. U spících dětí byly vypořizovány pravidelné fáze rychlých pohybů očí, navíc byl tento stav doprovázen velmi intenzivní mozkovou aktivitou, která se projevila nízkovoltážním desynchronizovaným EEG a svalovou atonií (Aserinsky & Kleitman, 1953). Tato REM fáze se během noci střídá s klidnou non-REM fází v cyklech dlouhých průměrně 90 minut a délka REM fáze se v průběhu spánku prodlužuje. Jedinci, kteří byli během

této fáze spánku probuzení si byli schopni živě vybavit své sny, což naznačuje spojitost této spánkové fáze se sněním (Dement & Kleitman, 1957). Kromě vysoké mozkové aktivity je REM spánek doprovázen mnoha dalšími fyziologickými a behaviorálními projevy, například termoregulace u většiny živočichů dočasně ustává a tělesná teplota se posouvá k teplotě prostředí (Parmeggiani, 2003), zorničky se zužují, což odráží parasymptickou převahu v ovládní duhovky (Villablanca, 1966) a dochází ke svalové atonii. (Aserinsky & Kleitman, 1953)

Přesný biologický význam REM spánku stále není objasněn, ale pozorování, že většina novorozenců savců tráví významnou část svého raného života ve spánkovém stavu REM (u novorozenců a plodů se nemluví o REM spánku, protože jejich mozkové vlny ještě nevykazují REM standart, ale objevují se u nich záškuby těla, pohyby očí atd), inspirovalo hypotézu, že REM spánek je důležitý pro vývoj mozku. Tento koncept je podporován skutečností, že altriciální savci, kteří mají po narození relativně nezralé a nedostatečně rozvinuté mozky, tráví v REM spánku výrazně delší dobu než prekociální zvířata, která se rodí neurálně více vyvinutá (Roffwarg et al., 1966).

Vysoký podíl REM spánku brzy po narození se považuje za nezbytný pro zajištění dostatečné neurální aktivity, která podporuje správnou organizaci a zrání mozkových struktur. Tato intenzivní mozková aktivita se objevuje zejména v podobě vln, které vznikají ve Varolově mostu, později se objevují v laterálním genikulárním jádru a s dalším zpožděním je lze pozorovat v okcipitální (týlní) kůře, což vedlo k názvu ponto-geniculo-occipital spikes (PGO) (Brooks & Bizzi, 1963).

### **2.3.1 Pgo vlny**

PGO vlny představují fázické elektrické výboje vysoké amplitudy, které se objevují těsně před nástupem REM spánku a podílejí se na formování synaptických spojení a reorganizaci smyslových drah během vývoje CNS. Po zahájení REM spánku přicházejí v sériích tří až deseti vln, které obvykle korelují s rychlými pohyby očí (Morrison & Bowker, 1975). U druhů s opožděným neuronálním vývojem jsou PGO vlny během aktivního spánku (obdoba REM spánku v prenatálním období) zvláště klíčové, protože nahrazují a doplňují exogenní podněty, které nejsou v prenatálním období dostatečně intenzivní (Roffwarg et al., 1966). Experimentální studie ukázaly, že potlačení aktivního spánku nebo tvorby PGO vln u takto poškozených jedinců vede ke značným změnám v architektuře neuronálních okruhů, a to zejména v oblasti zrakového systému (Morrison & Bowker, 1975).

### **2.3.2 Neuronální regenerace během REM spánku**

REM spánek se významně podílí na optimalizaci neuronálních spojů, jak v prenatalním období, tak i během celého postnatálního života. Zejména zásadní mechanismus je regulace noradrenergického systému. Během této fáze dochází k úplnému potlačení aktivity locus coeruleus (LC), což je nezbytné pro synaptickou reorganizaci (Jouvet, 1965). LC je malá, ale podstatná struktura v mozku kmeni, která během bdělosti a také částečně během non-REM spánku uvolňuje noradrenalin, hormon napomáhající udržet pozornost, regulovat stresovou odpověď a bdělost. Nicméně během REM spánku aktivita LC zcela ustává (Aston-Jones & Bloom, 1981), a to napomáhá restrukturalizaci neuronálních okruhů, odstraňování nadbytečných synapsí, a naopak posilování těch funkčních (Poe, 2017). Tato funkce je významná právě v prenatalním období, kdy je vývoj mozku nejintenzivnější a dochází k důležité neuronální organizaci.

Podobně jako noradrenalin je během REM spánku potlačena i hladina serotoninu regulujícího emoční stabilitu a kognitivní funkce (McGinty et al., 1973). Při deprivaci REM spánku, a tedy narušení serotonergní regulace, bylo u experimentálních zvířat detekovatelné zhoršení adaptační schopnosti a emoční labilita (Shaffery et al., 1999). Acetylcholin, který podporuje synaptické změny a neuronální excitabilitu, je neurotransmitter, jehož aktivita je během REM fáze naopak výrazně zvýšena. Cholinergní aktivita během REM spánku přispívá k nízkovoltážní desynchronizaci EEG záznamu, jelikož hraje zásadní roli v aktivaci kortikálních oblastí. Tato mozková aktivita posiluje neuronální spojení, reorganizaci mozkových drah a paměťovou konsolidaci (el Mansari et al., 1989).

## **3. Cirkadiální rytmy**

Cirkadiální rytmy jsou výsledkem funkce vnitřního časového systému, který prostřednictvím koordinované aktivity centrálních i periferních oscilátorů zajišťuje sladění biologických procesů s periodickými změnami prostředí. Tato endogenní časová regulace umožňuje organismu předvídat cyklické vnější podněty, především střídání dne a noci a přizpůsobit jim základní fyziologické funkce, včetně spánku, metabolické aktivity a hormonální sekrece.

### **3.1 Suprachiasmatická jádra**

Cirkadiální rytmy jsou primárně řízeny centrálními hodinami uloženými v suprachiasmatických jádrech (SCN) lokalizovaných na bázi hypotalamu (Moore & Eichler, 1972). SCN je rozděleno na dvě podjednotky, které se liší funkcí i anatomii – ventrolaterální

jádro a dorsomediální obal (Van den Pol, 1980). Světelné signály z retiny jsou do SCN přenášeny prostřednictvím retinohypotalamického traktu (RHT), který zprostředkovává aktivaci ventrolaterálního jádra. Tato oblast následně produkuje vasoaktivní intestinální peptid (VIP), kyselinu gama-aminomáselnou (GABA) a gastrin uvolňující peptid (GRP), jak uvádějí Aton et al. (2005, 2006) Naopak dorsomediální oblast SCN, složená převážně z neuronů exprimujících arginin vasopresin (AVP) a kalretinin, hraje klíčovou roli při udržování endogenních rytmických oscilací (Moore et al., 2002).

Jednotlivé neurony v SCN jsou samostatné oscilátory vytvářející rytmický signál s přibližně 24hodinovou periodou (Welsh et al., 1995), přičemž každý neuron vykazuje nezávislou oscilaci, která je synchronizována neurotransmitery jako jsou VIP (Aton et al., 2005) a GABA (Moore & Speh, 1993). Tato synchronizace umožňuje vytvoření stabilního výstupního signálu, jenž je přenášen do dalších mozkových center a periferních částí těla (Yoo et al., 2004). Oscilace v SCN jsou řízeny autoregulační transkripčně-translační zpětnovazebnou smyčkou (TTFL z angličtiny transcription-translation feedback loop) (Hardin et al., 1990; Shearman et al., 2000). SCN funguje jako centrální synchronizátor, který udržuje koordinaci periferních oscilátorů a bez něhož může docházet k narušení různých fyziologických procesů (Akhtar et al., 2002).

### 3.2 Zpětnovazebné smyčky

Mechanismus zpětnovazebných smyček mezi hodinovými geny a jejich proteinovými produkty (TTFL z angl. Transcription-translation feedback loop) generuje oscilace s periodou kolem 24 hodin a díky němu jsou fyziologické funkce v těle stabilně časově regulovány. TTFL regulují expresi hlavních hodinových genů, mezi které patří *Brain and muscle Arnt-like proteiny (Bmal1)*, *Circadian locomotor output cycles kaput (Clock)*, *Period (Per 1-3)*, *Cryptochrome (Cry 1-2)*, *Casein kináza 1 epsilon (CK1  $\epsilon$ )* a *Retionic acid-related orphan receptor (Rev-erba)* a *(Ror ab)* (Bae et al., 2001; Bunger et al., 2000; van der Horst et al., 1999; Vitaterna et al., 1994). Hlavním aktivátorem TTFL je heterodimer CLOCK:BMAL1, který funguje jako pozitivní regulátor transkripce, váže se na E-box sekvence na promotorech genů, jako jsou *Per* a *Cry*, a tím spouští jejich transkripci (Gekakis et al., 1998; Shearman et al., 2000). Po transkripci a translaci genů jsou produkovány proteiny PER a CRY tvořící v cytoplazmě heterodimer, který je poté fosforylován kinázou CK1 $\epsilon/\delta$  (Eide et al., 2002). Takto fosforylované PER a CRY jsou translokovány do jádra, tam inhibují komplex CLOCK:BMAL1, což vede k potlačení transkripce vlastních genů *Per* a *Cry*, a tím je

uzavřena zpětnovazebná smyčka (Kume et al., 1999). Zároveň je exprese genu *Bmal1* řízena transkripčními faktory  $ROR\alpha$  a  $REV-ERB\alpha$ , které navzájem kompetují o vazebné místo na promotoru tohoto genu.  $ROR\alpha$  aktivuje transkripci, zatímco  $REV-ERB\alpha$  ji inhibuje. (Guillaumond et al., 2005; Preitner et al., 2002). To zajišťuje rytmickou dostupnost *BMAL1* pro tvorbu heterodimeru *CLOCK:BMAL1* a tím udržení cykličnosti.

### **3.3 Seřízení SCN s prostředím**

Seřízení suprachiasmatických jader s okolím je výrazně ovlivněno vnějším prostředím, hlavně střídáním světla a tmy, což je detekováno retinou (Besharse & Iuvone, 1983). Světlo je nejdůležitějším zeitgeberem (synchronizátorem), který nastavuje cirkadiánní rytmy do souladu s okolním prostředím. Světelný signál je zachycován v retině oka pomocí retinálních fotoreceptorů – světločivných gangliových buněk ipRGCs (intrinsically photosensitive retinal ganglion cells) (Provencio et al., 2000). V těchto buňkách je tvořen fotonopigment melanopsin, ten absorbuje fotony a díky tomu se dá světelná informace zachovat i při absenci tyčinek a čípků (Hattar et al., 2002). Retinohypotalamický trakt (RHT) poté přenáší informace do ventrolaterální části SCN (Hannibal, 2002). Druhou cestou, která se podílí na synchronizaci je genikulohypotalamický trakt (GHT), který podněty o světle přináší do SCN přes intergenikulární lístek thalamu (IGL) a moduluje odpověď na světlo (Hannibal et al., 1998).

### **3.4 Periferní hodiny**

Autonomní oscilátory se kromě SCN vyskytují i v dalších částech těla. Jsou lokalizované buď v jednotlivých orgánech a tkáních nebo v mozku mimo SCN (Abe et al., 2002; Yamazaki et al., 2000). Tyto oscilátory jsou schopné tvořit autonomně rytmické signály, ale musí být mezi sebou synchronizovány pomocí signálů z SCN různými neuronálními a humorálními drahami, nebo dalšími podněty z okolí jedince - zeitgebers (Balsalobre et al., 1998; Yamamoto et al., 2004). Pokud dojde k odstranění SCN, periferní oscilátory postupně ztrácí rytmickou genovou expresi, což dokazuje, že signály ze SCN udržují periferní hodiny synchronizované. (Akhtar et al., 2002). Vnější podněty, které za běžných okolností fungují jako zeitgebers, mohou při nepravidelném působení – například při chaotickém střídání světla a tmy v kombinaci s nevhodně načasovaným příjmem potravy – vést k desynchronizaci cirkadiánních hodin a následně k různým zdravotním komplikacím, včetně poruch metabolismu, spánku či dalších onemocnění (Laposky et al., 2008).

## **4. Prenatální vývoj spánkových rytmů**

### **4.1 Metody pozorování plodu**

Plod tráví značnou část prenatálního života ve spánku, který je zásadní pro jeho neurální vývoj. Spánkové vzorce se utvářejí postupně, přičemž první známky střídání aktivity a klidu lze zaznamenat přibližně od 20. týdne těhotenství (Nijhuis et al., 1982). Monitorování spánkových a behaviorálních stavů plodu v děloze matky však může být u některých metod komplikované, proto jsou podrobnější polysomnografické studie prováděny především u předčasně narozených dětí, které poskytují cenné informace o vývoji a postupné maturaci spánkových stavů. Je však nutno zdůraznit, že vývoj spánkových stavů u nedonošených dětí nemusí plně odpovídat intrauterinní maturaci kvůli odlišným podmínkám prostředí (např. expozici prostředí nemocnice, umělému světlu, absenci intrauterinní stimulace atd.). Nicméně výzkumy naznačují, že organizace spánkových stavů u předčasně narozených dětí v odpovídajícím gestačním věku vykazuje značnou shodu se spánkovými cykly plodu v děloze matky (Nijhuis et al., 1982). Přesto ale může být prováděno několik neinvazivních metod, které odhalí behaviorální stav plodu i v intrauterinním stavu. Ultrasonografická (USG) pozorování umožňují vizualizaci pohybů těla plodu, jeho mimiku, pohyby očí a následně lze spolu s dalšími metodami využít i k identifikaci různých spánkových fází. Jedná se o velmi běžnou a dostupnou metodu sledování behaviorálních stavů plodu. Dalším důležitým nástrojem je kardiokografie (CTG), která sleduje variabilitu srdeční frekvence plodu a umožňuje nepřímou detekci změn mezi aktivním a klidovým stavem. Moderní a detailnější metody, jako je fetální magnetoencefalografie (fMEG), poskytují podrobnější pohled na fetální mozkovou aktivitu a umožňují tak detekci synchronizovaných oscilací spojených se spánkovými cykly. Tato metoda snímá magnetickou aktivitu vznikající činností fetálního mozku skrze břišní stěnu matky a tím je schopna odhalit funkční vzorce i bez nutnosti elektrod připevněných na samotný plod, jako je to nutné u EEG (Haddad et al., 2011).

### **4.2 Druhy spánku v prenatálním období**

V prenatálním období lze rozlišit tři základní spánkové stavy – aktivní spánek (AS), klidový spánek (QS) a neurčitý spánek (IS).

### **4.2.1 Aktivní spánek**

Pro AS jsou typické časté a periodické pohyby těla doprovázené rychlými i pomalejšími pohyby očí pod zavřenými víčky, mimické projevy jako úsměvy a sací reflex a značná fluktuace srdeční frekvence (Arduini et al., 1985). Nedílnou součástí tohoto stavu je také výskyt myoklonických záškubů, nejčastěji končetin, které poskytují senzoryckou zpětnou vazbu do thalamu, somatosenzorycké kůry a hippocampu, a tím napomáhají vývoji a upevnění neuronálních spojení v sensorimotorických okruzích ještě před rozvojem cíleného volního pohybu (Khazipov et al., 2004).

### **4.2.2 Klidový spánek**

QS se vyznačuje absencí rychlých očních pohybů, stabilní vegetativní aktivitou a diskontinuálním EEG s převažujícími delta vlnami, což odpovídá nezralé formě non-REM spánku (André et al., 2010). Tento stav je spojen s minimální motorickou aktivitou a pravidelným dýcháním (Parmelee et al., 1972), přičemž EEG záznam vykazuje bilaterálně synchronní výboje aktivity trvající 5 až 6 sekund, které se střídají s obdobími snížené amplitudy o srovnatelné délce. Tento jev byl nazván francouzsky „tracé alternant“ (Dreyfus-Brisac, 1968). Jak mozek dozrává, EEG vzorce se stávají koordinovanějšími a vykazují téměř klasickou strukturu non-REM spánku novorozenců. (Nijhuis et al., 1982)

### **4.2.3 Neurčitý spánek**

IS je stav, kdy nelze jednoznačně klasifikovat spánek jako aktivní nebo klidový. V časném prenatálním období a až do 28.-30. týdne gestačního věku IS tvoří značnou část spánkového času, přičemž jeho podíl postupně klesá s dozráváním mozku (Hobson, 1972)

## **4.3 Postupný vývoj spánkových cyklů**

Od 24. týdne těhotenství lze u předčasně narozených dětí detekovat základní spánkové vzorce. AS se objevuje kolem 27.–28. týdne, přičemž jeho epizody mohou trvat i přes 13 minut (Curzi-Dascalova et al., 1993). Ve stejném období se začínají objevovat první mimické projevy, jako je úsměv (Emde & Koenig, 1969).

Od 28.–30. týdne se začíná diferencovat QS jako samostatný spánkový stav, zatímco neurčitý spánek stále tvoří markantní část spánkových cyklů – ve 31.-34. týdnu přibližně 30 % celkového spánkového cyklu a ve 35.-36. týdnu se sníží na 12 % (Curzi-Dascalova et al., 1988). Aktivní bdělost se objevuje kolem 30.–31. týdne těhotenství, zatímco klidová bdělost se objevuje až od

35. týdne (Curzi-Dascalova, 1995). Po 36. týdnu EEG záznamy vykazují vzory téměř odpovídající novorozeneckému spánku (Cirelli & Tononi, 2015)

Reaktivita na podněty se vyvíjí mezi 28.–30. týdnem těhotenství a s přibližováním termínu porodu se stává stabilnější a snáze rozpoznatelnou (André et al., 2010). Spánkové vzorce plodu tak reflektují dozrávání mozkových funkcí a autonomních regulačních mechanismů, které jsou zásadní pro postnatální adaptaci na extrauterinní prostředí.

## **5. Prenatální vývoj cirkadiálních rytmů**

Cirkadiální rytmy se u savců vytvářejí už během prenatálního vývoje. Plod si připravuje vlastní endogenní cirkadiální systém ještě před narozením, aby se po porodu dokázal přizpůsobit střídání dne a noci. Zkoumání prenatálního vývoje cirkadiálních rytmů u lidí je omezeno etickými a technickými překážkami, a proto mnoho informací pochází ze zvířecích modelů – zejména hlodavců a také modelů srovnatelných s člověkem (ovce, primáti, kteří rodí vyzrálější mláďata).

### **5.1 vývoj SCN**

SCN vznikají z ventrální oblasti diencefala a jejich neuronální populace se začíná formovat u potkana přibližně ve 14. dni embryonálního vývoje (E14). Ukončení gestace nastává kolem E22, ale strukturální dozrávání SCN trvá až do přibližně desátého dne po narození (P10) (Moore, 1991). Vznik synaptických spojení v této oblasti je dominantně postnatální (Moore & Bernstein, 1989). První náznaky cirkadiálních změn v metabolické aktivitě SCN buněk byly pozorovány pomocí značené deoxyglukózy ve stádiích E19–E22, tedy krátce před porodem a podobné výsledky přinesla i studie provedena na primátech (Reppert & Schwartz, 1984). Elektrická aktivita neuronů v této oblasti začíná být rytmická od E22 a její intenzita dále stoupá až do období po narození, přibližně do P14 (Shibata & Moore, 1987).

### **5.2 Vývoj exprese hodinových genů**

Genová exprese hodinových genů v SCN laboratorního potkana začíná ještě před narozením, avšak rytmicita se vyvíjí postupně. Experimentálně byly sledovány profily genů *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Bmal1* a *Clock* v různých vývojových stádiích (E19, P3, P10). V E19 byly všechny tyto geny již transkribovány, ale bez projevů rytmu a bez detekce příslušných proteinů (Sládek et al., 2004). Následně v E20, se u genů *Per1* a *Per2* začíná objevovat první známka rytmické exprese (Ohta et al., 2002). Ve stádiu P3 byly zaznamenány rytmy u *Per1*, *Per2*, *Bmal1* a *Cry1*,

a úroveň jejich exprese se vyrovnala dospělému stavu v P10. Gen *Clock* zůstává bez rytmicity ve všech stádiích, což odpovídá i nálezům u dospělých zvířat (Sládek et al., 2004).

### 5.3 Seřízení cyklů matkou

Protože plod nemá přímý kontakt se světlem ani střídáním dne a noci, jsou jeho vznikající rytmy synchronizovány rytmy matky – zejména denními změnami hormonů, teploty a dalších fyziologických faktorů. Klíčovou roli hraje melatonin (Lerner et al., 1958) – hormon vylučovaný v noci epifýzou matky (Yellon & Longo, 1987). Melatonin volně prochází placentou do fetálního oběhu a slouží jako signál “noci” pro vyvíjející se plod (Schenker et al., 1998). Většina fetálních tkání exprimuje melatoninové receptory, jsou detekovatelné i ve vyvíjecím se mozku plodu (Williams et al., 1991). Další důležité hormony představují glukokortikoidy nebo dopamin, jejichž hladina během dne pravidelně kolísá, a tím synchronizuje biorytmy plodu – proto se označují jako zeitgebery pro fetální hodiny ( shrnuto v Bates & Herzog, 2020).

### 5.4 Narušení seřízení fetálních hodin matkou

Přímé expozici světlu je plod v děloze ušetřen, ale světelný režim matky výrazně ovlivňuje jeho prostředí. Světlo je primární synchronizátor denních rytmů matky a délka dne a noci, které je matka vystavena, tak nepřímo určuje, jaké hormonální signály plod dostane (shrnuto v Sumova et al., 2012). Pokud je však matčin světelný režim nepravidelný (např. pracuje na noční směny nebo je vystavena světlu v noci), mohou být signály matky konfliktní nebo slabé. Studie na zvířatech ukazují, že změny fotoperiody během březosti – např. opakované posuny světelného režimu nebo konstantní vystavení světlu narušují vývoj cirkadiálních funkcí potomků.

Studie Natalie Mendez a kol. testovala účinky konstantního světla na březí potkany a jejich potomstvo ve srovnání s kontrolní skupinou, která byla vystavena normálnímu cyklu světla a tmy. Potomci experimentální skupiny potkanů vykazovali sníženou tělesnou hmotnost a další biometrické parametry. Navíc na úrovni fetální adrenální žlázy bylo zaznamenáno výrazné narušení molekulárních oscilací cirkadiálního systému, charakterizované absencí rytmicity v expresi klíčových genů pro časování (*Per2*, *Bmal1*) a genů pod jejich kontrolou (*StAR*, *Mt1*, *Egr1*). Současně byla zaznamenána snížená koncentrace kortikosteronu ve fetální adrenální tkáni a úplná ztráta jeho normální denní variability. In vitro experimenty s fetálními adrenálními explantáty ukázaly sníženou produkci kortikosteronu a opožděnou odpověď na ACTH (adrenokortikotropní hormon). Klíčovým zjištěním bylo, že denní suplementace melatoninem

během subjektivní noci u testovaných matek zvrátila negativní účinky narušení časové regulace a obnovila rytmy genové exprese, hladinu kortikosteronu i odpověď na ACTH. Tím se potvrzuje, že mateřský melatonin je klíčovým synchronizačním signálem pro vývoj fetálního cirkadiálního systému a jeho narušení může mít vážné následky pro zdraví potomků (Mendez et al., 2012). Stejně výsledky přinesla studie Houdek et al. (2015), kde odstranění matčiny epifýzy způsobilo desynchronizaci rytmu v expresi genů v SCN novorozenech mláďat a aplikace melatoninu v době před porodem tyto rytmy obnovila.

## **6. Prenatální vystavení alkoholu a FASD**

Prenatální expozice alkoholu má závažné dopady na vyvíjející se nervový systém a je známo, že způsobuje širokou škálu poruch souhrnně označovaných jako fetální alkoholový syndrom (FASD). Méně prozkoumaným, avšak klinicky významným aspektem FASD jsou poruchy spánku a cirkadiálních rytmů.

### **6.1 Poruchy spánku a spánkové architektury způsobené alkoholem**

Řada studií souhlasně potvrzuje, že prenatální expozice alkoholu vede k abnormální struktuře spánkových cyklů u novorozenců a k výraznému snížení množství AS. Experimentální práce (Hilakivi et al., 1987) na potkanech prokázala, že mláďata, jejichž matky konzumovaly během březosti alkohol, trávila v období brzy po narození méně času aktivním spánkem a více času bděním, než kontrolní skupina. Zajímavé je, že tento efekt byl závislý také na genetickém pozadí: v linii potkanů geneticky náchylné k vyšší konzumaci alkoholu se postnatálně výrazné změny spánku neprojevíly, naopak v linii s genetickou averzí vůči alkoholu došlo k markantnímu poklesu AS a nekvalitnímu spánku obecně. Tento výsledek ukazuje, že i genetické predispozice mohou ovlivňovat zranitelnost vývoje spánkových cyklů vůči negativním účinkům alkoholu.

Prenatální expozice alkoholu nemá vliv jen na množství a kvalitu AS, ale i na celkovou architekturu spánku. Ipsiroglu et al. (2019) provedli systematické pozorování spánku 40 dětí s FASD a zároveň experiment na mláďatech potkanů vystavených alkoholu. Zjistili, že 93 % monitorovaných dětí trpělo poruchou cirkadiálního rytmu bdění a spánku, 85 % mělo neklidný spánek s častými pohyby a otáčením se, a všechny trpěly chronickou nespavostí. Byla u nich zkrácena celková doba spánku, zvýšená fragmentace a tělesný neklid. V experimentální části studie byla na potkanech sledována pozoruhodně podobná řada poruch jako u dětí: alkoholu vystavená mláďata měla prodlouženou latenci usnutí, zkrácenou celkovou dobu spánku, delší

epizody bdění a výrazně více přechodů mezi stavy spánku a bdění oproti kontrolním skupinám. Tato paralela mezi klinickými a experimentálními daty posiluje přesvědčení, že alkohol v prenatalním období působí přímo na mechanismy regulace spánku.

K navozování REM spánku je za normálních okolností nezbytná aktivita cholinergních neuronů ve Varolově mostu a laterodorzálním tegmentu (tzv. REM-on buňky) a útlum monoaminergních neuronů raphe a LC (REM-off buňky), jak shrnuje Saper et al. (2010). Prenatální alkohol tyto okruhy funkčně poškozuje. Anatomická studie mozkových řezů dospělých myší exponovaných alkoholu in utero ukázala, že přestože celkový počet cholinergních neuronů ve Varolově mostu – konkrétně v laterodorzálním tegmentálním a pedunkulopontinním jádře – nebyl významně změněn, jejich velikost, měřená jako průměrná plocha a objem somat, byla signifikantně menší oproti kontrolním skupinám. Menší cholinergní neurony mají pravděpodobně vyšší práh excitability, omezenou schopnost generovat a šířit akční potenciály a také omezené axonální projekce, což může vést k nedostatečné aktivaci cílových struktur (Olateju et al., 2017). Vzhledem k jejich úloze v iniciaci a udržování REM spánku prostřednictvím projekcí do thalamu a bazálního předního mozku (Semba et al., 1988; Webster & Jones, 1988) se tyto morfologické změny mohou podílet na poruchách spánku, které jsou u jedinců s FASD často pozorovány – zejména zkrácení REM fáze, časté probouzení a zvýšená doba bdění.

Zároveň byly u zvířat exponovaných alkoholu pozorovány poruchy i v orexinovém systému. Alkohol zřejmě způsobuje sníženou hustotu orexinergních nervových zakončení v cingulární kůře (Olateju et al., 2017). Orexin (jinak také nazývaný hypokretin) přitom za normálních okolností stabilizuje střídání spánku a bdění (Peyron et al., 1998) a jeho deficit může přispívat k fragmentaci spánku a častějším probouzením.

### **6.1.1 Neurozánětlivá reakce indukovaná alkoholem a role REM spánku**

Prenatální expozice alkoholu má za následek výraznou neurozánětlivou reakci ve vyvíjejícím se mozku plodu. Studie na zvířecích modelech ukazují, že ethanol zvyšuje expresi prozánětlivých cytokinů, zejména interleukinu-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) a tumor nekrotizujícího faktoru  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Lippai et al., 2013). Současně se aktivují mozkové imunitní buňky – mikroglie – které přecházejí do reaktivního “M1” fenotypu produkujícího právě tyto cytokiny (Peng et al., 2017). Ethanol stimuluje TLR4 receptory na mikroglii, což aktivuje dráhy NF- $\kappa$ B (nukleárního faktoru kappa B) a MAPK (Mitogenem aktivovaných proteinkináz) a vede k uvolňování cytokinů, oxidačnímu stresu a apoptóze neuronů (Fernandez-Lizarbe et al., 2009).

REM spánek za normálních podmínek tlumí zánětlivé mechanismy a jeho suprese v důsledku prenatální konzumace alkoholu proto představuje ztrátu významného protizánětlivého regulačního prvku – bylo prokázáno, že deprivace REM spánku zvyšuje hladiny prozánětlivých IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  a IL-6, zatímco protizánětlivý IL-10 je snížen. (Yehuda et al., 2009). IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$  narušují dlouhodobou potenciaci a mohou vést k nadměrnému či abnormálnímu synaptickému „prořezávání“ což se postnatálně může projevit poruchami paměti, učením či zvýšenou impulzivitou (Cunningham et al., 1996).

### **6.1.2 Narušení homeostatické regulace spánku**

Potvrzuje se, že kromě změn v délce a kontinuitě spánku vývojová expozice alkoholu narušuje také homeostatické mechanismy. Mozek takto postižených jedinců nemusí adekvátně reagovat na spánkovou deprivaci vyšší potřebou hlubokého spánku. Na myším modelu bylo experimentálně prokázáno, že pokud je mláďatům podána jednorázová vysoká dávka ethanolu 7. den po narození (v období intenzivní synaptogeneze), dojde k narušení homeostatické potřeby NREM fáze po delší spánkové deprivaci. Konkrétně se narušení projevilo absencí typického post-deprivačního zvýšení delta vln v NREM fázi. Nízká úroveň delta aktivity byla patrná i v experimentu bez předchozí spánkové deprivace, což ukazuje na přetrvávající snížení spánkového tlaku. Zajímavým zjištěním této studie navíc bylo, že funkční propojení neuronálních okruhů salienční sítě, zahrnující fronto-insulární a limbické oblasti mozku, u dospělých jedinců vystavených alkoholu připomínalo vzorce typické pro stav spánkové deprivace. Tato odchylka byla identifikována pomocí analýzy funkční konektivity na základě fMRI, která prokázala, že i v klidovém odpočatém stavu mozek vykazoval známky funkčního zatížení. Výsledky naznačují, že prenatální nebo časně postnatální expozice alkoholu může jedince trvale nastavit do stavu podobného chronické spánkové deprivaci, s možnými dopady na kognitivní i emoční funkce. (Shah et al., 2023)

Podobné homeostatické narušení bylo zaznamenáno také u lidských novorozenců s prenatální expozicí alkoholu. Ve studii Troese et al., (2008) byla u dvouměsíčních kojenců pozorována výrazná fragmentace spánku a zkrácení epizod spontánních pohybů během spánku, které autoři interpretují jako možné známky nahromaděného spánkového dluhu a oslabené vnitřní aktivity. Tyto spontánní pohyby jsou, jak již bylo zmíněno, v raném postnatálním období velmi důležité a jejich oslabení tedy může signalizovat poruchu homeostatických procesů. V souladu s tímto narušením autoři upozorňují i na potenciální souvislost s vyšším rizikem náhlého úmrtí kojenců, které je s prenatální expozicí alkoholu opakovaně spojováno.

## **6.2 Vliv alkoholové expozice na vyvíjející se cirkadiánní rytmy**

Vícero studií ukazuje, že prenatální expozice alkoholu zasahuje i do normálního vývoje cirkadiánních rytmů a způsobuje v této oblasti strukturální i funkční změny. Na potkaním modelu bylo zjištěno, že vystavení alkoholu v období nejintenzivnějšího neuronálního spurtu vede v dospělosti k významnému snížení hladin neurotrofického růstového faktoru BDNF v SCN a k úplné ztrátě jeho přirozené cirkadiánní rytmicity (Allen et al., 2004). BDNF zajišťuje přežití, růst a plasticitu neuronů (Bartrup et al., 1997), ale zatímco u kontrolních zvířat vykazovaly hladiny BDNF rytmus s vyšší koncentrací v době subjektivní noci, u alkoholové skupiny tento rytmus zcela chyběl. To naznačuje, že alkohol může trvale změnit neuronální aktivitu SCN či jeho výstupní signály (Allen et al., 2004).

### **6.2.1 Narušení behaviorálních funkcí**

Názorně se dá narušení cirkadiánních rytmů pozorovat v podmínkách, kde je rytmicita měřitelná. Novorozená mláďata potkanů byla každý den od 4. do 9. postnatálního dne (P4-P9) vystavena vysoké dávce etanolu (4,5 g/kg/den). Následně ve věku dvou měsíců byl testován rytmus jejich pohybové aktivity (běh v kolečku), a to jak za standardního světelného režimu s 12 hodinami světla a 12 hodinami tmy, tak následně ve stálé tmě. Zvířata exponovaná alkoholu jevila nestabilní a abnormální synchronizaci k světelnému cyklu. Čas nástupu jejich denní aktivity výrazně a nepravidelně kolísal a měl tendenci začínat dříve než u kontrolní skupiny. V konstantní tmě měli potkani zkrácenou periodu svého endogenního rytmu, a navíc byla jejich aktivita během dne roztržštěná, aktivní fáze byla delší a rozdělena do většího počtu kratších epizod. Tyto nálezy indikují trvalé rozladění vnitřních hodin, neschopnost udržet 24hodinový rytmus a řídit podle něj svou denní pohybovou aktivitu (Allen et al., 2005).

### **6.2.2 Narušení rytmů na molekulární úrovni**

Studie se zaměřily také na molekulární úroveň narušení alkoholem. Farnell et al. (2008) navázali na behaviorální studie a zkoumali přímo exprese hodinových genů u dospělých potkanů exponovaných alkoholu neonatálně, opět v P4-P9, 4,5 g/kg/den. Z odebraných vzorků SCN, jater a mozečku v různých cirkadiánních časech byly kvantifikovány hladiny mRNA hlavních hodinových genů. U kontrolních skupin byly dle očekávání nalezeny robustní cirkadiánní oscilace genů *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Bmal1* a *Rev-erba* ve všech odebraných tkáních. U experimentální skupiny byly ale nalezeny změny: v SCN byl rytmus exprese genu *Cry1*

výrazně utlumen a v mozečku a játrech byla maxima exprese genu *Per2* posunuta do středu subjektivního dne, což je dříve oproti kontrolním skupinám. Ostatní geny zůstaly zachovány v běžném rytmu (Farnell et al., 2008). Takovéto posuny ukazují na přeprogramování vnitřních hodin na úrovni genové exprese. Zvláště utlumení *Cry1* rytmu v SCN je závažné z důvodu jeho důležitosti v tvorbě zpětnovazebných smyček, jeho narušení tedy znamená narušení stability celého oscilátoru. Zajímavé také je, že mláďata vystavena alkoholu v prenatalním období vykazují rozladěné denní rytmy některých imunitních parametrů, např. oscilace aktivity NK buněk a produkce cytokinů byly fázově posunuté nebo zkrácené (Arjona et al., 2006). To poukazuje na možnost, že dopad vývojového alkoholu na cirkadiální rytmy může být systémový a ovlivňovat více tělesných funkcí (imunita, endokrinní rytmy apod.)

### **6.2.3 Epigenetické změny**

Recentní studie zároveň ukazují, že cirkadiální rytmy mohou být ovlivněny i na epigenetické úrovni. Analýza vzorků slin dětí s FASD odhalila změny v expresi několika epigenetických modifikátorů (např. MLL1, P300, SIRT1, EZH2 a HDAC3), což naznačuje, že alkohol může zasahovat do regulačních mechanismů, jako je metylace DNA nebo acetylace histonů, a tím narušovat fungování biologických hodin (Das et al., 2024).

Různé studie využily různé přístupy, ale je evidentní, že výsledky jsou podobné a jejich závěry se navzájem doplňují. Z behaviorálního hlediska je společným jmenovatelem roztržštěný a slabě ukotvený spánek a cirkadiální rytmus s častými fázovými posuny. Na buněčné úrovni je potvrzena narušená činnost SCN a změna v expresi klíčových hodinových genů. To vše vede k pravděpodobně celoživotním odchylkám v rytmech spánku, bdění a dalších fyziologických funkcí.

## **6.3 Vliv prenatalní expozice alkoholu na vývoj mozku**

### **6.3.1 Apoptóza a neurodegenerace vyvolaná alkoholem**

Jedním z nejlépe popsáných účinků prenatalního vystavení alkoholu je indukce rozsáhlé apoptické buněčné smrti v mozku. Přelomová studie autorů Ikonomidou et al. (2000) publikovaná v časopise *Science* ukázala, že již jednorázová vysoká dávka ethanolu podaná hlodavcím mláďatům během období největšího růstového spurtu mozku, kolem prvního postnatalního týdne, vyvolala masivní odumírání neuronů v mnoha oblastech vyvíjejícího se mozku. Tato neurodegenerace se projevuje např. generalizovaným úbytkem mozkové hmoty a mozečkových a hipokampálních neuronů (West et al., 1986), což svým rozsahem a charakterem

odpovídá neuropatologiím pozorovaným u těžších forem FAS u dětí. Autoři prokázali, že alkohol působí neurotoxicky dvojitým mechanismem: blokuje excitační N-metyl-D-aspartát (NMDA) receptory a nadměrně aktivuje inhibiční GABA<sub>A</sub> receptory. Kombinace těchto mechanismů spouští v nezralém mozku programovanou buněčnou smrt ve velkém rozsahu. Důsledkem bylo snížení celkového počtu neuronů v postižených strukturách a trvalé snížení objemu těchto mozkových oblastí (Ikonomidou et al., 2000). Další studie referovaly o výrazné neuronální smrti v mozečku, nebo čichovém bulbu (Bonthius et al., 1992; Chen et al., 1998). Zejména mozeček a hippocampus jsou struktury, u kterých byl v různých studiích prokázán nevratný úbytek buněk po expozici alkoholu a s tím souvisí deficit behaviorálních a kognitivních funkcí (Kelly et al., 1988; Thomas et al., 1996).

### **6.3.2 Neurogeneze a vývoj struktur středové linie**

Kromě indukce apoptózy může alkohol během vývoje také potlačovat vznik nových neuronů. během embryogeneze se v mozku neuroepiteliální kmenové buňky diferencují na radiální glie a z nich následně vznikají neurony a astrocyty (Hunter & Hatten, 1995; Rakic, 1972). Radiální glie slouží jako vodící struktury pro migrující neurony (Rakic, 1972). Alkohol narušuje jak proliferaci těchto progenitorů, tak jejich diferenciaci a migraci dceřiných buněk (Sambo et al., 2022). Výsledkem je nižší počet nově vytvořených neuronů a podpůrných gliových buněk ve vyvíjejícím se mozku, a to se projevuje například poruchami ve vývoji struktur, které se formují podél středové osy mozku. Typickým příkladem je corpus callosum (kalózní těleso), jehož částečná nebo úplná absence patří k častým nálezům u FAS (Riley et al., 1995).

Podobný mechanismus může stát i za narušením vývoje serotonergního systému, jehož prekurzory vznikají právě ve středové oblasti mozkového kmene. Prokázalo se, že expozice alkoholu v období mezi embryonálními dny E8–E15 u myši vede ke snížení počtu serotonergních neuronů v jádrech raphe a narušuje jejich migraci i diferenciaci. (Zhou et al., 2001). Tyto změny mohou být prohlubovány snížením hladin serotoninu, který má během vývoje klíčovou regulační roli. Snížená dostupnost serotoninu byla v předchozích studiích spojena s poklesem exprese trofického faktoru S100B (Mazer et al., 1997), jehož nedostatek může dále zhoršit maturaci serotonergních neuronů. S100B je exprimován již v neuroepiteliálních progenitorových buňkách během embryogeneze (Vives et al., 2003) a má prokazatelný vliv na růst a stabilizaci neuritů a synaptické organizace (Azmitia et al., 1990). Vzhledem k tomu, že serotonin během prenatálního vývoje ovlivňuje vývoj četných

mozkových struktur, může narušení jeho regulace přispívat k trvalým změnám v architektuře a funkci centrální nervové soustavy (Gaspar et al., 2003)

Studie dospěly i ke zjištění, že při této škodlivé expozici dochází také ke změnám v expresi genů zapojených do regulace neurogeneze. Tyler & Allan (2014) použili jako jedni z prvních model pouze mírné chronické prenatální expozice alkoholu u myši. Samice konzumovaly 10% roztok alkoholu sladěný sacharinem během březosti, což způsobilo průměrnou hladinu alkoholu v krvi kolem 20 mM. Z embryonální telencefalické tkáně (ve dnech E15–E17) byly izolovány neurální progenitorové buňky (NPC) a kultivovány ex vivo. Analýza genové exprese odhalila, že 11 % genů mělo významně změněnou expresi v proliferujících NPC. Mezi významně sníženými geny byly např. *Hes1* (transkripční faktor brzdící diferenciaci neuronů), *Cxcl1* (cytokin ovlivňující neurogenezi) a *Dlg4* (gen kódující PSD-95, klíčový postsynaptický protein). To naznačuje, že alkohol ovlivňuje molekulární program vývoje nervové soustavy – vede k předčasnému vyčerpání nebo špatné diferenciaci neuronálních prekursorů.

### **6.3.3 Alkoholový zásah do synaptogeneze**

Během pozdního fetálního a raně postnatálního období dochází k bouřlivému nárůstu synapsí v mozku, po němž následuje odštěhávání nevyužitých spojů (Innocenti, 1981; Huttenlocher, 1979). Alkohol působí toxicky i právě v době tohoto synaptického rozvoje, což může mít za následek snížený počet synapsí, jejich abnormální strukturu a nesprávné zapojení do okruhů. Jasný důkaz předvedli na myším experimentu Cui et al. (2010). Myšim byl během březosti podáván alkohol a na mláďatech byla poté zkoumána morfologie dendritických trnů na pyramidových neuronech zrakové kůry. Výsledky ukázaly, že prenatální expozice alkoholu vedla k trvalému snížení hustoty dendritických trnů na kortikálních neuronech. Trnů bylo méně a byly významně delší než u kontrolní skupiny. Prodloužené trny jsou znakem přetrvávající nezralosti synapsí (zralé synapse mají kratší stopkovité trny). Tyto změny byly závislé na dávce podaného alkoholu. Elektronmikroskopická sledování navíc odhalila odchylky ve struktuře synapsí: synaptická zakončení experimentální skupiny obsahovala méně synaptických váčků s neurotransmitery, synaptická štěrbina byla zúžená a postsynaptická denzita byla silnější. Tyto jevy poukazují na to, že prenatální vystavení alkoholu neznamená pouze ztrátu, ale i špatnou diferenciaci a propojení neuronů, které přežily.

### 6.3.4 Nezralé a dysfunkční neuronální okruhy

Kombinace výše popsaných jevů: ztráta některých neuronů, vznik menšího počtu neuronů nových, poškození gliových podpůrných buněk a redukováná či abnormální synaptická konektivita – logicky vede k nedostatečnému vyzrávání neuronálních okruhů. Z textu výše je zjevné, že prenatální alkohol může způsobit, že tyto okruhy budou hypofunkční (např. kvůli sníženému počtu neuronů nebo synapsí) nebo dysfunkční (kvůli špatnému zapojení, nesprávným poměrům excitace/inhibice či narušenému časování aktivace). Jedná se například o striatální okruhy, protože nedávná studie na myších uvádí, že alkohol narušuje vývoj GABAergních synapsí ve striatu, přičemž u některých typů interneuronů došlo k dysbalanci mini-synaptických proudů, což vedlo k narušení lokální synaptické inhibice. Tyto změny odrážejí funkční dysregulaci striatálních neuronálních okruhů a souvisejí se známými motorickými deficity u FASD novorozenců (Tousley et al., 2025). Dalším příkladem narušené výstavby neuronálních okruhů je již zmíněné corpus callosum – hlavní spojovací dráha mezi mozkovými hemisférami (Aboitiz & Montiel, 2003). U dětí s FASD bývá tato struktura často ztenčená (Riley et al., 1995), což odráží deficity v tvorbě dlouhodobých projekčních spojů, které mohou souviset s poruchou migrace gliálních buněk během vývoje středové linie mozku. Taková strukturální anomálie může vést ke zpoždění či nekoordinovanosti aktivit mezi hemisférami, což by mohlo přispět k EEG abnormalitám spánku (například méně synchronizované pomalé vlny během NREM spánku)(Avvenuti et al., 2020). Tyto konkrétní příklady ukazují, že téměř každý stupeň vývoje neuronové sítě může být alkoholem zasažen – od tvorby neuronů, přes jejich zapojení až po finální ladění synaptických přenosů.

## 7. Závěr

Tato bakalářská práce přináší ucelený pohled na vývoj spánku a cirkadiálních rytmů v prenatalním období a shrnuje, jak do tohoto vývoje zasahuje expozice alkoholu. Výsledky naznačují, že vliv alkoholu je možná hlubší, než se dříve předpokládalo, protože se netýká jen struktury mozku, ale i jeho vnitřního časování a molekulární regulace. Spánek a cirkadiální rytmus se tak jeví jako faktory, na kterých se mohou účinky alkoholu projevit i bez zjevných anatomických změn. V práci jsem se snažila propojit poznatky z různých úrovní od buněčné po behaviorální.

Stále ale v této oblasti zůstává mnoho otázek otevřených. Z této bakalářské práce vyplývá, že poznatky o narušení alkoholem jsou zkoumány hlavně na modelech s vysokými, často jednorázově podanými dávkami alkoholu, které sice dobře demonstrují toxické účinky, ale nejsou snadno přenositelné na běžné situace, kterým může být vystaven lidský plod. Rozdíly mezi výsledky studií mohou souviset kromě samotného narušení alkoholem také například typem použitého zvířecího modelu, nebo vlivem postnatální péče, která je, hlavně v lidské společnosti, výrazným vývojovým faktorem.

Výzkum se stále více zaměřuje na molekulární a epigenetické mechanismy narušení, vliv pohlaví, a hlavně na dlouhodobý dopad těchto změn. V oblasti spánku a cirkadiálních rytmů je důležité zmapovat, jak přesně jsou narušeny mozkové okruhy regulující rytmus bdění a spánku a další procesy, a zjistit, zda lze tyto odchylky objevit dříve, než se projeví klinicky. Důležité je také hledat způsoby zmírnění negativních dopadů FASD na zdraví, např. pomocí světelné terapie pro stabilizaci biologických rytmů.

## 8. Literatura:

*Sekundární citace jsou v seznamu literatury označeny hvězdičkou*

- Abe, M., Herzog, E. D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., & Block, G. D. (2002). Circadian rhythms in isolated brain regions. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(1), 350–356.
- \*Aboitiz, F., & Montiel, J. (2003). One hundred million years of interhemispheric communication: The history of the corpus callosum. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, 36(4), 409–420.
- Akhtar, R. A., Reddy, A. B., Maywood, E. S., Clayton, J. D., King, V. M., Smith, A. G., Gant, T. W., Hastings, M. H., & Kyriacou, C. P. (2002). Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Current Biology: CB*, 12(7), 540–550.
- Allen, G. C., West, J. R., Chen, W.-J. A., & Earnest, D. J. (2004). Developmental alcohol exposure disrupts circadian regulation of BDNF in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurotoxicology and Teratology*, 26(3), 353–358.
- Allen, G. C., West, J. R., Chen, W.-J. A., & Earnest, D. J. (2005). Neonatal Alcohol Exposure Permanently Disrupts the Circadian Properties and Photic Entrainment of the Activity Rhythm in Adult Rats. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 29(10), 1845–1852.
- \*André, M., Lamblin, M.-D., d'Allest, A. M., Curzi-Dascalova, L., Moussalli-Salefranque, F., Nguyen The Tich, S., Vecchierini-Blineau, M.-F., Wallois, F., Walls-Esquivel, E., & Plouin, P. (2010). Electroencephalography in premature and full-term infants. Developmental features and glossary. *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology*, 40(2), 59–124.

- Arduini, D., Rizzo, G., Giorlandino, C., Vizzone, A., Nava, S., Dell'Acqua, S., Valensise, H., & Romanini, C. (1985). The fetal behavioural states: An ultrasonic study. *Prenatal Diagnosis*, *5*(4), 269–276.
- Arjona, A., Boyadjieva, N., Kuhn, P., & Sarkar, D. K. (2006). Fetal ethanol exposure disrupts the daily rhythms of splenic granzyme B, IFN-gamma, and NK cell cytotoxicity in adulthood. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *30*(6), 1039–1044.
- Aserinsky, E., & Kleitman, N. (1953). Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science (New York, N.Y.)*, *118*(3062), 273–274.
- Aston-Jones, G., & Bloom, F. E. (1981). Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *1*(8), 876–886.
- Aton, S. J., Colwell, C. S., Harmar, A. J., Waschek, J., & Herzog, E. D. (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nature Neuroscience*, *8*(4), 476–483.
- 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 of the United States of America*, *103*(50), 19188–19193.
- Avvenuti, G., Handjaras, G., Betta, M., Cataldi, J., Imperatori, L. S., Lattanzi, S., Riedner, B. A., Pietrini, P., Ricciardi, E., Tononi, G., Siclari, F., Polonara, G., Fabri, M., Silvestrini, M., Bellesi, M., & Bernardi, G. (2020). Integrity of Corpus Callosum Is Essential for the Cross-Hemispheric Propagation of Sleep Slow Waves: A High-Density EEG Study in Split-Brain Patients. *The Journal of Neuroscience*, *40*(29), 5589–5603.
- Azmitia, E. C., Dolan, K., & Whitaker-Azmitia, P. M. (1990). S-100B but not NGF, EGF, insulin or calmodulin is a CNS serotonergic growth factor. *Brain Research*, *516*(2), 354–356.
- Bae, K., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2001). Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron*, *30*(2), 525–536.

- Balsalobre, A., Damiola, F., & Schibler, U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, *93*(6), 929–937.
- Bartrup, J. T., Moorman, J. M., & Newberry, N. R. (1997). BDNF enhances neuronal growth and synaptic activity in hippocampal cell cultures. *Neuroreport*, *8*(17), 3791–3794.
- \*Bates, K., & Herzog, E. D. (2020). Maternal-Fetal Circadian Communication During Pregnancy. *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 198.
- Besharse, J. C., & Iuvone, P. M. (1983). Circadian clock in *Xenopus* eye controlling retinal serotonin N-acetyltransferase. *Nature*, *305*(5930), 133–135.
- Bonthius, D. J., Bonthius, N. E., Napper, R. M., & West, J. R. (1992). Early postnatal alcohol exposure acutely and permanently reduces the number of granule cells and mitral cells in the rat olfactory bulb: A stereological study. *The Journal of Comparative Neurology*, *324*(4), 557–566.
- Borbély, A. A. (1982). A two process model of sleep regulation. *Human Neurobiology*, *1*(3), 195–204.
- Brooks, D. C., & Bizzi, E. (1963). Functional connections between pontine reticular formation and lateral geniculate nucleus during deep sleep. *Archives Italiennes De Biologie*, *101*, 648–665.
- Bunger, M. K., Wilsbacher, L. D., Moran, S. M., Clendenin, C., Radcliffe, L. A., Hogenesch, J. B., Simon, M. C., Takahashi, J. S., & Bradfield, C. A. (2000). Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*, *103*(7), 1009–1017.
- Carskadon, M. A., & Dement, W. C. (2005). Chapter 2 - Normal Human Sleep: An Overview. In M. H. Kryger, T. Roth, & W. C. Dement (Ed.), *Principles and Practice of Sleep Medicine (Fourth Edition)* (s. 13–23). W.B. Saunders.
- Cui, Z.-J., Zhao, K.-B., Zhao, H.-J., Yu, D.-M., Niu, Y.-L., Zhang, J.-S., & Deng, J.-B. (2010). Prenatal alcohol exposure induces long-term changes in dendritic spines and synapses in the mouse visual cortex. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, *45*(4), 312–319.

- Cunningham, A. J., Murray, C. A., O'Neill, L. A., Lynch, M. A., & O'Connor, J. J. (1996). Interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumour necrosis factor (TNF) inhibit long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neuroscience Letters*, *203*(1), 17–20.
- \*Curzi-Dascalova, L. (1995). Développement du sommeil et des fonctions sous contrôle du système nerveux autonome chez le nouveau-né prématuré et à terme. *Archives de Pédiatrie*, *2*(3), 255–262.
- Curzi-Dascalova, L., Figueroa, J. M., Eiselt, M., Christova, E., Virassamy, A., d'Allest, A. M., Guimarães, H., Gaultier, C., & Dehan, M. (1993). Sleep state organization in premature infants of less than 35 weeks' gestational age. *Pediatric Research*, *34*(5), 624–628.
- Curzi-Dascalova, L., Peirano, P., & Morel-Kahn, F. (1988). Development of sleep states in normal premature and full-term newborns. *Developmental Psychobiology*, *21*(5), 431–444.
- Das, U., Thomas, J. D., Tarale, P., Soja, J., Inkelis, S., Chambers, C., & Sarkar, D. K. (2024). Altered circadian expression of clock genes and clock-regulatory epigenetic modifiers in saliva of children with fetal alcohol spectrum disorders. *Scientific Reports*, *14*(1), 19886.
- Dement, W., & Kleitman, N. (1957). Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, *9*(4), 673–690.
- Dreyfus-Brisac, C. (1968). Sleep ontogenesis in early human prematurity from 24 to 27 weeks of conceptional age. *Developmental Psychobiology*, *1*(3), 162–169.
- Eide, E. J., Vielhaber, E. L., Hinz, W. A., & Virshup, D. M. (2002). The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iepsilon. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(19), 17248–17254.
- el Mansari, M., Sakai, K., & Jouvet, M. (1989). Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle in freely moving cats. *Experimental Brain Research*, *76*(3), 519–529.

- Emde, R. N., & Koenig, K. L. (1969). Neonatal smiling, frowning, and rapid eye movement states. II. Sleep-cycle study. *Journal of the American Academy of Child Psychiatry*, 8(4), 637–656.
- Farnell, Y. Z., Allen, G. C., Nahm, S.-S., Neuendorff, N., West, J. R., Chen, W.-J. A., & Earnest, D. J. (2008). Neonatal alcohol exposure differentially alters clock gene oscillations within the suprachiasmatic nucleus, cerebellum, and liver of adult rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 32(3), 544–552.
- Fernandez-Lizarbe, S., Pascual, M., & Guerri, C. (2009). Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183(7), 4733–4744.
- Gais, S., Mölle, M., Helms, K., & Born, J. (2002). Learning-dependent increases in sleep spindle density. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(15), 6830–6834.
- \*Gaspar, P., Cases, O., & Maroteaux, L. (2003). The developmental role of serotonin: News from mouse molecular genetics. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(12), 1002–1012.
- 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 (New York, N.Y.)*, 280(5369), 1564–1569.
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V., & Cermakian, N. (2005). Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *Journal of Biological Rhythms*, 20(5), 391–403.
- Haddad, N., Govindan, R. B., Vairavan, S., Siegel, E., Temple, J., Preissl, H., Lowery, C. L., & Eswaran, H. (2011). Correlation between Fetal Brain Activity Patterns and Behavioral States: An exploratory fetal magnetoencephalography study. *Experimental neurology*, 228(2), 200–205.
- \*Hannibal, J. (2002). Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell and Tissue Research*, 309(1), 73–88.

- Hannibal, J., Ding, J. M., Chen, D., Fahrenkrug, J., Larsen, P. J., Gillette, M. U., & Mikkelsen, J. D. (1998). Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: A daytime regulator of the biological clock. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *865*, 197–206.
- Hardin, P. E., Hall, J. C., & Rosbash, M. (1990). Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*, *343*(6258), 536–540.
- Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M., & Yau, K. W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: Architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science (New York, N.Y.)*, *295*(5557), 1065–1070.
- Hess, R., Koella, W. P., & Akert, K. (1953). Cortical and subcortical recordings in natural and artificially induced sleep in cats. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, *5*(1), 75–90.
- Hilakivi, L., Tuomisto, L., Hilakivi, I., Kiianmaa, K., Hellevo, K., & Hyytiä, P. (1987). Effect of prenatal alcohol exposure on neonatal sleep-wake behaviour and adult alcohol consumption in the AA and ANA rat lines. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, *22*(3), 231–240.
- Hobson, J. A. (1972). A manual of standardized terminology, techniques and criteria for scoring of states of sleep and wakefulness in newborn infants. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, *33*(6), 614–615.
- 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. *Developmental Neurobiology*, *75*(2), 131–144.
- Hunter, K. E., & Hatten, M. E. (1995). Radial glial cell transformation to astrocytes is bidirectional: Regulation by a diffusible factor in embryonic forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(6), 2061–2065.
- Huttenlocher, P. R. (1979). Synaptic density in human frontal cortex—Developmental changes and effects of aging. *Brain Research*, *163*(2), 195–205.

- Chen, W. J., Parnell, S. E., & West, J. R. (1998). Neonatal alcohol and nicotine exposure limits brain growth and depletes cerebellar Purkinje cells. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 15(1), 33–41.
- Chokroverty, S., & Gupta, D. (2010). Sleep starts. In G. Plazzi & M. J. Thorpy (Ed.), *The Parasomnias and Other Sleep-Related Movement Disorders* (s. 229–236). Cambridge University Press.
- Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M. J., Wozniak, D. F., Koch, C., Genz, K., Price, M. T., Stefovská, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., & Olney, J. W. (2000). Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5455), 1056–1061.
- Innocenti, G. M. (1981). Growth and reshaping of axons in the establishment of visual callosal connections. *Science (New York, N.Y.)*, 212(4496), 824–827.
- Ipsiroglu, O. S., Wind, K., Hung, Y.-H. A., Berger, M., Chan, F., Yu, W., Stockler, S., & Weinberg, J. (2019). Prenatal alcohol exposure and sleep-wake behaviors: Exploratory and naturalistic observations in the clinical setting and in an animal model. *Sleep Medicine*, 54, 101–112.
- Jouvet, M. (1965). Locus coeruleus et sommeil paradoxical. *C R Soc Biol (Paris)*, 159, 895–899.
- Kelly, S. J., Goodlett, C. R., Hulsether, S. A., & West, J. R. (1988). Impaired spatial navigation in adult female but not adult male rats exposed to alcohol during the brain growth spurt. *Behavioural Brain Research*, 27(3), 247–257.
- Khazipov, R., Sirota, A., Leinekugel, X., Holmes, G. L., Ben-Ari, Y., & Buzsáki, G. (2004). Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature*, 432(7018), 758–761.
- Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., & Reppert, S. M. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, 98(2), 193–205.
- \*Laposky, A. D., Bass, J., Kohsaka, A., & Turek, F. W. (2008). Sleep and circadian rhythms: Key components in the regulation of energy metabolism. *FEBS Letters*, 582(1), 142–151.

- Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H., & Mori, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society*, *80*(10), 2587–2587.
- Lippai, D., Bala, S., Petrasek, J., Csak, T., Levin, I., Kurt-Jones, E. A., & Szabo, G. (2013). Alcohol-induced IL-1 $\beta$  in the brain is mediated by NLRP3/ASC inflammasome activation that amplifies neuroinflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, *94*(1), 171–182.
- Loomis, A. L., Harvey, E. N., & Hobart, G. A. (1938). Distribution of disturbance-patterns in the human electroencephalogram, with special reference to sleep. *Journal of Neurophysiology*, *1*(5), 413–430.
- Mazer, C., Muneyyirci, J., Taheny, K., Raio, N., Borella, A., & Whitaker-Azmitia, P. (1997). Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: A possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. *Brain Research*, *760*(1–2), 68–73.
- \*McGinty, D. J., Harper, R. M., & Fairbanks, M. K. (1973). *5-HT- containing neurons: Unit activity in behaving cats*. 267–279.
- Mendez, N., Abarzua-Catalan, L., Vilches, N., Galdames, H. A., Spichiger, C., Richter, H. G., Valenzuela, G. J., Seron-Ferre, M., & Torres-Farfan, C. (2012). Timed maternal melatonin treatment reverses circadian disruption of the fetal adrenal clock imposed by exposure to constant light. *PLoS One*, *7*(8), e42713.
- Moore, R. Y., & Bernstein, M. E. (1989). Synaptogenesis in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrated by electron microscopy and synapsin I immunoreactivity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *9*(6), 2151–2162.
- Moore, R. Y., & Eichler, V. B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*, *42*(1), 201–206.
- Moore, R. Y., & Speh, J. C. (1993). GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neuroscience Letters*, *150*(1), 112–116.

- Moore, R. Y., Speh, J. C., & Leak, R. K. (2002). Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell and Tissue Research*, 309(1), 89–98.
- Morrison, A. R., & Bowker, R. M. (1975). The biological significance of PGO spikes in the sleeping cat. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 35(5–6), Article 5–6.
- Nijhuis, J. G., Prechtel, H. F., Martin, C. B., & Bots, R. S. (1982). Are there behavioural states in the human fetus? *Early Human Development*, 6(2), 177–195.
- Ohta, H., Honma, S., Abe, H., & Honma, K. (2002). Effects of nursing mothers on rPer1 and rPer2 circadian expressions in the neonatal rat suprachiasmatic nuclei vary with developmental stage. *The European Journal of Neuroscience*, 15(12), 1953–1960.
- Olateju, O. I., Bhagwandin, A., Ihunwo, A. O., & Manger, P. R. (2017). Changes in the Cholinergic, Catecholaminergic, Orexinergic and Serotonergic Structures Forming Part of the Sleep Systems of Adult Mice Exposed to Intrauterine Alcohol. *Frontiers in Neuroanatomy*, 11, 110.
- \*Parmeggiani, P. L. (2003). Thermoregulation and sleep. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 8, s557-567.
- Parmelee, A. H., Stern, E., & Harris, M. A. (1972). Maturation of respiration in prematures and young infants. *Neuropadiatrie*, 3(3), 294–304.
- Peng, H., Geil Nickell, C. R., Chen, K. Y., McClain, J. A., & Nixon, K. (2017). Increased expression of M1 and M2 phenotypic markers in isolated microglia after four-day binge alcohol exposure in male rats. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 62, 29–40.
- Peyron, C., Tighe, D. K., van den Pol, A. N., de Lecea, L., Heller, H. C., Sutcliffe, J. G., & Kilduff, T. S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(23), 9996–10015.
- \*Poe, G. R. (2017). Sleep Is for Forgetting. *Journal of Neuroscience*, 37(3), 464–473.

- Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R. E., Thakkar, M., Bjorkum, A. A., Greene, R. W., & McCarley, R. W. (1997). Adenosine: A mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science (New York, N.Y.)*, *276*(5316), 1265–1268.
- Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., 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*(2), 251–260.
- Provencio, I., Rodriguez, I. R., Jiang, G., Hayes, W. P., Moreira, E. F., & Rollag, M. D. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(2), 600–605.
- Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *The Journal of Comparative Neurology*, *145*(1), 61–83.
- Reppert, S. M., & Schwartz, W. J. (1984). Functional activity of the suprachiasmatic nuclei in the fetal primate. *Neuroscience Letters*, *46*(2), 145–149.
- Riley, E. P., Mattson, S. N., Sowell, E. R., Jernigan, T. L., Sobel, D. F., & Jones, K. L. (1995). Abnormalities of the corpus callosum in children prenatally exposed to alcohol. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *19*(5), 1198–1202.
- Roffwarg, H. P., Muzio, J. N., & Dement, W. C. (1966). Ontogenetic development of the human sleep-dream cycle. *Science (New York, N.Y.)*, *152*(3722), 604–619.
- Roth, M., Shaw, J., & Green, J. (1956). The form voltage distribution and physiological significance of the K-complex. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, *8*(3), 385–402.
- Sambo, D., Gohel, C., Yuan, Q., Sukumar, G., Alba, C., Dalgard, C. L., & Goldman, D. (2022). Cell type-specific changes in Wnt signaling and neuronal differentiation in the developing mouse cortex after prenatal alcohol exposure during neurogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*, 1011974.
- \*Saper, C. B., Fuller, P. M., Pedersen, N. P., Lu, J., & Scammell, T. E. (2010). Sleep State Switching. *Neuron*, *68*(6), 1023–1042.

- Semba, K., Reiner, P. B., McGeer, E. G., & Fibiger, H. C. (1988). Brainstem afferents to the magnocellular basal forebrain studied by axonal transport, immunohistochemistry, and electrophysiology in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *267*(3), 433–453.
- Shaffery, J. P., Roffwarg, H. P., Speciale, S. G., & Marks, G. A. (1999). Ponto-geniculo-occipital-wave suppression amplifies lateral geniculate nucleus cell-size changes in monocularly deprived kittens. *Brain Research. Developmental Brain Research*, *114*(1), 109–119.
- Shah, P., Kaneria, A., Fleming, G., Williams, C. R. O., Sullivan, R. M., Lemon, C. H., Smiley, J., Saito, M., & Wilson, D. A. (2023). Homeostatic NREM sleep and salience network function in adult mice exposed to ethanol during development. *Frontiers in Neuroscience*, *17*, 1267542.
- Shearman, L. P., Sriram, S., Weaver, D. R., Maywood, E. S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C. C., van der Horst, G. T., Hastings, M. H., & Reppert, S. M. (2000). Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science (New York, N.Y.)*, *288*(5468), 1013–1019.
- Sherin, J. E., Shiromani, P. J., McCarley, R. W., & Saper, C. B. (1996). Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science (New York, N.Y.)*, *271*(5246), 216–219.
- Shibata, S., & Moore, R. Y. (1987). Development of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, *431*(2), 311–315. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(87\)90220-3](https://doi.org/10.1016/0165-3806(87)90220-3)
- Schenker, S., Yang, Y., Perez, A., Acuff, R. V., Papas, A. M., Henderson, G., & Lee, M. P. (1998). Antioxidant transport by the human placenta. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, *17*(4), 159–167.
- 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*(16), 6231–6236.
- \*Sumova, A., Sladek, M., Polidarova, L., Novakova, M., & Houdek, P. (2012). Circadian system from conception till adulthood. *Progress in Brain Research*, *199*, 83–103.

- Suntsova, N., Szymusiak, R., Alam, M. N., Guzman-Marin, R., & McGinty, D. (2002). Sleep-waking discharge patterns of median preoptic nucleus neurons in rats. *The Journal of Physiology*, 543(Pt 2), 665–677.
- Thomas, J. D., Wasserman, E. A., West, J. R., & Goodlett, C. R. (1996). Behavioral deficits induced by binge-like exposure to alcohol in neonatal rats: Importance of developmental timing and number of episodes. *Developmental Psychobiology*, 29(5), 433–452.
- Tousley, A. R., Deykin, I., Koc, B., Yeh, P. W., & Yeh, H. H. (2025). Prenatal ethanol exposure results in cell-type, age, and sex-dependent differences in the neonatal striatum that coincide with early motor deficits. *eNeuro*, 12(3), ENEURO.0448-24.2025.
- Troese, M., Fukumizu, M., Sallinen, B. J., Gilles, A. A., Wellman, J. D., Paul, J. A., Brown, E. R., & Hayes, M. J. (2008). Sleep fragmentation and evidence for sleep debt in alcohol-exposed infants. *Early Human Development*, 84(9), 577–585.
- Tyler, C. R., & Allan, A. M. (2014). Prenatal alcohol exposure alters expression of neurogenesis-related genes in an ex vivo cell culture model. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 48(5), 483–492.
- Van den Pol, A. N. (1980). The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: Intrinsic anatomy. *The Journal of Comparative Neurology*, 191(4), 661–702.
- van der Horst, G. T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A. P., van Leenen, D., Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H., & Yasui, A. (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 398(6728), 627–630.
- Villablanca, J. (1966). Behavioral and polygraphic study of „sleep" and „wakefulness" in chronic decerebrate cats. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 21(6), 562–577.
- Vitaterna, M. H., King, D. P., Chang, A. M., Kornhauser, J. M., Lowrey, P. L., McDonald, J. D., Dove, W. F., Pinto, L. H., Turek, F. W., & Takahashi, J. S. (1994). Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5159), 719–725.

- Vives, V., Alonso, G., Solal, A. C., Joubert, D., & Legraverend, C. (2003). Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice. *The Journal of Comparative Neurology*, *457*(4), 404–419.
- Webster, H. H., & Jones, B. E. (1988). Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states. *Brain Research*, *458*(2), 285–302.
- Welsh, D. K., Logothetis, D. E., Meister, M., & Reppert, S. M. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, *14*(4), 697–706.
- West, J. R., Hamre, K. M., & Cassell, M. D. (1986). Effects of Ethanol Exposure during the Third Trimester Equivalent on Neuron Number in Rat Hippocampus and Dentate Gyrus. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *10*(2), 190–197.
- Williams, L. M., Martinoli, M. G., Titchener, L. T., & Pelletier, G. (1991). The ontogeny of central melatonin binding sites in the rat. *Endocrinology*, *128*(4), 2083–2090.
- Yamamoto, T., Nakahata, Y., Soma, H., Akashi, M., Mamine, T., & Takumi, T. (2004). Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC Molecular Biology*, *5*, 18.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M., & Tei, H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science (New York, N.Y.)*, *288*(5466), 682–685.
- Yehuda, S., Sredni, B., Carasso, R. L., & Kenigsbuch-Sredni, D. (2009). REM sleep deprivation in rats results in inflammation and interleukin-17 elevation. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, *29*(7), 393–398.
- Yellon, S. M., & Longo, L. D. (1987). Melatonin rhythms in fetal and maternal circulation during pregnancy in sheep. *The American Journal of Physiology*, *252*(6 Pt 1), E799-802.

- Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepk, S. M., Hong, H.-K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M., & Takahashi, J. S. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(15), 5339–5346.
- Zhou, F. C., Sari, Y., Zhang, J. K., Goodlett, C. R., & Li, T. (2001). Prenatal alcohol exposure retards the migration and development of serotonin neurons in fetal C57BL mice. *Brain Research. Developmental Brain Research*, *126*(2), 147–155.