

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

Katedra fyziologie živočichů

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Diplomová práce

**Modulace cirkadiánního rytmu v produkci melatoninu člověka navozenými  
experimentálními světelnými podmínkami**

**The modulation of the circadian rhythm in melatonin production in human  
induced by experimental lighting conditions**

Bc. Kateřina Skálová

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

Praha, 2018

**Poděkování:**

Chtěla bych moc poděkovat své školitelce Doc. RNDr. Zdeňce Bendové, Ph.D. za nesmírnou ochotu, trpělivost a cenné rady. Stejně velké poděkování patří kolektivu laboratoře biorytmů na katedře fyziologie PřF UK za jejich velkou ochotu a podporu. Další poděkování také chci věnovat mé rodině a blízkému okruhu přátel za velkou podporu a povzbuzování.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu.

V Praze dne

## **Abstrakt**

Cirkadiánní systém řídí načasování většiny fyziologických funkcí a chování s periodou přibližně 24 hodin. Střídání světla/tmy seřizuje cirkadiánní rytmus s přesnou délkou slunečního dne. Informace o světle jsou přenášeny přes ipRGC v sítnici, které mají maximální citlivost na modrou část světla (vlnová délka 460-480 nm). Zachycené informace pokračují k hlavním cirkadiánním hodinám nacházejícím se v suprachiasmatických jádrech. Tyto hodiny regulují syntézu neurohormonu melatoninu v epifýze, jehož vysokou noční hladinu lze v noci rychle potlačit světlem. Hlavním cílem této studie bylo ověřit účinnost emitátorů modrého a zeleného světla potenciálně využitelných v klinické praxi na potlačení hladiny melatoninu v noci, a poskytnout tak základní informaci o tom, jak tato zařízení ovlivňují cirkadiánní systém. Výsledky ukazují, že světlo vyzařované emitátorem má potenciál snížit hladinu melatoninu u většiny subjektů s vyšší účinností v modrém rozsahu.

Klíčová slova: cirkadiánní rytmus, melatonin, světelný pulz, oční víčka, modré a zelené světlo

## **Abstract**

The circadian system controls the timing of most of the physiological functions and behaviour within approximately 24 hours period. The light/dark cycle aligns this circadian period with the exact length of the solar day. Light information is conveyed via ipRGC cells in the retina, with maximum sensitivity in the blue part light (460-480nm wavelength). The information proceeds to the main circadian clocks located in the suprachiasmatic nuclei. This clock regulates the synthesis of neurohormone melatonin in the pineal gland whose high night level can be rapidly downregulated by the light at night. The major aim of this study was to test the effectiveness of the blue or green light-emitting device, potentially utilized in clinical practice, to suppress the night melatonin level and provide thus the first evidence that this device may affect the circadian system. The results show that the light emitted by this device has the potential to lower melatonin levels in most subjects with the higher efficiency in the blue range.

Key words: circadian rhythms, melatonin, light pulse, eyelids, blue and green light

## **Seznam zkratk**

AANAT	Arylalkylanin-N-acetyltransferáza
AD	Alzheimerova demence
Ach	Acetylcholin
AMP	Adenosinmonofosfát
AMPA	$\alpha$ -amino-3hydroxy-5methyl-4-isoxazolepropionová kyselina
aMT6S	6-sulfatoxymelatonin
<i>Bmal/BMAL</i>	z angl. Brain and muscle Amt-like gen/protein
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CCT	Teplota chromatičnosti (z angl. correlated color temperature)
<i>Clock/CLOCK</i>	z angl. Circadian Locomotor Output Cycles Kaput gen/protein
CREB	calcium/cAMP response element binding protein
<i>Cry1,2/CRY 1,2</i>	Cryptochrome 1,2 gen/ protein
CSF	Cerebrospinální tekutina (z angl. cerebrospinal fluid)
DLMO	Dim light melatonin onset
DSPS	z angl. Delayed Sleep Phase Syndrome
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
GABA	Kyselina gamaaminomáselná
GHT	Genikulohypothalamický trakt
HIOMT	Hydroxyindol-O-methyltransferáza
IBL	Immuno-Biological Laboratories Inc.
ICER	Inducible cAMP early repressor
ipRGC	z angl. intrinsically photoreceptive retinal ganglion cells
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
MT1,2	Melatoninový receptor 1,2
NA	Noradrenalin
NaOH	Hydroxid sodný
NMDA	N-metyl D-aspartát
NPY	Neuropeptid Y
NSB	Nespecifická vazba protilátky
NUDZ	Národní ústav duševního zdraví
OPN	Olivární pretektální jádro (z angl. nucleus)
Opn4	Opsin melanopsin

P	Fosfát
PACAP	z anlg. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide
<i>Per1,2,3</i> / PER 1,2,3	Period 1,2,3 gen/protein
PAK	Proteinkináza A
PKC	Proteinkináza C
PN	Parkinsonova nemoc
PRC	Fázově responzní křivka (z angl. phase response curve)
RHT	Retino hypotalamický trakt
RIA	Radioimunologická analýza
SCG	Superior cervical ganglion
SCN	Suprachiasmatická jádra
TRP	z angl. transient receptor potential

# Obsah

<b>1.</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Literární přehled</b> .....	<b>2</b>
	<b>2.1. Cirkadiální systém</b> .....	<b>2</b>
	2.1.1. Molekulární podstata .....	2
	2.1.2. Synchronizace světlem .....	3
	2.1.3. SCN .....	4
	2.1.4. Epifýza .....	5
	<b>2.2. Melatonin</b> .....	<b>5</b>
	2.2.1. Chemická struktura a syntéza .....	5
	2.2.2. SCN a ovlivnění syntézy melatoninu .....	8
	<b>2.3. Světlo a jeho parametry</b> .....	<b>10</b>
	2.3.1. Barva.....	10
	2.3.2. Intenzita .....	11
	<b>2.4. Sítnice oka a melanopsin</b> .....	<b>11</b>
	<b>2.5. Lidské biorytmy a melatonin</b> .....	<b>13</b>
	2.5.1. Účinek světla na hladinu melatoninu u lidí .....	13
	2.5.2. Narušení cirkadiálních rytmů .....	16
	2.5.3. Diabetická retinopatie.....	17
	2.5.4. Lidská víčka.....	18
	2.5.5. Chronoterapie .....	18
<b>3.</b>	<b>Cíle diplomové práce</b> .....	<b>19</b>
<b>4.</b>	<b>Metodický přístup</b> .....	<b>20</b>
	4.1. Základní informace.....	20
	4.2. Účastníci studie .....	20
	4.3. Emitátor světla.....	21
	4.4. Průběh odběrů.....	21
	4.5. Odběr vzorků .....	22
	4.6. Radioimunologické stanovení profilu hladiny melatoninu .....	22

4.7. Postup při stanovení koncentrace melatoninu .....	22
4.8. Analýza dat .....	24
4.9. Statistické zpracování dat .....	25
<b>5. Výsledky .....</b>	<b>25</b>
5.1. Pilotní pokus .....	25
5.2. Pokles hladiny melatoninu po modrém kontinuálním světle .....	26
5.3. Pokles hladiny melatoninu po modrém intermitentním světle .....	29
5.4. Pokles hladiny melatoninu po zeleném kontinuálním světle .....	32
<b>6. Diskuse.....</b>	<b>39</b>
<b>7. Závěr.....</b>	<b>43</b>

# 1. Úvod

Organismy žijící na Zemi jsou ovlivněny neustále se měnícími podmínkami v prostředí. Aby mohly na tyto podmínky správně reagovat, vyvinul se u nich systém řídící správné načasování jejich fyziologických funkcí a chování, tzv. cirkadiánní systém. Toto načasování probíhá rytmicky a opakuje se s periodou přibližně 24 hodin. Nejzásadnější vliv na tento systém má rotace Země, která vyvolává střídání dne a noci. Informace o světle je zachycena tzv. ipRGC (intrinsically photoreceptive retinal ganglion cells) buňkami v sítnici, které mají maximální citlivost k modré části světelného spektra tj. k vlnové délce 460-480nm. Retinohypothlamičtý trakt (RHT) pak převádí impulsy z těchto buněk a přenáší je do centra biologických hodin, které se nachází suprachiasmatických jádrech (SCN) a seřizuje jejich fázi s vnějším časem. SCN reguluje syntézu neurohormonu melatoninu v epifyze, který se uplatňuje jako vnitřní synchronizátor cirkadiánních rytmů v periferních orgánech a cyklického střídání spánku a bdění. Světlo v noci navíc okamžitě snižuje produkci melatoninu, zvyšováním aktivity buněk SCN a tím jejich inhibičního působení na regulační dráhu syntézy melatoninu. Tohoto efektu lze s výhodou využít pro rychlé posouzení účinku různých světelných zdrojů na cirkadiánní systém.

Účinek světla na cirkadiánní systém závisí na přesném načasování i délce světelné stimulace. V této studii jsme testovali účinnost světelných emitátorů, zařízení potenciálně využitelných v klinické praxi, na noční hladinu melatoninu u člověka.



## 2. Literární přehled

### 2.1. Cirkadiánní systém

Cirkadiánní systém je schopen pracovat autonomně a vytvářet tzv. volně běžící rytmy s periodou kratší či delší než 24 hodin, pokud nezískává synchronizační informace z vnějšího prostředí. Endogenní perioda rytmů fyziologických procesů a chování řízená cirkadiánními hodinami, se liší napříč všemi druhy. U člověka byla zjištěna délka vnitřní periody v rozpětí okolo 24,2 – 25 hodin (Czeisler et al., 1999).

Pro organismus je proto důležité být synchronizován s vnějším prostředím, což umožňuje adekvátně a s předstihem reagovat na příslušné změny v okolí. Synchronizačními stimuly mohou být pohybová aktivita, přijímání potravy a další podněty, ale majoritní synchronizační působení má pro organismus světlo, které se mění v závislosti na denní či roční době (Wever, et al., 1993; Sulzman, et al., 1977). Důsledek působení světla na cirkadiánní systém a jeho plasticitu, závisí na délce expozice světelnému impulzu, fyzikálních vlastnostech světla, ale i době jeho působení. Cirkadiánní systém plasticky reaguje na světlo působící v noci. Světlo v začátku noci způsobuje fázové zpoždění a světlo na konce noci způsobuje fázové předběhnutí (Damiola et al., 2000).

#### 2.1.1. Molekulární podstata

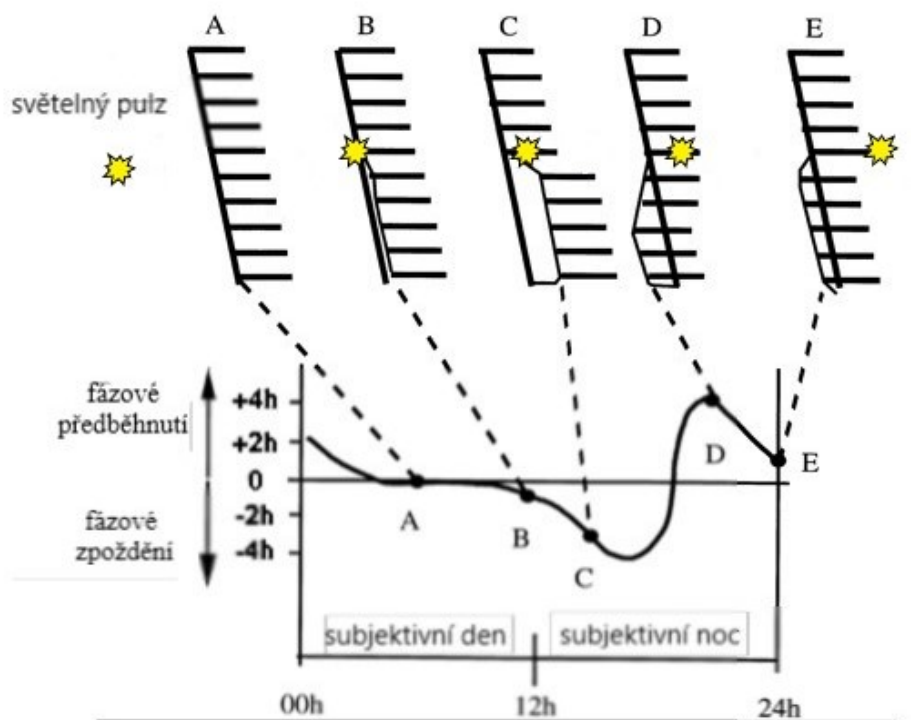
Podstata generování cirkadiánních rytmů spočívá v rytmické expresi hodinových genů, které mezi sebou vytvářejí zpětnovazebné transkripčně-translační smyčky, opakující se přibližně ve 24-hodinových cyklech. Hlavními hodinovými geny jsou *Period* a jeho homology (*Per1*, *Per2*, *Per3*), *Cryptochrom* (*Cry1*, *Cry2*), dále *Bmal1* a *Clock*. Proteiny těchto genů vytvářejí heterodimer CLOCK/BMAL1, který se váže na E-boxy promotorů genů *Per* a *Cry*. Vzniklé proteiny PER a CRY, jsou translokovány do jádra a inhibují aktivitu CLOCK/BMAL1 a tím transkripci svých genů (Udaka et al., 1994; Gekakis et al., 1998; Ye et al., 2011)

Hladina mRNA genů *Per* a *Cry* je během dne vysoká a během noci dochází k jejímu poklesu. Hladina proteinů je opožděná vůči hladině mRNA a je vysoká během noci. Dochází tak, k vymezení tzv. subjektivního dne s vysokou hladinou mRNA a tzv. subjektivní

noční s vysokou hladinou proteinu (Miyamoto and Sancar, 1998). Tyto termíny se používají pro označení fáze cirkadiálních hodin běžících ve stálé tmě. Geny *Per1*, *Per2* jsou indukované působením světelného impulsu v brzké a pozdní subjektivní noci. Expresí genu *Per2* reaguje na světelný pulz rychleji než *Per1*, signifikantní indukce exprese je pozorována již 30 – 60 minut po aplikaci světelného pulzu, ale pouze po světelném pulsu v první polovině noci (Zylka et al., 1998).

### 2.1.2. Synchronizace světlem

Cirkadiální systém je plasticky ovlivňován světlem a tmou. Fázově-responzní křivka (PRC – z angl. phase response curve) zaznamenává velikost a směr fázového posunu v závislosti na době působení synchronizátoru (obr. 1). Může být vynesena pro světelný pulz, ale i pro nesvětelné typy synchronizátorů.



Obr. 1 Upraveno podle (Moore et al., 1982), Fázově-responzní křivka znázorňuje působení světelného pulzu na změny fáze během subjektivního dne a noci. Osa x označuje 24 hodinový interval. Na ose y je vyznačeno v kladných hodnotách fázové předběhnutí a v záporných hodnotách fázové zpoždění. Bod A popisuje působení světelného pulzu během subjektivního dne, kdy nevytváří žádný fázový posun. Jakmile působí světelný pulz během brzké subjektivní

*noci (bod B a C) dochází k fázovému zpoždění. Působí-li světelný pulz během pozdní subjektivní noci, dochází k fázovému předběhnutí.*

Lidská PRC se výrazně neliší od jiných druhů, s výjimkou rozdílné intenzity pro vyvolání fázového posunu (u člověka je potřeba působit větší intenzitou než u animálních modelů). Lidský cirkadiánní systém je citlivý na světlo stejně tak jako ostatní denní organismy (Minors et al., 1991).

### 2.1.3. SCN

U savců je hlavní cirkadiánní pacemaker uložen v SCN, ležícím v anteriorním hypotalamu na bázi třetí mozkové komory nad optickým chiasmatem. Je to struktura, která snadno přijímá informace o světle zachycené sítnicí a vedené prostřednictvím monosynaptického RHT (Stephan and Zucker, 1972; Moore et al., 2002). Jádra SCN jsou tvořena asi 20 000 neurony. Tyto neurony generují přibližně 24 hodinový endogenní rytmus v elektrické aktivitě, genové expresi i metabolismu. Periodické působení světla ovlivňuje aktivitu buněk v SCN, nastavuje endogenní periodu na přesných 24 hodin a synchronizuje fázi cirkadiánních rytmů organismu se solárním dnem. Tím umožňuje SCN poskytovat přesné časové informace prostřednictvím neurálních a humorálních signálů každé buňce v těle. Díky tomu se mohou periferní oscilátory a fyziologické procesy živých organismů synchronizovat s vnějšími podmínkami jako celek (Abrahamson and Moore, 2001; Guo et al., 2006).

SCN se skládá morfologicky i funkčně z dorsomediální a ventrolaterální části, která přijímá světelné informace vedené přes RHT prostřednictvím neurotransmiteru glutamátu, který se váže na AMPA a NMDA receptory (Shinohara et al., 1993).

Do SCN vedou i nepřímé informace o světle skrze genikulohypothalamický trakt (GHT), který vede z intergenikulárního listku talamu přímo do ventrolaterální části SCN, kde se vylévá neuropeptid Y a kyselina  $\gamma$ -aminomáselná (GABA) (Shinohara et al., 1993; Morin and Blanchard, 2001; Moore et al., 2002).

#### 2.1.4. Epifýza

Epifýza je důležitá endokrinní žláza, která je součástí mezimozku. Tato žláza je kryta vazivovým pouzdem a skládá se z nemyelinizovaných nervových vláken, neurogliových buněk typu astrocytů a hlavních buněk, pinealocytů s cytoplazmatickými výběžky v blízkosti fenestrováných kapilár. Vzhled pinealocytů se mění v průběhu denní doby nebo i věku či reprodukčním období organismu (Tapp and Huxley, 1972). Epifýza je separovaná od hematoencefalické bariéry a je bohatě krevně zásobena.

Epifýza produkuje hormon melatonin, jehož syntéza je regulovaná signály z SCN. Světlo je také důležitým regulátorem funkce epifýzy. Epifýza ptáků, plazů, obojživelníků, ale i ryb je schopná přímo registrovat dopadající světlo, je tedy přímo smyslovým orgánem. U savců není epifýza schopna přímé fotorecepce, tuto funkci nahradila retina. Savčí epifýza plní funkci výhradně jako sekreční orgán (Reuss and Schroder, 1987).

## 2.2. Melatonin

Melatonin (N-Acetyl-5-methoxytryptamin) je důležitý neurohormon, který ovlivňuje procesy imunity, kardiovaskulární systém, spánek a uplatňuje se jako časový ukazatel pro synchronizaci cirkadiánních rytmů, a to nejen v mozku, ale i v periferních orgánech (Lerner and al., 1958; Maestroni, et al., 1986; Satake et al., 1991; Carrillo-Vico et al., 2004). Melatonin produkovaný epifýzou lze považovat za významný endogenní synchronizátor (Pevet and Challet 2011). Jeho syntéza byla popsána i v mnoha dalších buňkách či orgánech, např. v sítnici, kostní dřeni ale také gastrointestinální soustavě (Tosini and Menaker, 1998; Conti et al., 2000).

Melatonin má lipofilní povahu, díky tomu se snáze přenáší v rámci ostatních tělesných tkání. Působí prostřednictvím receptorů MT1 a MT2, které patří mezi inhibiční G-proteiny (Liu et al., 1997). Melatoninové receptory jsou exprimované v mnoha periferních i neurálních tkáních, kde může hormon působit (Drew et al., 2001).

#### 2.2.1. Chemická struktura a syntéza

Julius Axelrod popsal v roce 1974 biosyntézu melatoninu v pinealocytech, buňkách které jsou součástí epifýzy (Axelrod, 1974).

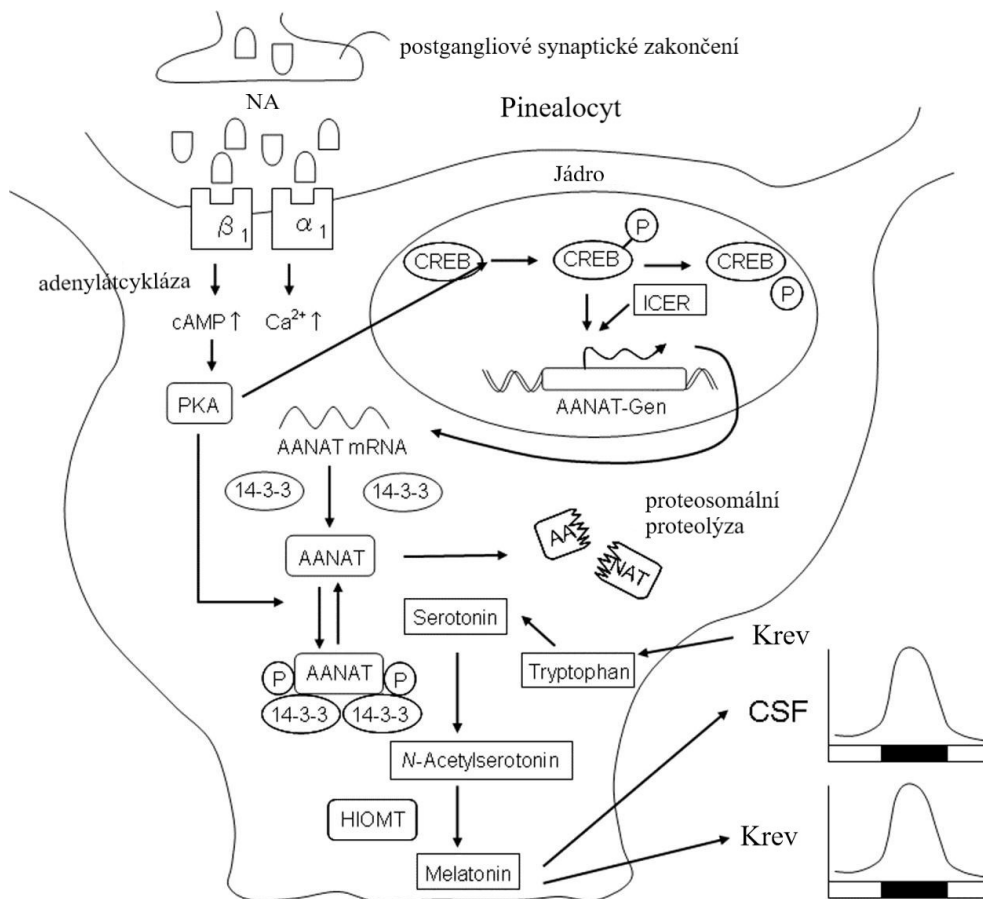
Prekurzorem hormonu je aminokyselina tryptofan, který je vychytáván z krve. V epifýze je tato aminokyselina hydroxylována na 5-hydroxytryptofan, pomocí enzymu tryptofan-5-hydroxyláza. Následně dochází k dekarboxylaci prostřednictvím aromatické karboxylázy na serotonin. Dalším krokem je N-acetylace serotoninu prostřednictvím enzymu arylalkylalanin-N-acetyltransferázou (AANAT) na N-acetylserotnin. Enzym AANAT řídí načasování biosyntézy melatoninu a jeho hladina i aktivita stoupá v nočních hodinách. Posledním krokem v syntéze tohoto hormonu je přeměna na melatonin. Přidání methylskupiny v poloze 5-hydroxyskupiny je katalyzováno enzymem hydroxyindol-O-methyltransferázou (HIOMT), (Axelrod and Wurtman, 1965; Bernard et al., 1997; obr. 2).

Melatonin není v epifýze dlouho skladován a je rychle uvolňován do oběhu. První distribuční poločas melatoninu je 2 minuty, následuje druhý během 20 minut (Fourtillan et al., 2000).

Hladina melatoninu je v mozkomíšním moku násobně větší než v krvi. Tato koncentrace se snižuje nepřímo úměrně s rostoucí vzdáleností od epifýzy (Skinner and Malpoux, 1999). Hladina melatoninu má v krvi krátký poločas, a tak odráží přesně produkci melatoninu epifýzou. Biologický poločas rozpadu melatoninu nastává během pár minut, ale celková eliminace z krevní plazmy trvá okolo 20 až 50 minut (Waldhauser et al., 1984).

Degradace většiny melatoninu probíhá hlavně v játrech, kde se nejdříve hydroxyluje pomocí cytochromu P450 a poté konjuguje se sulfátem a vzniká 6-sulfatoxymelatonin (aMT6S), který je následně vyloučen močí. Melatonin může být metabolizován i neenzymaticky ve všech buňkách, ale také extracelulárně pomocí volných radikálů a oxidantů. Je konvertován na cyklický 3-hydroxymelatonin, při zachycení dvou hydroxylových radikálů (Hayashy and Hirata, 1974; Tan et al., 1998;).

Syntéza melatoninu má cirkadiánní rytmus s nízkou hladinou během dne a vysokou během noci. Tento cirkadiánní endogenní rytmus přetrvává napříč organismy, nezávisle na jejich denní nebo noční aktivitě (Vivanco et al., 2007).



Obr. 2 Syntéza melatoninu v pinealocyty, upraveno dle (Reiter et al. 2011).

Postgangliová sympatická nervová vlákna inervující pinealocyt jsou aktivována regulačními signály z SCN. Uvolňují norepinefrin (norepinefrin), který se váže na  $\beta_1$  a  $\alpha_1$  receptory, což vede ke zvýšení hladin intracelulárních cyklických AMP (cAMP) a  $Ca^{2+}$ . Zvýšená hladina cAMP stimuluje protein kinázu A (PKA), aktivuje CREB, dochází k fosforylaci a navázání na promotor AANAT. PKA pozitivně ovlivňuje aktivitu enzymu AANAT konvertující serotonin na N-acetylserotonin. N-acetylserotonin je pomocí hydroxyindol-O-methyltransferázy (HIOMT) převeden na melatonin. Tento proces probíhá v nočních hodinách a melatonin je po syntéze sekretován do krve a mozkomíšního moku. Následně dojde ke zvýšení mRNA AANAT. S proteiny 14-3-3 vytváří AANAT reverzibilní komplex, který je vytváří ochranu před proteolýzou. (CREB = calcium/cAMP response element binding protein; ICER = inducible cAMP early repressor; P = fosfát)

### 2.2.2. SCN a ovlivnění syntézy melatoninu

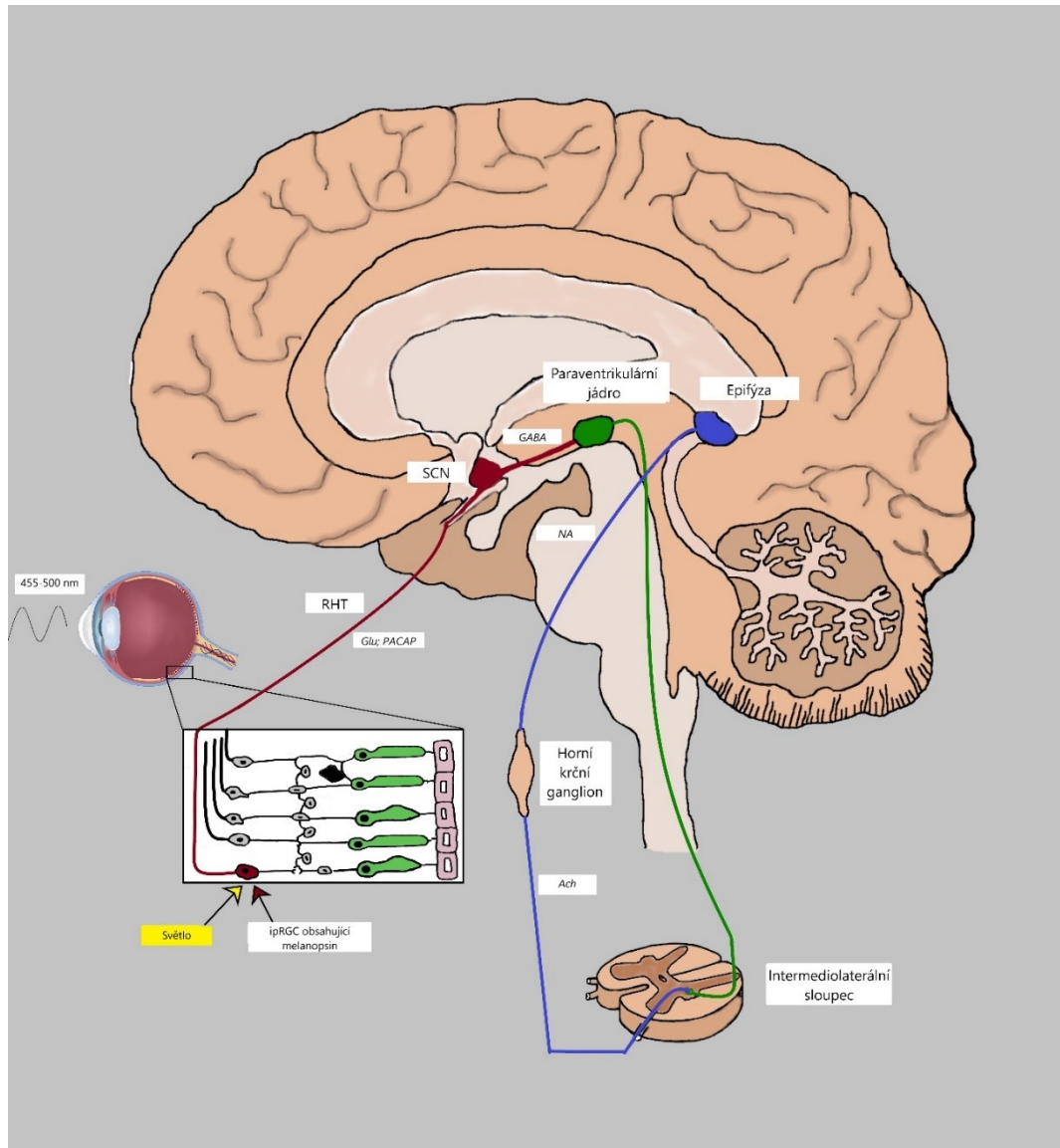
Světelná informace je nejprve zachycena první vrstvou gangliových buněk - ipRGC. Tyto speciální světločivné gangliové buňky jsou součástí retiny spolu s tyčinkami a čípkami (viz. kap. 2.4.). Axony ipRGC vytvářejí monosynaptický trakt – RHT, který převádí impulzy z těchto buněk do SCN, prostřednictvím neurotransmiterů glutamátu a PACAP (angl. zkr. pituitary adenylate cyclase-activating peptide). Světelná informace může tak fázově posunout endogenní oscilátor v SCN a seřadit ho s vnějším prostředím (Castel et al., 1993; Chen et al., 1999; Berson et al., 2002).

SCN ovlivňuje funkci epifyzy prostřednictvím multisynaptické dráhy, která začíná GABAergní projekcí do paraventriculárního jádra hypothalamu (PVN). Dráha pokračuje z PVN glutamatergní projekcí do intermediálního sloupce míchy (IML), kde dochází k přepojení a dráha pokračuje do nadřazeného krčního gangliomu (SCG). Postgangliové neurony SCG vedou k epifyze, kde během noci dochází k výlevu noradrenalinu (NA) ze synaptických zakončení a jeho vazbě na  $\beta$ -adrenergní receptory pinealocytů. Během dne, kdy je elektrická aktivita SCN vysoká, GABAergní inhibice paraventriculárního jádra je silná, ustává tonická aktivace IML a uvolňování NA je potlačeno. V noci navázáním NA na  $\beta$ -adrenergní receptory, dochází ke zvýšení hladiny cAMP (Karasek et al., 1978). Zvýšená hladina cAMP stimuluje PKA, která aktivuje transkripci enzymu AANAT, enzymu, který reguluje rychlost syntézy melatoninu (Drijfhout et al., 1996; Kalsbeek et al., 2000), obr. 3. Tento proces probíhá v nočních hodinách a melatonin je po syntéze sekretován do krve a mozkomíšního moku (Hickman et al., 1999; Teclemariam et al., 1999; Gerdin et al. 2004). V noci postgangliová sympatická nervová zakončení uvolňují nejen NA, ale i neuropeptid Y (NPY). NPY zřejmě posiluje odpověď NA.

V případě působení světelného pulzu v noci, dochází ke zvýšení elektrické aktivity v SCN, v důsledku toho je zvýšená i inhibiční neurotransmise do PVN a dochází k zastavení syntézy melatoninu stejně jako je tomu ve světelné části dne (Kalsbeek et al., 2000; Perreau-Lenz et al., 2003; Isobe and Nishino, 2004).

Uvolněný melatonin působí zpětně na SCN a moduluje oscilace prostřednictvím melatoninových receptorů MT1 a MT2. Aktivací těchto receptorů dochází k regulaci vstupních i výstupních cirkadiálních signálů. Studie dokazují, že receptor MT1 je zodpovědný za inhibici činnosti neuronů SCN. Účinek je možný pouze v době, kdy je cirkadiální systém nejcitlivější na působící světlo (začátek a konec subjektivní noci), (Benloucif et al., 1999; Hunt et al., 2001). Aktivace receptoru MT2 zprostředkovává fázové

posuny cirkadiálních rytmů v rámci SCN stimulací PKA. Schopnost melatoninu vytvářet změny a ovlivňovat fázové posuny má potenciál pro terapeutické využití (např. potlačení symptomů jet-lag), (Nosjean et al., 2000; Gerdin et al., 2004; Reppert and Ebisawa, 1994).



*Obr. 3 Schéma popisující regulační dráhu pro syntézu melatoninu (nakresleno vlastní rukou)  
Světelná informace je do SCN vedena RHT, který na synapsi s buňkami SCN vylévá neurotransmitery glutamát a PACAP. SCN je touto cestou synchronizováno s denním světelným cyklem. Odtud se signál přenáší k paraventriculárnímu jádru prostřednictvím inhibičního neurotransmiteru GABA. Dále je dráha vedena přes intermediální sloupec míchy,*



*kde dochází k přepojení a dráha pokračuje přes horní krční ganglion, kde je prostřednictvím noradrenalinu působícího přes  $\beta$ -adrenergní receptory řízena funkce epifyzy a sekrece hormonu melatoninu.*

## **2.3. Světlo a jeho parametry**

Elektromagnetické záření v rozmezí 380-780 nm je zachytitelné lidskými fotoreceptory oka a nazývá se tak viditelné spektrum. Světlo patří mezi nejdůležitější a nejsilnější podněty regulující cirkadiánní systém a neuroendokrinní odpovědi. Jaký dopad bude mít světlo na organismus, závisí na načasování impulzu, vlnové délce světla a jeho intenzitě (Brainard et al., 2015). Rozdíly v parametrech působícího světla mají výsledný vliv na odpověď organismu. Zásadní fyziologické rozdíly je možné definovat pro určité světelné spektrum. Zjistilo se, že jednotlivé složky viditelného světla mají rozdílný účinek. Největší účinek pro potlačení hladiny melatoninu i synchronizaci cirkadiánních rytmů má modrá krátkovlnná složka světla o vlnové délce 446 - 477 nm (Brainard et al., 2015).

### *2.3.1. Barva*

Jako první zaznamenal a pojmenoval základních sedm barev spektra Isaac Newton roku 1704. Spektrum slunečního světla se mění v průběhu dne v důsledku rozdílného průchodu fotonů atmosférou následkem změny postavení Země ke Slunci vlivem rotace. Barva světla se určuje pomocí vlnové délky (nm) nebo označením světelných zdrojů podle tzv. „teploty chromatičnosti“ vyjádřené v Kelvinech (CCT – correlated color temperature). Například světlo za jasného dne dosahuje 6500 K. Za nejúčinnější spektrum pro synchronizaci cirkadiánního systému a potlačení tvorby melatoninu je považován rozsah vlnových délek 446 až 477 nm. Některé studie potvrzují, že světlo o vlnové délce 460 nm má přibližně dvakrát větší účinek na potlačení hladiny melatoninu než světlo o vlnové délce 420 nm. Světlo o vlnové délce 600 nm a výše již nepotlačuje hladinu melatoninu vůbec. Toto světlo odpovídá červenému spektru (Revell and Skene, 2007; Gooley et al., 2010).

### 2.3.2. Intenzita

Intenzita světla je dalším důležitým parametrem při zkoumání vlivu světla. Obvykle je uváděná v luxech (lux). Tato jednotka určuje osvětlení způsobené světelným tokem 1 lumenu dopadající na plochu o rozloze 1 m<sup>2</sup>. Například sluneční světlo působí na organismus v intenzitě 1000 luxů během zamračeného dne a může dosahovat hodnoty až 100 000 luxů během působení poledního Slunce. Uvnitř budov tato intenzita klesá na pouhých 300 a 500 luxů (Najjar et al., 2014). Zjištění, že jasné světlo (2500 luxů) může potlačit hladinu melatoninu, vedlo k domněnce, že jen světlo o vysoké intenzitě může ovlivnit hladinu melatoninu (Lewy and Wehr. 1980). Potlačení hladiny melatoninu u lidí je méně citlivé než u animálních modelů, později bylo však dokázáno, že pro potlačení hladiny melatoninu je u lidí dostatečné světlo o intenzitě 250-350 nebo 500 luxů (Minneman et al., 1974; Bojkowski et al., 1987; McLain McIntyre et al., 1989). Čím déle, ale trvá působení světla, tím je zapotřebí menší intenzita pro potlačení melatoninu (Brainard et al., 1982; McIntyre et al., 1989; Laakso et al., 1994).

## 2.4. Sítnice oka a melanopsin

Retina je důležitá část oka, která transdukuje energii fotonu na nervový vzruch, šířící se dál do příslušných mozkových center k dalšímu zpracování. Vidění savců můžeme rozdělit na obrazové a neobrazové (cirkadiánní). Obrazové barevné vidění je zprostředkováno třemi druhy čípků, které obsahují opsiny: S čípky – obsahující cyanolab registrující modré, krátkovlnné záření; M čípky - obsahující chlorolab registrující zelené světlo a LW čípky obsahující erytrolab registrující červené; dlouhovlnné záření. Pro skotopické vidění se v tyčinkách vyskytuje barvivo rhodopsin ( $\lambda$  max - nejsilnější fotonová absorpce okolo 500 nm). Cirkadiánní vidění je zprostředkované zvláštním typem světločivných gangliových buněk obsahující pigment melanopsin (obr. 4). Tyčinky reagují rychleji na světelný stimul (50 milisekund) než ipRGC (10 sekund), (Berson et al., 2002; Cao et al., 2007)

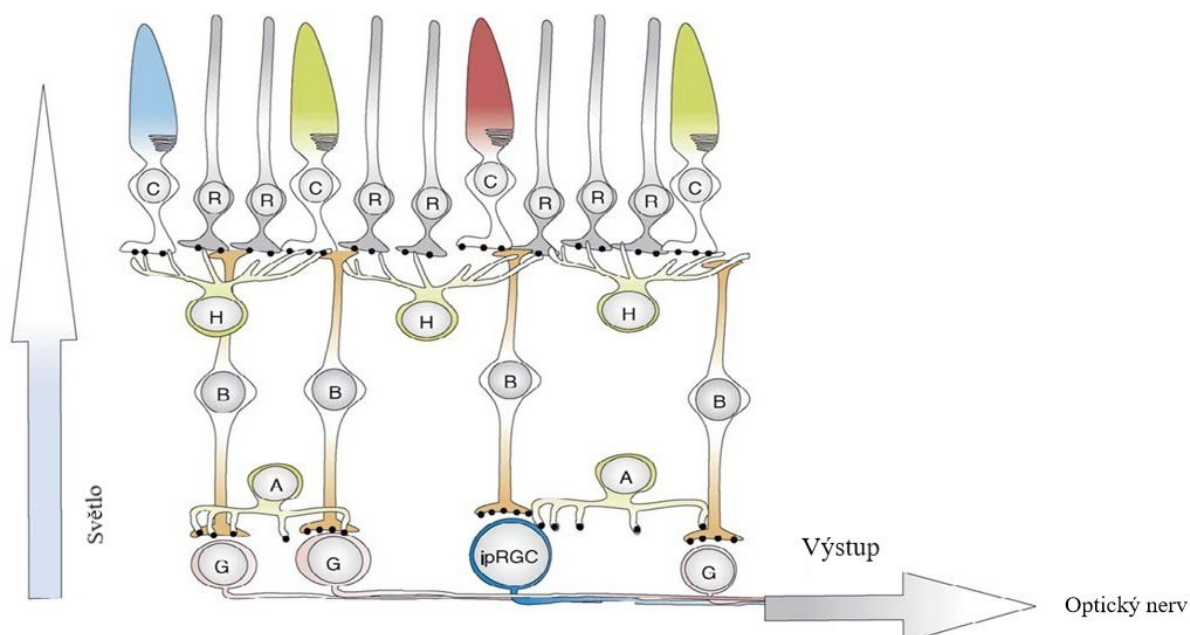
Opsin melanopsin (Opn4) byl nalezen roku 1998 v kožních melanoforech, světlo-senzitivních buňkách žáby *Xenopus laevis* (Provencio et al., 1998). Později byl detekován v ipRGC (Ignacio Provencio et al. 2000). Tyto buňky obsahující melanopsin mají maximální citlivost k modré části světelného spektra tj. k vlnové délce cca 450-480nm (Brainard et al., 2001; Newman et al., 2003). Gangliové buňky obsahující melanopsin představují asi 2% z celkového počtu gangliových buněk (Hattar et al., 2016). Melanopsin zprostředkovává

neobrazové vidění i přes absenci tyčinek a čípků. (Panda et al., 2003; Provencio et al., 2000). U potkanů s genetickou delecí melanopsinu (*Opn4<sup>-/-</sup>*) je zjištěno, že dochází ke snížení odpovědi fázových posunů po světelném pulsu, přesto zůstává zachovaná určitá citlivost cirkadiálního systému na světlo. Tyto výsledky dokazují, že ačkoli melanopsin je důležitý pro plnou synchronizaci cirkadiálních rytmů, ipRGC spolupracují s tyčinkami a čípků (Panda et al., 2003).

Světločivné ipRGC vedou svými axony do SCN a vytvářejí RHT. Nervová zakončení RHT s buňkami SCN uvolňují aminokyselinu glutamát a neuropeptid PACAP (Hannibal et al., 2001). Tyto neurotransmitery hrají roli ve světle indukované expresi genů a posunu cirkadiálního rytmu. Svými axony zasahují také do oblasti středního mozku nazývané olivární pretektální jádro (OPN), které zprostředkovává behaviorální odpověď na světlo – pupilární reflex (Lucas et al., 2003; Hu et al., 2013; Hattar et al., 2016).

Doposud bylo identifikováno 5 typů ipRGC buněk, které se odlišují svými morfologickými i fyziologickými vlastnostmi (Hu et al., 2013). Tyto gangliové buňky jsou na příchozí světelný podnět 3 – 10 vteřin latentní, na rozdíl od tyčinek nebo čípků, které předávají informaci v podobě nervového vzruchu téměř ihned (Melyan et al., 2005).

Fotosenzitivní opsiny včetně melanopsinu jsou heterotrimerními receptory spřaženými s G-proteiny (Fredriksson et al., 2003). Dopadající foton je absorbován *cis* retinaldehydovým chromoforem. Dochází ke konformační změně *trans*-retinaldehyd, která spouští signální kaskádu G-proteinů. V případě melanopsinu dochází k aktivaci PKC (proteinkináza C) a modulaci kanálu TRP, který zvýší propustnost pro  $Ca^{2+}$  a  $Na^{+}$  a dochází k následné depolarizaci. Světlo na rozdíl od tyčinek a čípků vyvolává u ipRGC depolarizaci (Newman et al., 2003; Melyan et al., 2005; Peirson et al., 2007).



Obr. 4 Stavba sítnice, upraveno podle (Vandewalle, Maquet, and Dijk 2009).

Sítnici obratlovců tvoří tyčinky (R – rods) a čípky (C – cones), které zprostředkovávají skotopické a fotopické vidění. Laterální spoje mezi těmito fotoreceptory a bipolárními buňkami tvoří amakrinní buňky (A) a horizontální buňky (H), které působí inhibičně. Fotopigment melanopsin je součástí gangliových buněk ipRGC, která tvoří asi 2% populace všech gangliových buněk.

## 2.5. Lidské biorytmy a melatonin

### 2.5.1. Účinek světla na hladinu melatoninu u lidí

Začátek noční sekrece melatoninu je využíván v experimentech i klinické praxi jako marker fáze cirkadiálního systému (Lewy and Sack, 1989). Tzv. hodnota DLMO (dim light melatonin onset) určuje hodinu, kdy se začíná zvyšovat hladina melatoninu nad úroveň denní hladiny, obvykle, kdy překročí hodnotu 10 pg/ml ve slinách a 5 pg/ml v krevní plazmě. Za fyziologické rozpětí DLMO se považuje 19:30 až 22:00, tj. přibližně dvě hodiny před subjektivní ospalostí. DLMO může být využit jako spolehlivý marker cirkadiální fáze u pacientů s poruchami spánku nebo s jinými nemocemi, u kterých se předpokládá narušení synchronizace cirkadiálního systému. Dle DLMO je také možné optimalizovat dobu

podávání léčiv, pokud se mění jejich účinnost v cirkadiánním rytmu (Lewy and Sack, 1989; Burgess et al., 2010).

Melatonin je sekretovaný rytmicky v noci, ale jeho syntéza může být narušena či modulována světlem. Světlo ovlivňuje syntézu melatoninu třemi způsoby: 1) potlačením syntézy melatoninu expozicí světla v noci, 2) fázovým posunem cirkadiánní rytmicity, který se odrazí i posunem melatoninového rytmu, 3) změnami fotoperiody, které mění délku noci a tím i dobu sekrece melatoninu. Světlo během noci může mít tedy dopad podle toho, v jakou dobu působí. Vystavení světlu na začátku nebo na konci noci zpomaluje vzestup, respektive urychluje pokles melatoninu, snižuje tak celkovou hladinu melatoninu syntetizovaného za 24 hodin. Při akutní expozici světlu uprostřed noci i na několika sekund, syntéza a následně hladina melatoninu okamžitě poklesne (McIntyre et al., 1989).

Hladina melatoninu začíná u zdravého člověka stoupat večer v rozpětí mezi 21:00 až 23:00 hodinou, dosahuje vrcholu okolo 24:00 až 03:00 hodiny a poklesu až na základní denní hodnotu dosahuje během 07:00 až 09:00 (Grota et al., 1982; McIntyre et al., 1989). Toto načasování je ovlivněné do značné míry rozdílným chronotypem lidské populace. Chronotypem se označuje lidský cirkadiánní fenotyp vyznačující se odlišnými preferencemi k době aktivity a spánku (Lehnkering and Siegmund, 2007). Chronotyp vychází z drobných odlišností v molekulárním mechanismu cirkadiánních hodin mezi lidmi, která způsobují rozdíly v délce endogenní periody a tím i načasování fyziologických rytmů včetně syntézy melatoninu (Archer et al., 2003; Wirz-Justice et al., 2003; Lack et al., 2009).

Hladina melatoninu se ale mění i v průběhu věku. U dětí do třech měsíců naměříme nejnižší hladinu melatoninu. V pozdějším kojeneckém věku sekrece melatoninu prudce stoupá. Hladina melatoninu dosahuje až 325 pg/ml. Poté s přibývajícím věkem hladiny postupně klesají, a to o 10-15% za desetiletí (Wurtman et al., 1984). U starších lidí je větší výskyt obtíží se spánkem, jako je například nespavost. Jedním z důvodů může být právě nízká hladina melatoninu (Hajak et al., 1995).

První experiment, který potvrdil účinek světla na syntézu melatoninu u lidských subjektů, byl proveden v roce 1980 (Lewy and Wehr, 1980). V této studii bylo použito světlo o vysoké intenzitě 2500 luxů. Následující studie ale ukázaly, že k potlačení melatoninu stačí světlo i s mnohem menší intenzitou (Laakso et al., 1994; Aoki et al., 1998).

Studie u animálních modelů zmiňují, že intenzita světla pro vyvolání fázového cirkadiánního posunu musí být větší, než pro potlačení hladiny melatoninu (Nelson and Takahashi, 1991). K tomuto závěru dospěly také lidské studie (Laakso et al., 1993;

Hashimoto et al., 1996). Bylo zjištěno, že pro ovlivnění lidského cirkadiánního systému a následné vyvolání fázového posunu je za potřeby světlo o intenzitě 500 luxů, zatímco pro ovlivnění a potlačení hladiny melatoninu postačuje světlo o intenzitě pouze 200 luxů (Laakso et al., 1993).

Velmi důležitým prvkem ovlivňujícím odpověď melatoninu na světelný impulz je vlnová délka světla. Ukázalo se, že pro potlačení sekrece nočního melatoninu a fázového posunu melatoninového rytmu je účinnější kratší vlnová délka než dlouhovlnné světlo. Některé studie udávají jako nejúčinnější modrozelené spektrum o 509 nm (Brainard et al., 1993). V současnosti, je ale za nejúčinnější spektrum pro potlačení tvorby melatoninu považován rozsah vlnových délek 450 až 480 nm, odpovídající modrému světlu (Cajochen et al., 2005; Gooley et al., 2010). Při použití vlnové délky 497 nm (odpovídá modro-zelenému světlu) bylo naměřeno 81% snížení hladiny melatoninu (Wright et al., 2004). Výsledky studií dále ukazují, že světlo o vlnových délkách 470 nm (modrá), 497 nm (modrá/zelená) a 525 nm (zelená) vyvolá fázové zpoždění melatoninového rytmu až o 27- 38 min než působení dlouhovlnného světla o vlnové délce 595 nm (žlutá) a 660 nm (červená), (Wright and Lack, 2001; Wright et al., 2004).

Pomocí fázového posunu můžeme modulovat cirkadiánní rytmus. Tímto způsobem je možné světlo využít pro terapeutické účely. Důležité je najít nejúčinnější intenzitu a vlnovou délku světla, a tak optimalizovat terapii světlem (Cauter et al., 1994; Gooley et al., 2010).

Modré světlo (430 až 480 nm) je nejúčinnější složkou viditelného spektra, které má potvrzenou největší účinnost na resetování cirkadiánního rytmu i potlačení produkce melatoninu (Wright and Lack, 2001; Brainard et al., 2015). Světlo je důležité nejen pro uskutečnění zrakového podnětu, ale jeho důležitá funkce se odráží i na modulaci bdělosti, která by se měla zvýšit za světelné stimulace a snížit v tlumeném světle. Expozice 460 nm monochromatickému světlu během noci vyvolala pokles subjektivní ospalosti. Působení modrého světla během subjektivní noci také ovlivňuje tělesnou teplotu. Při kontinuálních světelných podmínkách byla udržována vyšší tělesná teplota na světle o intenzitě 600 luxů než s nižší intenzitou 60 luxů. Změny fáze tělesné teploty jsou nepřímo úměrné sekreci melatoninu. Elektroencefalografie také ukázala, že expozice světlem snižuje aktivitu alfa vln, což koreluje se snižující se ospalostí (Cajochen et al., 2005; Badia et al., 1991; Cajochen et al., 1992; Cajochen et al., 2000; Chang et al., 2013a; Chang et al., 2013b).

Bylo zjištěno, že nošení oranžových brýlí u dobrovolníků, které blokují modré světlo, výrazně zlepšuje kvalitu spánku proti kontrolní skupině (Burkhart et al., 2009). Ovšem není

potvrzeno, že zablokování určité vlnové délky působí na spánek jen skrze ovlivnění cirkadiálního systému, protože jen 60% neuronů, které tvoří RHT končí v SCN, zbylé neurony jsou vedeny do center mozku, která mimo jiné regulují spánek a bdění (Sasseville, 2006; Burkhart et al., 2009).

V této studii experimentátoři srovnávali účinek dvou krátkovlnných světél (460 nm – modré/ 555 nm – zelené). Ukázalo se, že modré vlnové délky mají silnější účinky než zelené vlnové délky. Modrá vlnová délka potlačila hladinu melatoninu zhruba na dvakrát delší dobu oproti se zelenému světlu (Lockley et al., 2003) .

### *2.5.2 Narušení cirkadiálních rytů*

Za posledních 50 let studie evidují pokles kvality a celkové délky spánku, které má negativní vliv na zdraví společnosti a rozvoj civilizačních chorob. Během osmdesátých let se začalo zdůrazňovat, že poruchy cirkadiálního rytmu a spánku jsou spojeny s duševním zdravím. U řady neuropsychiatrických a neurodegenerativních onemocnění byly nalezeny poruchy cirkadiálního rytmu a spánku.

Bipolární porucha je závažné duševní onemocnění charakterizované střídajícími se epizodami mánie a deprese. Poruchy spánku jsou přítomny ve všech stádiích onemocnění a vedou k horšímu průběhu nemoci. Během mánie mají pacienti sníženou potřebu spánku, během deprese se projevuje naopak hypersomie. Pacienti mají fázově zpožděnou sekreci melatoninu oproti zdravým jedincům (Robillard et al., 2013). Některé studie uvádějí, že pacienti jsou během mánie senzitivnější na působící světlo, které vyvolá silnější pokles melatoninu, než u zdravých jedinců (Lewy et al., 1981; Lam et al., 1990).

Alzheimerova nemoc (AD) je neurodegenerativní onemocnění také často spojované s poruchami cirkadiálních hodin. Pacienti s AD mají fragmentovaný spánek a během dne se může objevit zvýšené množství spánkových epizod (Van Someren et al., 1996). Kromě narušeného rytmu spánku se u takto diagnostikovaných pacientů objevuje snížená noční a zvýšená denní hladina melatoninu (Weissová et al., 2016). Postupné snižování noční produkce melatoninu je možné nalézt již v rané fázi této nemoci. Diagnostika hladiny melatoninu, by mohla mít možné využití pro časnější diagnostiku AD (Zhou et al., 2003). Použití světelné terapie a podávání melatoninu exogenně je možné využít pro zlepšení klinických příznaků této nemoci (Ohashi et al., 1999; Yamadera et al., 2000).

Parkinsonova nemoc (PN) je neurodegenerativní onemocnění centrální nervové soustavy, které se může projevovat motorickými nebo nemotorickými příznaky. Jedná se o postižení

dopaminergních části mozku zvané substantia nigra. Pacienti s PN se setkávají s obtížemi jako fragmentace spánku, nespavost a spánkové apnoe (Politis et al., 2010). Bylo prokázáno, že došlo ke snížení produkce nočního melatoninu (Videnovic et al., 2014). Při podávání melatoninu v pilotních studiích došlo ke zlepšení spánkových obtíží, ale vliv na celkovou dobu spánku byl malý (Bordet et al., 2003; Niwa et al., 2011).

S přirozeným stárnutím je pozměněna také propustnost čočky pro krátkovlnné délky světla a dochází k degenerativním změnám, například úbytku gangliových buněk (včetně ipRGC), které mohou mít za následek sníženou detekci modrého světla, a tak i zhoršenou synchronizaci cirkadiálního systému (Charman 2003).

### *2.5.3. Diabetická retinopatie*

Diabetes je metabolické onemocnění, které je charakterizováno zvýšenou hladinou cukru v krvi (hyperglykémie), která vzniká důsledkem relativního nebo absolutního nedostatku inzulínu. Dlouhodobá hyperglykémie může vést k poškozením různých orgánů a cév.

Diabetická retinopatie patří mezi nejčastější příčinu slepoty postihující dospělé. Rozvoj diabetické retinopatie mohou podpořit faktory jako je hypertenze, těhotenství (Klein et al., 1990; Turner et al., 1998; Van Leiden et al., 2002). Toto onemocnění vede k poškození cév sítnice a následnému poškození zraku. Ve vážnějších případech může dojít k úplné ztrátě zraku. Patologickým faktorem je hyperglykémie, která vede ke změnám očního tlaku, poškození cévní stěny oxidačním stresem a hromaděním produktů glykace. Tyto změny vedou k patologickým změnám cév sítnice, jako je porucha permeability stěny cévy a celkové uzavření kapiláry (Anderson et al., 1993; Kohner, et al., 1995; Singh et al., 2014).

Zelené světlo působící světelným emitorem je testováno pro preventivní léčbu diabetické retinopatie (Heckenlively, 2011). Při spánku, kdy dojde k poklesu světla pod prahovou úroveň, tyčinky zajišťují přenos vizuálního signálu, který má za následek zvýšený přísun kyslíku, a tím i zvýšení přívodu krve k tyčinkám na periferní oblasti sítnice. Změna proudění krve v centrální části sítnice, může vést k poškození cév, až ztrátě zraku. Terapeutické zařízení ve formě světelného emitátoru působí světlem o nízké intenzitě a vlnové délce 500-505 nm a zamezuje tak aktivaci tyčinek (Arden et al., 2011; Drasdo et al. 2002).



#### *2.5.4. Lidská víčka*

Oční víčko je první bariéra mezi sítnicí a vnějším prostředím. Lidská oční víčka mají schopnost měnit množství a spektrální složení světla, které po průchodu víčky dopadá na retinu (Bierman et al., 2017). Pigmentace pokožky a tloušťka očních víček jsou proměnlivé a ovlivňují průchod světla. Byly zjištěny i mezipohlavní rozdíly v propustnosti očních víček. Oční víčka žen jsou pro světlo propustnější než mužská (Ando and Kripke, 1996). Spektrální propustnost očních víček je přibližně stanovena na 0,3% u modrého, 0,3% u zeleného a 5,6% u červeného světla. Dle dalších studií se spektrální propustnost pro modrou vlnovou délku 460-480 nm pohybuje okolo 0,3-3%. Oční víčka fungují jako červený filtr a propouštějí červené světlo pětkrát víc s porovnáním světla modrého či žlutého. Měření propustnosti je ale složitý proces a výsledky se často liší díky rozdílům v měřících technikách (Moseley et al., 1988; Robinson et al., 1991; Bierman et al., 2011) .

#### *2.5.5. Chronoterapie*

Narušení cirkadiánních rytmů a spánku je problémem moderní doby a komplikací řady onemocnění (viz. kap. 2.5.2.). Použití světelné terapie může zpomalit postup nemoci a zajistit lepší kvalitu života pacientů (Ando et al., 1999; Levitt et al., 2002; Gest et al., 2016; Meesters, et al., 2018). Studie potvrdily, že světlo ovlivňuje sekreci hormonů, srdeční frekvenci, bdělost, sklon k spánku, tělesnou teplotu a genovou expresi (Song et al., 2003; Cajochen et al., 2005). Právě schopnost modrého světla, snížit hladinu melatoninu a následně posunout nástup jeho sekrece, je možné využít pro léčbu poruch spánku nebo poruch cirkadiánních rytmů či synchronizaci biologických hodin se sociálními požadavky moderní společnosti (Zeitzer et al., 2000; Wright et al., 2001; Smith et al., 2009; Brainard et al., 2015).

### **3. Cíle diplomové práce**

Cílem této diplomové práce je zhodnotit dopad monochromatického světla o vlnových délkách 455 a 510 nm působícího přes zavřená oční víčka na cirkadiánní systém člověka. Jako marker citlivosti cirkadiánního systému na toto světlo byl měřen okamžitý pokles melatoninu v krevní plazmě.

## 4. Metodický přístup

### 4.1. Základní informace

Tato studie má za úkol otestovat účinnost světla určitých parametrů aplikovaného přes zavřená oční víčka na hladinu melatoninu. Pro testování byl využit emitör (nosič) světla fungující na principu elektroluminiscence. Emitátor světla byl naprogramován tak, aby působil buď kontinuálním, nebo intermitentním, přerušovaným světlem v 2-sekundových pulzech každých 30 sekund.

Studie probíhala ve spolupráci s firmou ELON Technologies, s.r.o. Výzkumný projekt schválila Etická komise Národního ústavu duševního zdraví (dále jen NUDZ).

### 4.2. Účastníci studie

Studie se účastnili dobrovolníci ve věkovém rozmezí 18 až 30 let. Dobrovolníci byli instruováni tak, aby se týden před pokusem nevystavovali světlu v noci a dodržovali pravidelný spánkový režim.

Studie se zúčastnilo dohromady 23 dobrovolníků. Rozložení v rámci studie bylo následující: 5 dobrovolníků bylo vystaveno působení modrého kontinuálního světla, které působil ze světelného emitátoru, dále 6 dobrovolníků bylo vystaveno modrému přerušovanému (intermitentnímu) světlu a 12 dobrovolníků zelenému kontinuálnímu světlu.

Vylučovacím kritériem ze studie bylo užívání léků ovlivňujících spánek, neurologické onemocnění nebo neurochirurgický zákrok. Mezi další vylučovací kritéria bylo zařazeno vystavení přeletu přes více časových pásem, či práce v zaměstnání na směny v období 2 měsíců před nástupem na odběr. Dobrovolníci byli poučeni o průběhu, účelu studie a byli si vědomi, že účast ve studii je dobrovolná, a tak mohou kdykoli během výzkumu odstoupit bez udání důvodů. Na základě tohoto poučení podepsali informovaný souhlas. V den měření byli přijati do spánkové laboratoře NUDZ, kde podstoupili krátké vyšetření obsahující pohovor a základní neurologické vyšetření, na jehož základě jim bylo umožněno podstoupit noční odběry.

### 4.4. Průběh odběrů

Samotný odběr vzorků byl prováděn na lůžkovém oddělení spánkové laboratoře NUDZ v době mezi 22 – 6 hodin (viz Tab. 1). Účastníci studie tedy strávili ve spánkové laboratoři jednu noc. Dobrovolníci se dostavili na 19 hodinu do spánkového oddělení, kde jim

byl přidělen pokoj. Dobrovolníci byli znovu poučeni o tom, jak zabránit nežádoucímu osvětlení a následně jim byla zavedena kanyla s heparinovou zátkou. Ve 22 hodin byli dobrovolníci vyzváni ke klidu a uloženi na lůžko. V tuto dobu jim byl také nasazen světelný emitor, který v určenou dobu působil světlem o určitém impulzu, o krátké vlnové délce (modré světlo o vlnové délce 455 nm a zelené světlo o vlnové délce 510 nm) a intenzitě 60 luxů. Od této doby bylo zabráněno osvětlení dobrovolníků běžným světlem a samotné odběry byly prováděny za užití speciální červené svítilny

Čas odběrů (hodiny)	22:00	24:00	01:00	01:30	02:00	02:30	02:40	03:00	04:00	05:00	06:00
<i>Pilotní pokus</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Zelené světlo kontinuální</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Modré světlo kontinuální</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Modré světlo intermitentní</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

*Tab.1 Časový harmonogram odběrů krve (žlutě je označena doba, kdy byl emitátor světla zapnutý).*

#### *4.5. Odběr vzorků*

Dobrovolníkům byly odebrány 2 zkumavky VACUETTE® pro hematologii s antikoagulantem - K3 EDTA. Odběry prováděli pracovníci spánkové laboratoře dle harmonogramu odběrů. Ztráta odebrané krve byla jednorázově cca 6 ml a ani po opakovaných odběrech nepředstavovala žádné zdravotní riziko. Po každém jednotlivém odběru byla krev zcentrifugována (10 min na 2500/min). Vzorky byly po stočení přepipetovány do šroubovacích mikrozkuvek - GoldenGate Bioscience, které byly navíc obaleny hliníkovou fólií, která zabraňovala průstupu světla a tím následnému znehodnocení vzorku díky fotolabilitě melatoninu. Následně byly vzorky umístěny do mrazáku (-80°C), kde byly uschovány do doby stanovení.

#### *4.6. Radioimunologické stanovení profilu hladiny melatoninu*

Radioimunologická analýza (RIA) je imunologická metoda umožňující stanovit hladinu antigenů v tělních tekutinách, zejména v krvi. Základem této radioizotopové mikroanalýzy je imunochemická reakce neznámého množství antigenu se specifickou protilátkou. Tato reakce probíhá v přítomnosti uměle přidaného radioindikátoru o známé koncentraci. Principem metody je kompetice antigenů o vazebné místo, které se nachází na protilátce. Vzniklý komplex radioaktivně značený antigen-protilátka je nepřímo úměrný množství stanovovaného neznačeného antigenu s navázanou protilátkou. Pro výpočet neznámé koncentrace zjišťovaného antigenu je potřeba zhotovit kalibrační křivku pomocí roztoků o známé koncentraci (standarty). Jako radioindikátor lze využít větší množství radionuklidů:  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ . Výběr radionuklidu je uskutečňován podle charakteru zjišťované látky.

#### *4.7. Postup při stanovení koncentrace melatoninu*

Pro určení koncentrace melatoninu ve vzorcích byla použita výše popsaná metoda RIA značky Melatonin Direct RIA od firmy Immuno-Biological Laboratories Inc. (IBL). Standarty potřebné k vytvoření kalibrační křivky a vzorky, které obsahovaly dostatečné množství plazmy, jsme stanovovali v tzv. „dubletech“.

Zprv bylo potřeba vytvořit Enzyme solution. Enzymy jsme přidali 3 ml z příslušného enzymového pufru, který byl součástí kitu. Tento vzniklý roztok se umístil na rotační mixér po dobu 30 minut. Další přípravu vyžadovalo vyrovnávající činidlo, které bylo potřeba rozpustit v 10 ml deionizované vody. Poté jsme z mrazáku (- 80°C) vyndali jednotlivé vzorky plazmy a roztrídili je dle jednotlivých časů odběru a příslušných dobrovolníků, nechali jsme je roztát v pokojové teplotě. Vzorky tály 10-15 minut. Následně jsme si označili zkumavky pro vzorky čísla 1 až 78 a standarty písmeny A až G. Dále jsme si nadepsali zkumavky pro kontroly C1 (20 pg/ml) a C2 (60 pg/ml), které měly specifickou koncentraci melatoninu. Zkumavky nadepsané písmenem T znamenali označení pro maximální (totální) množství radioaktivity a zkumavky nadepsané jako NSB označovaly nespecifickou vazbu.

Po těchto přípravách jsme napipetovali do příslušných zkumavek 15 $\mu$ l od každého standardu s určitou koncentrací radioaktivně značeného melatoninu: standard A 0 pg/ml, standard B 3 pg/ml, standard C 10 pg/ml, standard D 30 pg/ml, standard E 100 pg/ml, standard F 300 pg/ml a standard G 1000 pg/ml. Dále jsme napipetovali 15  $\mu$ l C1 a C2 do příslušných zkumavek. Přidali jsme 150  $\mu$ l vyvíjecího činidla do zkumavek určených pro standardy, kontroly a NSB.

Do zkumavek 1-78 jsme napipetovali 150  $\mu$ l z každého vzorku plazmy, které byli předtím roztrženy dle jednotlivých časů odběru. Následně jsme přidali 50  $\mu$ l připraveného enzymu solution do všech zkumavek (kromě zkumavek označených písmenem T - „totálů“) a ihned jsme každou zkumavku promíchali pomocí vortexu. Zkumavky jsme zakryli pomocí aluminiové folie a zanechali jsme 1 hodinu při pokojové teplotě (20-25 °C). Po uplynutí daného času jsme do příslušných zkumavek přidávali 100  $\mu$ l pufru (vynechány byly opět zkumavky T). Následně jsme přidali 25  $\mu$ l značeného <sup>125</sup>I melatoninu do všech zkumavek a 50  $\mu$ l melatoninové protilátky do všech příslušných zkumavek kromě NSB. Překryli jsme zkumavky aluminiovou folii a dále je uložili do digestoře po dobu 20-24 hodin. Během této doby melatonin, který byl příslušný ve vzorcích a značený <sup>125</sup>I melatonin vzájemně kompetovaly o vazbu na protilátce.

Po uběhnutí této doby jsme vyndali vzorky z digestoře a do všech zkumavek jsme přidali 1000  $\mu$ l Precipitating reagent (vynechány byly opět zkumavky T) a následně jsme je promíchali pomocí vortexu. Takto připravené vzorky jsme nechali inkubovat 20 minut v lednici (8°C). Všechny vzorky se poté stočily v předem vychlazené centrifuze (4°C) po dobu 20 minut na 3000 x g. Na dně zkumavky se vytvořil pelet a supernatant byl odlit do speciální nádoby na radioaktivní odpad. Zkumavky byly ještě vysušeny buničinou pomocí pinzety. Poté byly jednotlivé pelety rozpuštěny ve 150  $\mu$ l 0,85% NaOH. Následně jsme si nadepsali patřičně scintilační lahvičky dle zkumavek, přenesli jsme do nich vzorky a přidali jsme 7 ml scintilačního roztoku EcoLite (MP biomedical). Ve scintilačních lahvičkách byly v rozpuštěných peletech měřené hodnoty radioaktivního záření pomocí gama scintilačního spektrometru (Berthold LB2111; Beckman Coulter).

#### *4.8. Analýza dat*

Gama scintilační spektrometr Berthold LB2111 změřil ve výše zpracovaných vzorcích hodnoty radioaktivního záření v jednotkách cpm (counts per minute). V programu GraphPad

Prism 6 jsme vypočetli logaritmovanou koncentraci kalibračních vzorků standardů, ke kterým jsme následně přiřadili jejich naměřené hodnoty cpm (Tab. 2). Dosadili jsme také naměřené hodnoty vzorků v cpm. Pomocí nonlineární regrese jsme stanovili interpolované logaritmované hodnoty koncentrací všech vzorků. Odlogaritmováním vypočtených hodnot jsme získali koncentraci melatoninu (pg/ml) v odebraných vzorcích plazmy.

Získaná data byla využita ke stanovení hladiny melatoninu a na základě těchto dat byly sestaveny melatoninové profily jednotlivých dobrovolníků. Dále byl proveden výpočet změny hladiny melatoninu v % maximální hodnoty každého profilu ze zprůměrovaných naměřených koncentrací melatoninu všech dobrovolníků.

Standardy	Koncentrace melatoninu (pg/ml)	log (koncentrace)
B 3	3	0,477121255
C 10	10	1
D 30	30	1,477121255
E 100	100	2
F 300	300	2,477121255
G 1000	1000	3

Tab.2 Vypočtená koncentrace kalibračních vzorků.

#### 4.9. Statistické zpracování dat

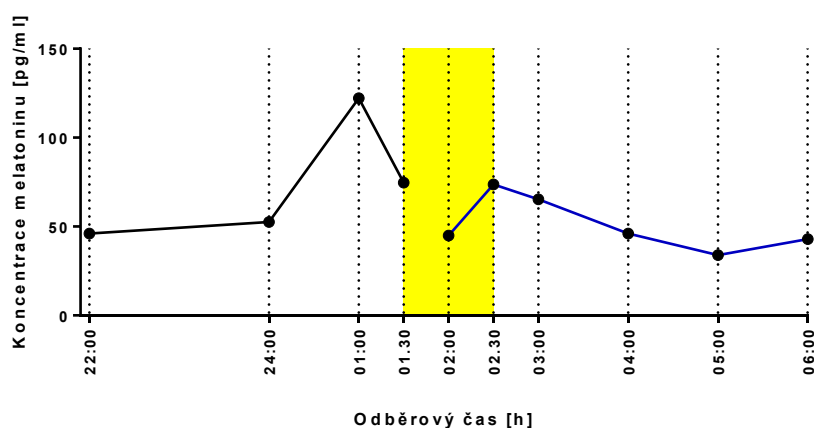
Výsledná data byla vyhodnocena základními statistickými metodami:

- 1) Aritmetický průměr:  $\sum x_i / nA = \pi r^2$
- 2) Směrodatná odchylka:  $[(1/n - 1) \times \sum (x_i - x)^2]^{1/2} = \pi r^2$
- 3) Střední chyba průměru:  $SD/n^{1/2} = \pi r^2$
- 4) Studentův t-test, který slouží k porovnání střední hodnoty  $\mu$  s konstantou  
 $H_0: \mu = \mu_0$

## 5. Výsledky

### 5.1. Pilotní pokus

V roce 2016 proběhl pilotní pokus. V tomto pokusu byl světelný impulz emitátoru posunutý o hodinu dříve než v hlavní skupině experimentů (1:30 – 2:30, Tab. 1). Pro pilotní studii byl využit emitátor světla, který působil světlem o modré vlnové délce (455 nm) a intenzitě 60 luxů. Výsledky ukazují, že 1 hodina působení modrého světla přes zavřená oční víčka snižuje hladinu melatoninu v plazmě o 39,79 % (Obr. 5).

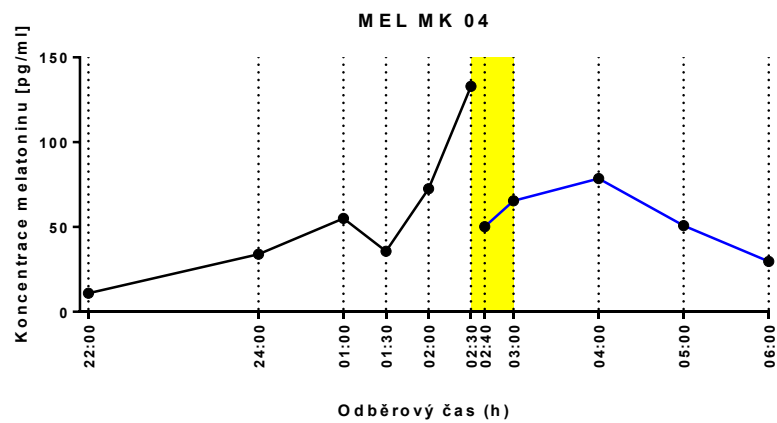
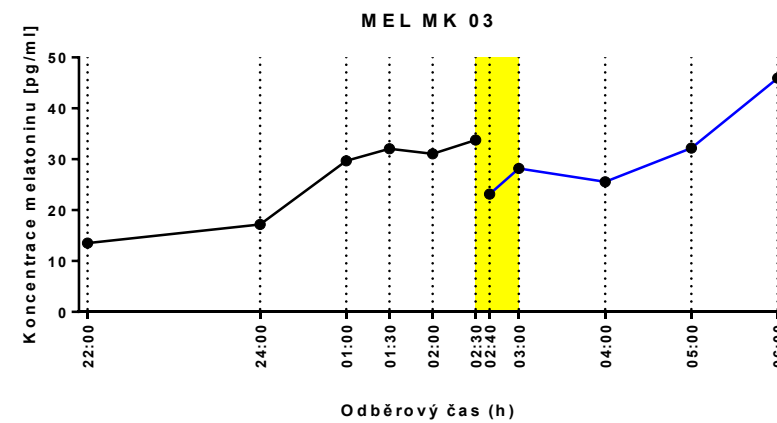
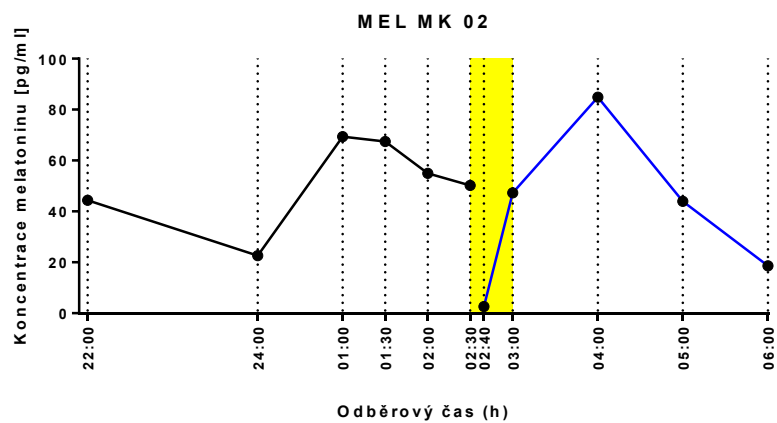
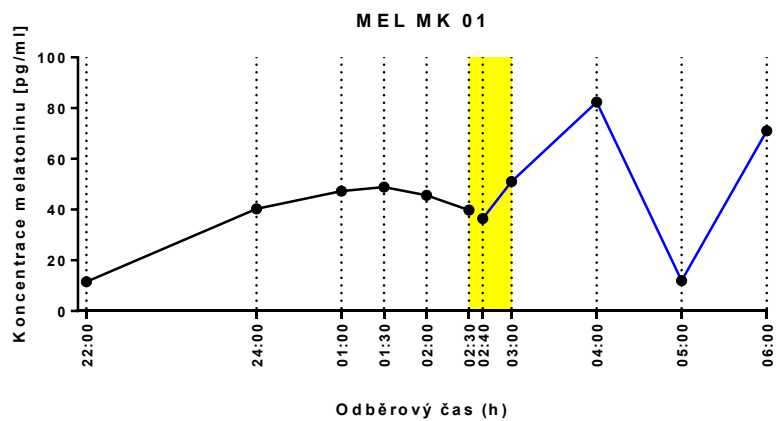


Obr. 5 Snížení hladiny melatoninu po světelném pulzu v pilotním pokusu. Čas odběrů vzorků krve je vyznačen na ose x. Černě vyznačená spojnice popisuje jednotlivé naměřené koncentrace melatoninu před vlastním experimentálním provedení. Žlutě vyznačené sloupce vymezují dobu, kdy působil emitátor světla. Modře vyznačená spojnice označuje naměřené hladiny melatoninu po kontinuálním pulzu modrého světla.

### 5.2. Pokles hladiny melatoninu po modrém kontinuálním světle

V dalším experimentu byl použit emitátor světla, který působil světlem o modré vlnové délce (455 nm) a intenzitě 60 luxů. Výsledné grafy (Obr. 6) ukazují zřetelný pokles hladiny melatoninu po působení modrého světla u všech subjektů. Pokles je viditelný po prvních 10 minutách působení. U všech testovaných subjektů byl detekován opětovný nárůst hladiny melatoninu v druhé polovině doby působení emitátoru.



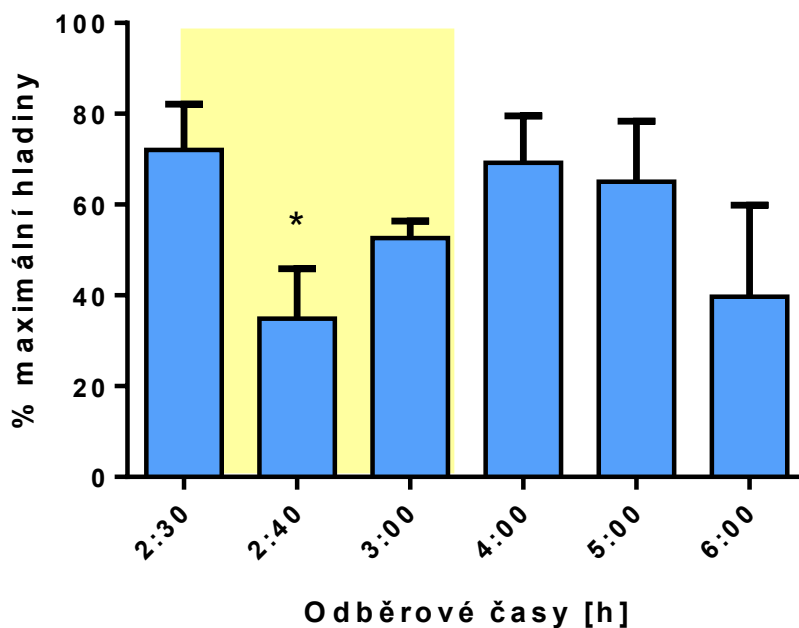


Obr. 6 Snížení hladiny melatoninu po světelném pulzu o vlnové délce 455 nm u jednotlivých subjektů. Černě vyznačená spojnice popisuje jednotlivé naměřené koncentrace melatoninu před spuštěním světelného emitátoru. Žlutě označená oblast grafu znázorňuje časový úsek působení emitátoru. Modře vyznačená spojnice označuje naměřené hladiny melatoninu po kontinuálním pulzu modrého světla.

Odběrové časy	MEL ZK 01	MEL ZK 02	MEL ZK 03	MEL ZK 04
22:00	11,53	44,40	13,52	10,99
24:00	40,28	22,61	17,19	33,90
1:00	47,27	69,35	29,69	55,02
1:30	48,87	67,48	32,05	35,64
2:00	45,60	54,99	31,05	72,61
2:30	39,80	50,24	33,78	132,89
2:40	36,43	2,60	23,14	50,14
3:00	51,01	47,28	28,19	65,48
4:00	82,34	84,90	25,56	78,55
5:00	11,97	43,99	32,18	50,77
6:00	71,05	18,61	45,93	29,73

Tab. 3 Hodnoty naměřených koncentrací melatoninu (pg/ml) v krevní plazmě u subjektů vystavených modrému kontinuálnímu světlu.

Studentův t-test odhalil signifikantní rozdíl ( $P = 0,0471$ ) v naměřených hodnotách mezi posledním odběrem před spuštěním emitátoru (2:30) a deset minut po spuštění emitátoru (2:40). Po deseti minutách od spuštění emitátoru byl naměřen 51,58 % pokles hladiny melatoninu. Po dalších dvaceti minutách (3:00) byla hladina melatoninu zvýšená oproti hodnotám naměřeným v 2:40 o 33,75 %, po další hodině (4:00) o 49,59 %, oba rozdíly nejsou ale statisticky významné (Obr. 7).

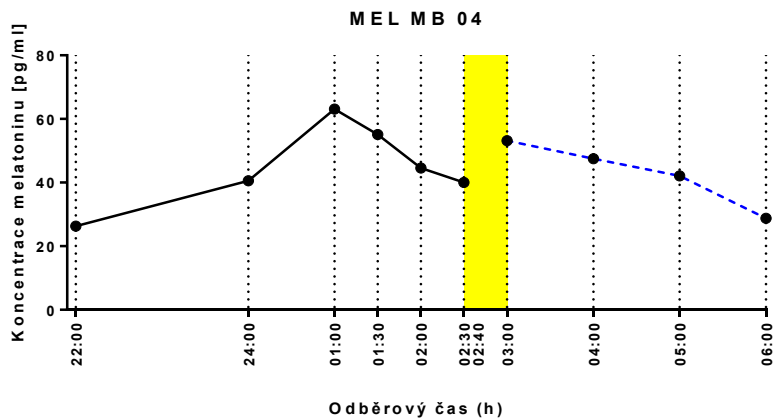
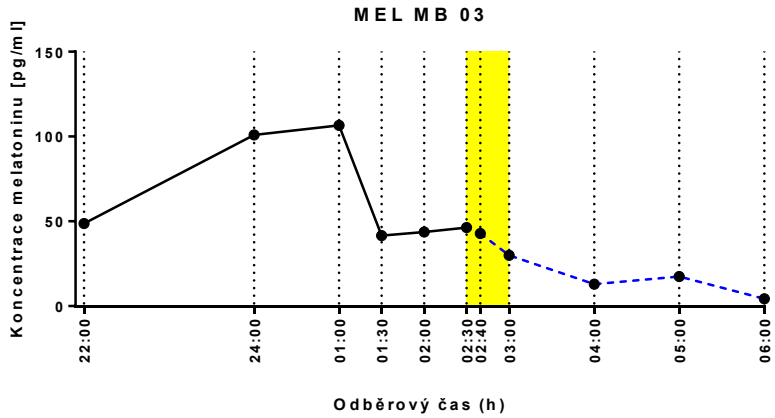
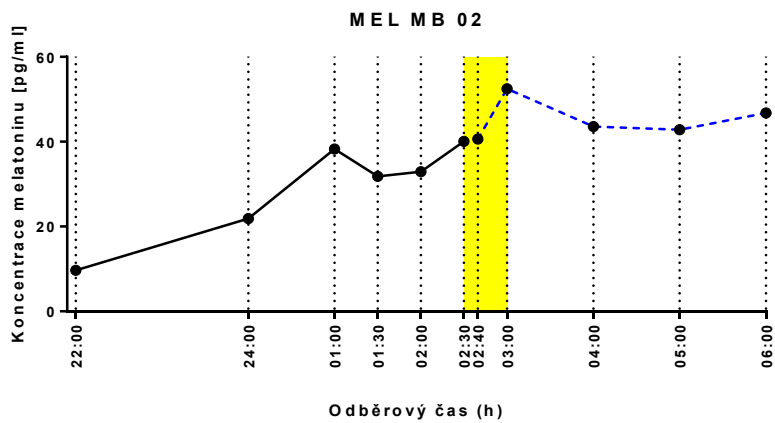
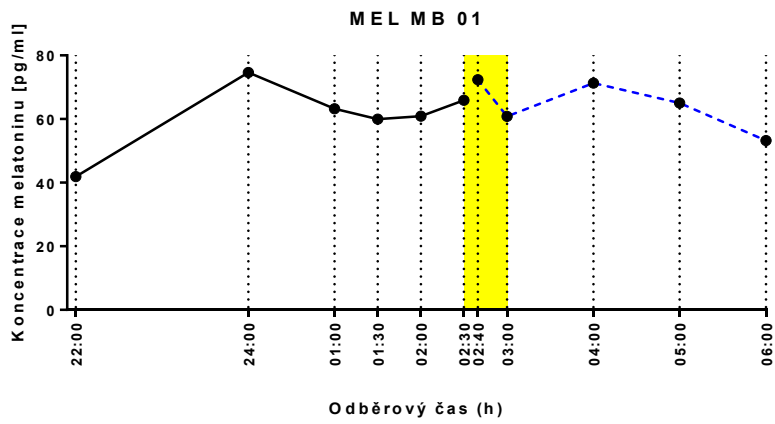


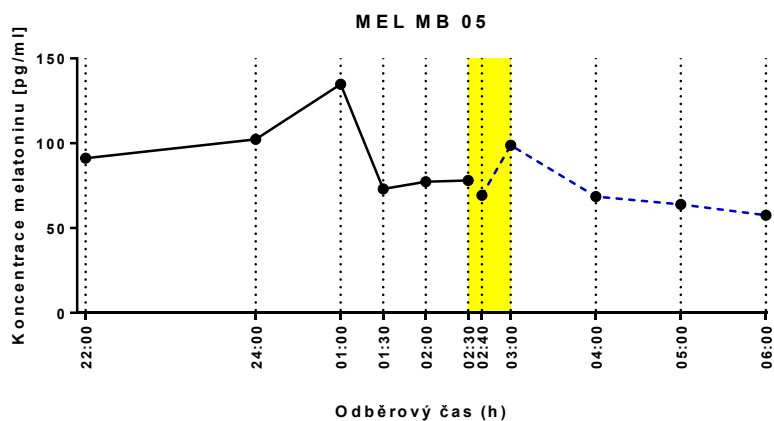
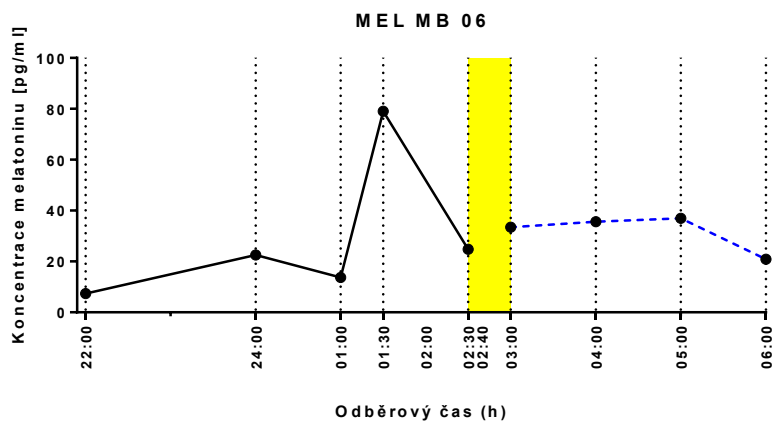
Obr. 7 Pokles noční hladiny melatoninu po kontinuálním pulzu modrého světla. Graf vyjadřuje průměr z % maximální hodnoty v každém profilu dobrovolníků ( $n = 4$ ). Žlutě označená oblast grafu znázorňuje časový úsek působení světelného emitátoru.  $*p < 0,05$ .

### 5.3. Pokles hladiny melatoninu po modrém intermitentním světle

V poslední části experimentu byly pokusné subjekty vystaveny hodinovému pulsu intermitentního modrého světla, které svítilo vždy 2 sekundy každých 30 sekund. V tomto pokusu byl světelný impulz emitátoru stanoven na 2:30 – 3:00 (tab. 1). Pro tuto část studie byl využit emitátor světla, který emitoval světlo o modré vlnové délce (455 nm) a intenzitě 60 luxů.

Naše výsledky ukazují, že působení modrého intermitentního světla noční hladinu melatoninu nemění a všechny pokusné subjekty měly hladinu melatoninu zachovanou (Obr. 8, Tab. 4).



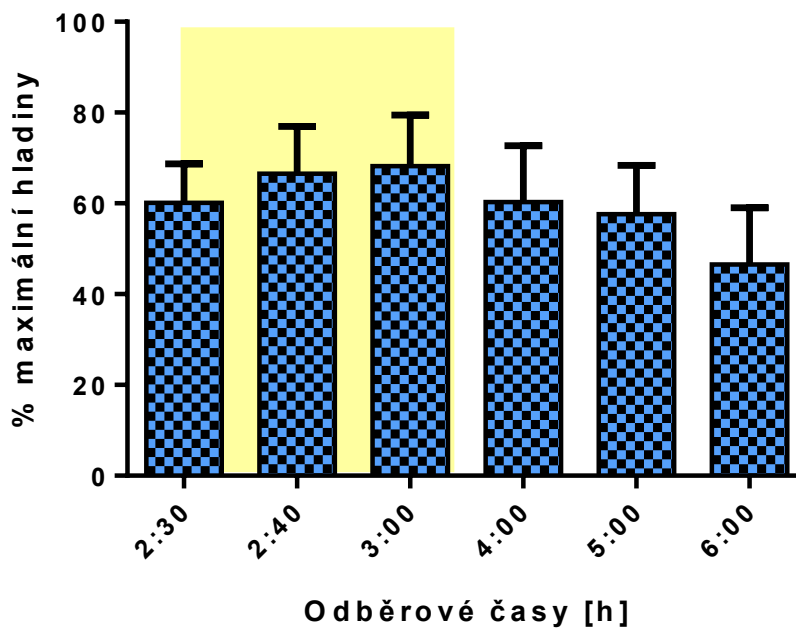


Obr. 8 Hladina melatoninu po světelném intermitentním pulzu o vlnové délce 455 nm u jednotlivých subjektů. Černě vyznačená spojnice popisuje jednotlivé naměřené koncentrace melatoninu před spuštěním světelného emitátoru. Žlutě označená oblast grafu znázorňuje časový úsek působení emitátoru. Modře vyznačená spojnice označuje naměřené hladiny melatoninu po intermitentním pulzu modrého světla.

Odběrové časy	MEL ZK 01	MEL ZK 02	MEL ZK 03	MEL ZK 04	MEL ZK 05	MEL ZK 06
22:00	41,8833104	9,68386664	48,7457773	26,2921439	91,1968841	7,33378544
24:00	74,6273465	21,8584821	100,988983	40,5376903	102,269704	22,5808871
1:00	63,2413308	38,2848544	106,597004	63,1247978	134,841632	13,6903641
1:30	59,94956	31,8018218	41,6032252	55,1181967	73,0977484	79,021633
2:00	60,8893026	32,9151622	43,7492891	44,561623	77,271439	-
2:30	65,9137469	40,0848257	46,312476	40,014003	78,1222962	24,7919678
2:40	72,3989054	40,6193529	42,8713343	-	69,3663751	-
3:00	60,8125199	52,4576704	29,9241622	53,1754287	98,8559923	33,4753403
4:00	71,3271711	43,564627	12,9243586	47,5147009	68,6077221	35,5942626
5:00	65,0005453	42,8130334	17,397386	42,1063892	63,969801	36,9575353
6:00	53,2513963	46,7864399	4,27091669	28,7760381	57,5295531	20,8599374

Tab. 4 Hodnoty naměřených koncentrací melatoninu (pg/ml) v krevní plazmě u subjektů vystavených modrému intermitentnímu světlu.

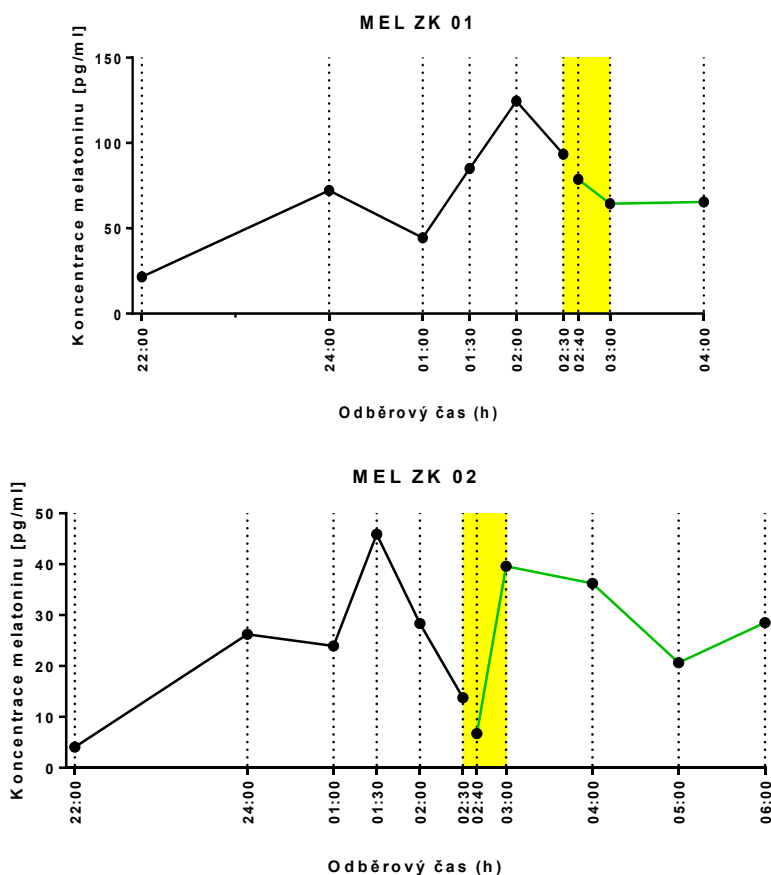
Studentův t-test neodhalil signifikantní rozdíl v hodnotách naměřených před spuštění světelného emitátoru (2:30) a následném dalším odběru, který proběhl deset minut po spuštění emitátoru (2:40). Souhrnný graf ukazuje nenarušený průběh rytmu melatoninu s maximem ve 3:00 (obr. 9).

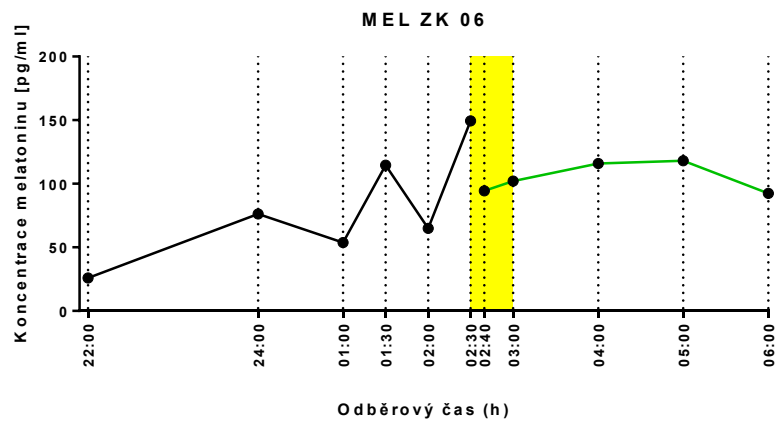
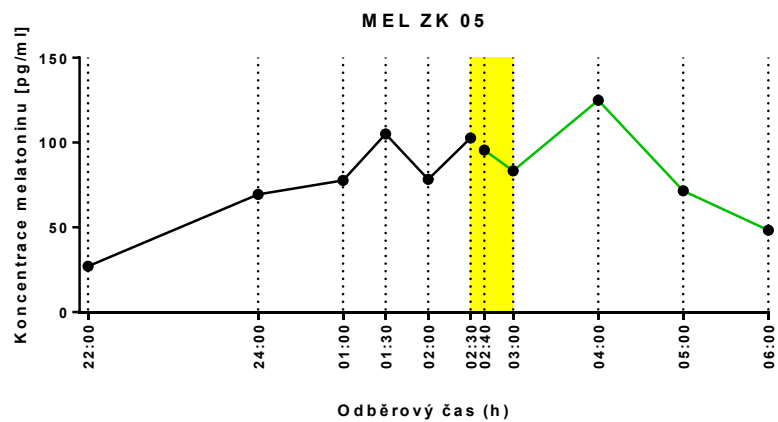
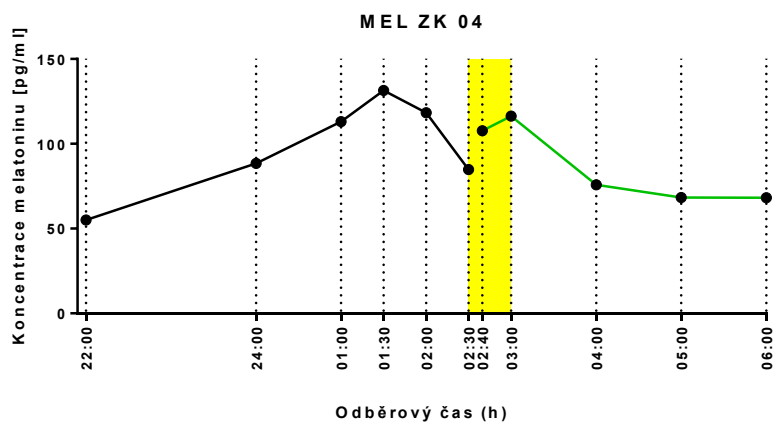
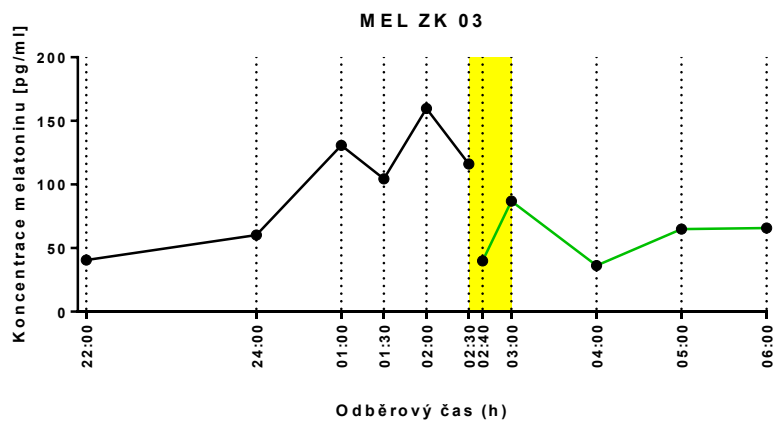


Obr. 9 Pokles noční hladiny melatoninu po modrém intermitentním světelném pulzu. Graf vyjadřuje průměr z % maximální hodnoty v každém profilu dobrovolníků (n = 6). Žlutě označená oblast grafu znázorňuje časový úsek působení světelného emitátoru.

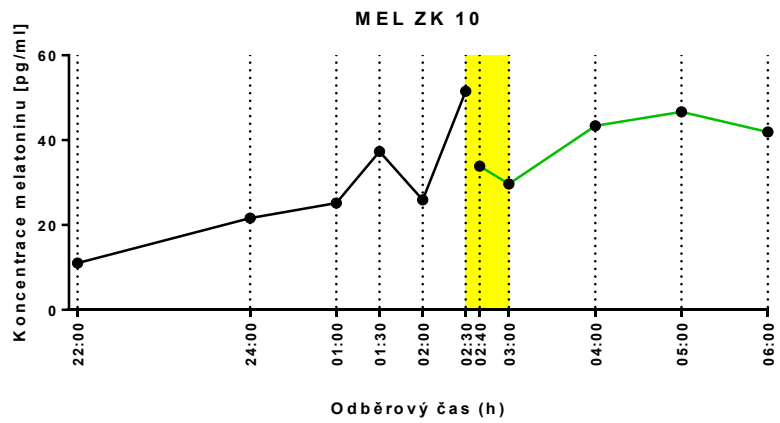
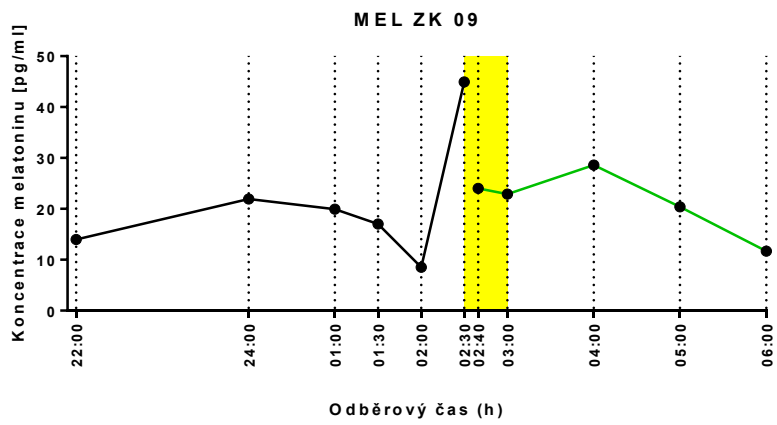
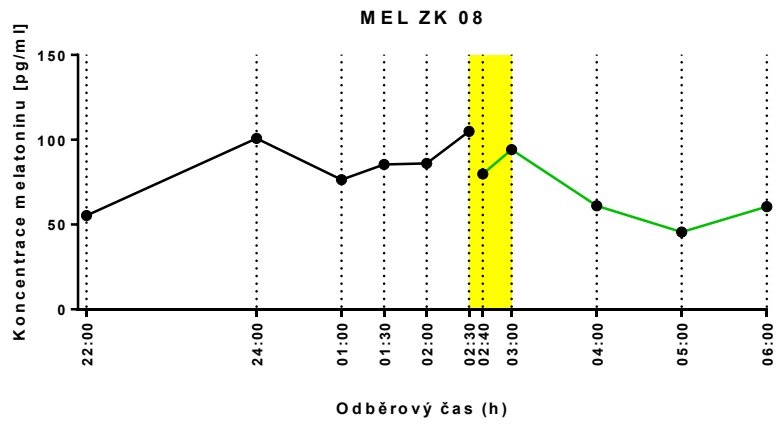
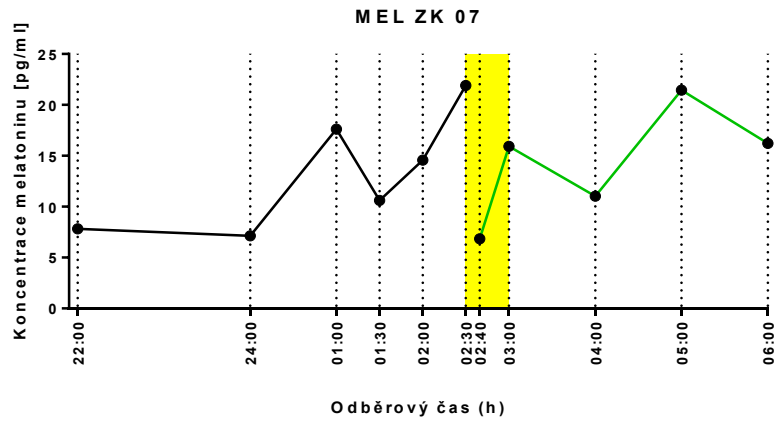
#### 5.4. Pokles hladiny melatoninu po zeleném kontinuálním světle

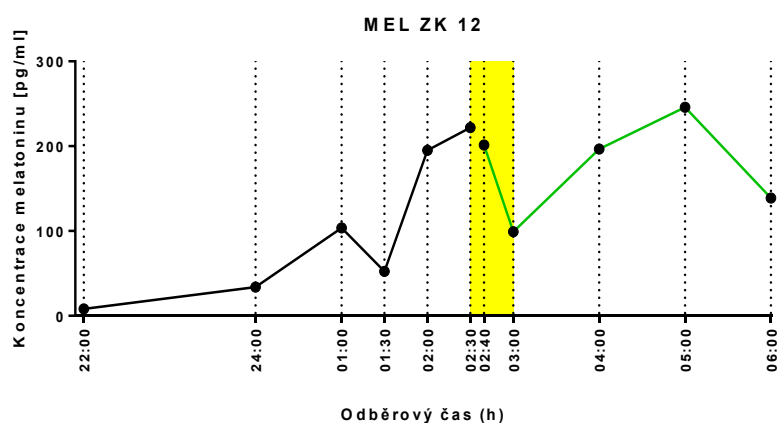
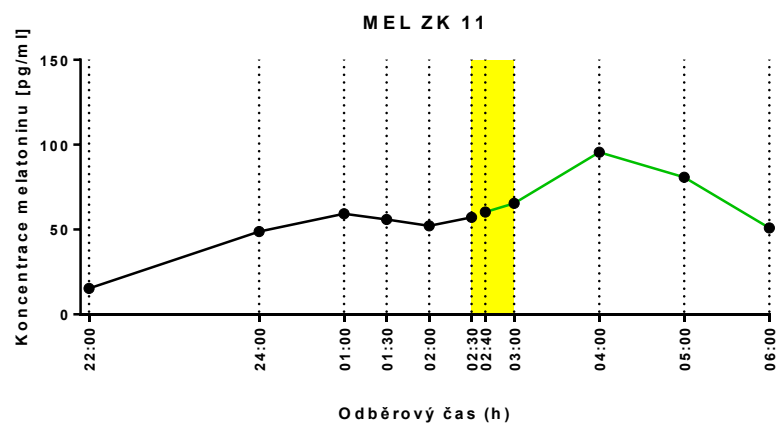
V roce 2017 proběhla hlavní experimentální část diplomové práce. V tomto pokusu byl světelný impulz emitátoru stanoven na 2:30 – 3:00 (Tab. 1). Pro hlavní studii byla využit emitátor, která působil světlem o zelené vlnové délce (505 nm) a intenzitě 60 luxů. Obr.10 a tabulka 5 popisuje změny hladiny melatoninu u jednotlivých subjektů. Výsledné grafy ukazují zřetelný pokles hladiny melatoninu po působení zeleného světla v průměru u všech subjektů. Pokles je viditelný po prvních 10 minutách působení (kromě MEL ZK 04). U poloviny testovaných subjektů byl detekován opětovný nárůst hladiny melatoninu v druhé polovině doby působení světelného emitátoru.











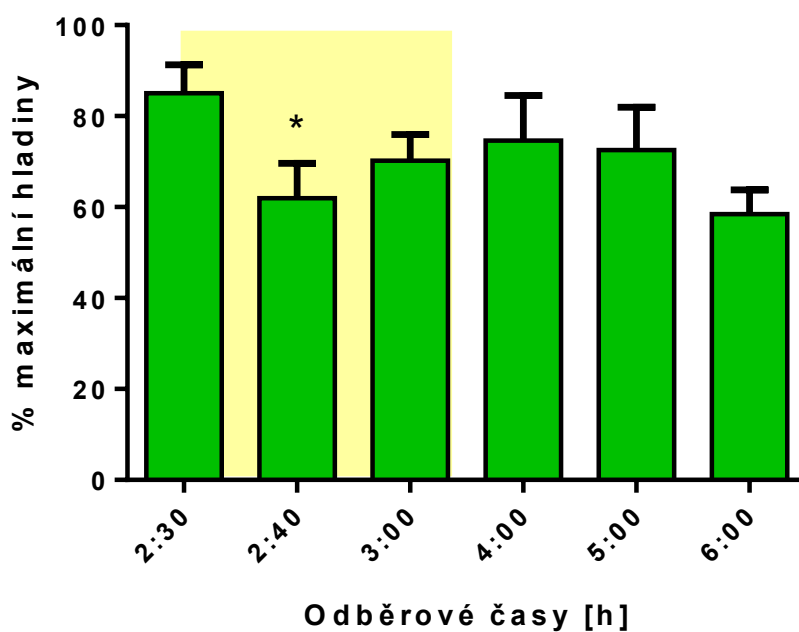
Obr. 10 Snížení hladiny melatoninu po světelném pulsu o vlnové délce 505 nm u jednotlivých subjektů. Černě vyznačená spojnice popisuje jednotlivé naměřené koncentrace melatoninu před spuštěním světelného emitátoru. Žlutě označená oblast grafu znázorňuje časový úsek působení emitátoru. Zeleně vyznačená spojnice označuje naměřené hladiny melatoninu po kontinuálním pulzu zeleného světla.

Odběrové časy	MEL ZK 01	MEL ZK 02	MEL ZK 03	MEL ZK 04	MEL ZK 05	MEL ZK 06
22:00	21,53	4,05	40,54	55,06	27,04	25,96
24:00	72,20	26,21	60,23	88,40	69,41	76,30
1:00	44,41	23,95	130,69	113,06	77,67	53,75
1:30	85,10	45,88	104,38	131,49	105,01	114,59
2:00	124,59	28,36	159,75	118,30	78,27	64,84
2:30	93,43	13,76	116,15	84,81	102,68	149,44
2:40	78,70	6,74	39,89	107,66	95,56	94,43
3:00	64,44	39,59	86,85	116,29	83,35	102,10
4:00	65,47	36,22	36,17	75,75	124,97	115,95
5:00	-	20,66	64,89	68,34	71,59	118,09
6:00	-	28,52	65,72	68,15	48,28	92,42

<i>Odběrové časy</i>	MEL ZK 07	MEL ZK 08	MEL ZK 09	MEL ZK 10	MEL ZK 11	MEL ZK 12
22:00	7,83	55,37	13,97	11,00	15,33	8,21
24:00	7,14	100,80	21,95	21,61	48,84	33,93
1:00	17,61	76,38	19,95	25,18	59,29	103,53
1:30	10,60	85,41	17,02	37,33	55,98	52,27
2:00	14,58	86,05	8,51	25,94	52,18	195,17
2:30	21,91	104,99	44,93	51,51	57,17	221,82
2:40	6,84	79,78	24,03	33,90	60,31	201,28
3:00	15,94	94,25	22,88	29,67	65,50	99,13
4:00	11,03	61,08	28,60	43,40	95,62	196,74
5:00	21,44	45,58	20,41	46,68	80,81	245,84
6:00	16,21	60,62	11,67	41,92	50,94	138,94

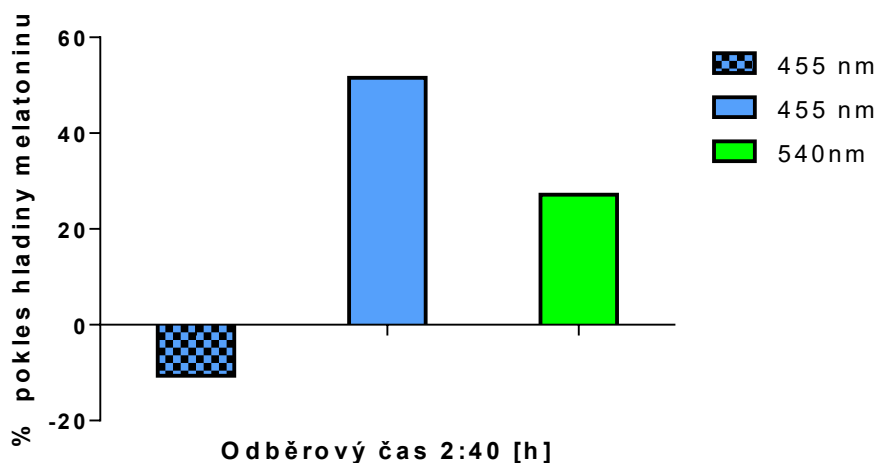
*Tab. 5 Hodnoty naměřených koncentrací melatoninu (pg/ml) v krevní plazmě u subjektů vystavených zelenému kontinuálnímu světlu*

Souhrnná analýza všech subjektů odhalila signifikantní rozdíl ( $P = 0,0296$ ) v naměřených hodnotách mezi posledním odběrem před spuštěním světelného emitátoru (2:30) a deset minut po spuštění emitátoru (2:40). Po deseti minutách od spuštění emitátoru byl naměřen průměrný 27,18 % pokles hladiny melatoninu od hodnoty naměřené těsně před spuštěním. Po dalších dvaceti minutách (3:00) byla hladina melatoninu zvýšená oproti hodnotám naměřeným v 2:40 o 11,73 %, po další hodině (4:00) o 17,02 %, oba rozdíly nejsou ale statisticky významné (Obr. 11).



Obr. 11 Pokles noční hladiny melatoninu po kontinuálním pulzu zeleného světla. Graf vyjadřuje průměr z % maximální hodnoty v každém profilu dobrovolníků ( $n = 12$ ). Žlutě označená oblast grafu znázorňuje časový úsek působení světelného emitátoru.  $*p < 0,05$ .

Z našich výsledků vyplývá, že cirkadiánní systém je nejcitlivější je na modré kontinuální světlo, které vyvolá 51,58 % pokles maximální hladiny melatoninu. Zelené světlo indukuje 27,18 % pokles, ale intermitentní modré světlo neovlivňuje hladinu melatoninu vůbec (Obr. 12).



Obr. 12 Graf vyjadřuje pokles nočních hladin melatoninu v odběrovém bodu 2:40 hod. Srovnání poklesu jednotlivých hladin po deseti minutovém působení světelných pulzů o vlnové délce 455 nm a 505 nm.

## 6. Diskuse

Cílem naší studie bylo zjistit efekt světelných emitátorů působících skrz zavřená oční víčka na noční hladinu melatoninu v krvi zdravých subjektů. Potlačení hladiny melatoninu samo o sobě má značný fyziologický význam, neboť melatonin plní v organismu mnoho pozitivních úloh. Vzhledem k tomu, že neuronální dráha, která vede k potlačení melatoninu je stejná jako ta, která vede k synchronizaci cirkadiánního systému světlem, lze náš přístup považovat za určitý marker vlivu emitovaného světla na celý cirkadiánní systém a předpokládat jeho synchronizační účinky.

Účinek světelného pulzu je možné měřit ve vzorcích sliny nebo krevní plazmy. Detekci melatoninu ve vzorcích krevní plazmy jsme zvolili pro vyšší citlivost a rozlišení, ale i minimální narušení spánku dobrovolníků (Benloucif et al., 2008).

Jako první jsme se zaměřili na kontinuální působení modré složky světla o vlnové délce 455 nm. Zvolená vlnová délka odpovídá rozsahu nejúčinnější složky viditelného spektra pro ovlivnění cirkadiánního rytmu a hladiny melatoninu, které bylo potvrzeno několika studiemi (Brainard et al., 2001; Thapan et al., 2001; Lockley et al., 2003; Zaidi et al., 2007; Brainard et al., 2015). Naše výsledky ukazují, že po 10 minutovém působení modrého světla o vlnové délce 455 nm a intenzitě 60 luxů poklesne hladina melatoninu v průměru o 51,58%. Po

následujících 20 minutách, kdy emitátor světla působil celkem 30 minut, byla zaznamenána zvýšená hladina melatoninu oproti hodnotám naměřeným po 10 minutách působení o 33,75%. V následujícím odběrovém čase, kdy emitátor světla již nesvítil 30 minut, bylo naměřeno zvýšení hladiny melatoninu oproti hodnotám naměřených po 10 minutách působení 49,59%.

Navzdory působení očních víček na průchozí světlo (viz. kap. 2.5.4.) jsme potvrdili účinek modrého světla na hladinu melatoninu, která reaguje okamžitým poklesem již po prvních 10 minutách působení. Následné zvýšení melatoninu i přes stálé působení emitátoru je neočekávaný výsledek, který nebyl zatím ukázán v žádné studii. U animálních modelů má hladina melatoninu tendenci stoupat, pokud je světelný stimul aplikován v první polovině subjektivní noci, ale až po ukončení působení světla (Illnerova et al., 1989). Polovina subjektivní noci nastává u většiny lidí během druhé až třetí hodiny ranní. Nárůst hladiny melatoninu, který byl naměřen ve třetí hodině ranní by mohl naznačovat, že náš světelný pulz dopadl do první poloviny spánkové fáze kopírující subjektivní noc, tato úvaha však nezahrnuje fakt, že melatonin stoupal i při kontinuálním svícení. Tento nálezný si vysvětlujeme nízkou intenzitou světla působícího přes oční víčka, která může teoreticky vést k pozvolné adaptaci zrakového systému pro neobrazové vidění i indukované aktivity SCN. Jestliže propustnost očních víček pro modré světlo je maximálně 3% (Moseley et al., 1988; Robinson et al., 1991; Bierman et al., 2011) .a navíc dochází ke spektrálnímu posunu, je možné, že takto nízká intenzita může být kalibrována cirkadiálním systémem a syntéza melatoninu se obnoví v plné míře. Je potom otázka, zda je možné podobný efekt očekávat i pro fázové změny cirkadiálních oscilací.

Podobný emitátor světla byl použit jako pokusné terapeutické zařízení v několika studiích. Světelný pulz byl také aplikován přes víčka. Nejčastěji byl používán v souvislosti s léčbou syndromu zpožděného spánku (DSPPS z angl. Delayed Sleep Phase Syndrome), kde se potvrdil jeho účinek ve vyvolání fázového posunu, a tak žádoucí přenastavení cirkadiálního rytmu (Ando et al., 1999; Cole et al., 2002). Rychlý účinek světelného emitátoru na hladinu melatoninu, který jsme ukázali, v těchto studiích nebyl hodnocen.

V druhé části studie jsme hodnotili účinky modrého intermitentního světla stejné vlnové délky (455 nm). Naše studie srovnávala účinek intermitentního světla a kontinuálního světla, během stejného časového období. Naše výsledky ukázaly, že intermitentní modré světlo nemělo efekt na potlačení hladiny melatoninu. Ukázali jsme, že intermitentní světlo nedosahuje takového účinku jako expozice kontinuálním světlem o stejné vlnové délce.

Několik studií ale uvádí, že intermitentní světlo má schopnost snížit melatonin až na denní hladinu. V této studii využívali masku se shodným načasováním světelných pulzů, ovšem s téměř dvojnásobnou intenzitou (Figueiro et al., 2013). V této studii potvrdili vyšší účinnost intermitentního světla nad účinkem tlumeného bílého světla. Využívali zde 6 minutové impulzy po 40 minutách o vysoké intenzitě 5000 luxů. Výsledky této studie ukázaly schopnost intermitentního světla vyvolat větší fázový posun u 94% subjektů než při působení tlumeným světlem. Všechny tyto studie využívali několika násobně vyšší intenzitu světla, proto měly zřejmě kladné výsledky u vlivu přerušovaného na potlačení hladiny melatoninu.

V poslední části studie jsme se zaměřili na zelenou složku světla o vlnové délce 505 nm, které působilo pouze kontinuálně. Světelný emitátor, který jsme využili i pro naši studii, se pokusně využívá pro léčbu diabetické retinopatie. Světelný emitátor má sloužit jako neinvazivní terapeutický nástroj, který má zamezit hypoxii oblastí sítnice, zhoršení diabetické retinopatie a dalším komplikacím (viz. kap. 2.5.3.), (Heckenlively, 2011). Využití světelného emitátoru pro léčbu diabetického makulárního edému, který je po diabetické retinopatii druhou nejčastější příčinou oslepnutí, bylo ale nedávno zpochybněno studií, která nepotvrzuje účinek emitátoru jako terapeutického zařízení. Světelný emitátor zamezí hypoxii pouze na lokálních místech sítnice (Sivaprasad et al., 2018). Cílem naší studie bylo zjistit, zdali při případném terapeutickém používání světelného emitátoru zeleného světla nedochází k narušení cirkadiánních rytmů a potlačení vysoké noční hladiny melatoninu přesto, že zelené světlo je na okraji spektrální citlivosti ipRGC.

Naše výsledky ukazují, že po 10 minutovém působení světelného emitátoru poklesne hladina melatoninu v průměru o 27,18 %. Po následujících 20 minutách, kdy emitátor světla působil celkem 30 minut, byla zaznamenána zvýšená hladina melatoninu oproti hodnotám naměřeným po 10 minutách působení o 11,73 %. V následujícím odběrovém čase, kdy emitátor již nesvítil 30 minut, bylo naměřeno zvýšení hladiny melatoninu oproti hodnotám naměřených po 10 minutách působení o 17,02%. Naše výsledky se neshodují se studií, kde prokázali 36% pokles ještě po hodinovém působení podobného emitátoru. Využívali zde světlo o vlnové délce 527 nm a intenzitě 85 W/m<sup>2</sup>, což je výrazně vyšší intenzita než je použita v našich experimentech (Figueiro and Rea, 2012).

Většina studií se shoduje na tom, že nejvyšší citlivost melanopsinu v ipRGC je pro světlo mezi 450-485 nm (Brainard et al., 2001; Thapan et al., 2001; Hattar et al. 2016). Z křivky spektrální citlivosti fotoreceptorů i ipRGC je ale zřejmé, že i jiné vlnové délky mohou

aktivovat neobrazové vidění, i když je zapotřebí větší intenzity pro vyvolání shodných účinků se světlem modrým. Naše výsledky to podporují a ukazují, že zelené světlo o stejné intenzitě jako modré také snižuje hladinu melatoninu, ale v menší míře. Lze také očekávat, že pokud působení modrého světla umožní návrat hladiny melatoninu k normálním nočním hodnotám, bude tento efekt také patrný při působení zeleného světla. Částečné potlačení hladiny melatoninu při účinku zeleného světla může být také následek propojení ipRGC s čípkou (Berson et al., 2002; Lockley et al., 2003; Cao et al., 2007).

Naše výsledky ukazují, že při používání světelného emitátoru zeleného světla k léčbě diabetické retinopatie může dojít k přechodnému potlačení hladiny melatoninu a je možné, že toto světlo může indukovat také fázový posun cirkadiánní rytmicity. Dlouhodobé používání tohoto přístroje by tedy mohlo mít nežádoucí účinky na organismus a je zapotřebí dalších studií, které zpřesní míru těchto nežádoucích účinků na cirkadiánní systém.

Potlačení syntézy melatoninu světlem může ovlivňovat řada faktorů. Přenos světla optickými strukturami oka se například mění s věkem. Nejvíce je omezen přenos světla o krátkých vlnových délkách v důsledku žlutého zakalení čočky v průběhu života (Dillon et al., 2004; Herljevic et al., 2005; Kessel, et al., 2010). V naší studii nebyl věkový rozdíl mezi skupinami významný a dobrovolníci byli mladí, je třeba brát v úvahu, že použití emitátorů u starších osob může mít účinky nižší. Dobrovolníci ve studii byli poučeni, aby v průběhu pokusu neotvírali oči, přesto mohl dobrovolník otevřít oči během intervalu zapnutého emitátoru a vystavit se většímu množství světla v celé době expozice než ostatní subjekty. Lze předpokládat, že vyšší intenzita světla by vedla k delší době snížené syntézy melatoninu. Naše výsledky ale nenaznačují, že by podobná chyba mohla naše výsledky ovlivnit.

Získané výsledky společně dokazují, že krátkovlnný kontinuální světelný pulz je schopen působením skrz oční víčka snížit hladinu melatoninu, a pravděpodobně tedy ovlivnit i cirkadiánní fázi. Tyto znalosti mohou být potenciálně použity pro vývoj zařízení, které by bylo možné využít pro neinvazivní léčbu cirkadiánních rytmů. Pro tyto účely je lepší využít modré světlo, kterým lze dosáhnout změn v cirkadiánním systému při velmi nízké intenzitě. Naopak při využití zeleného světla pro jiné terapeutické účely, je třeba uvažovat o vlivu na cirkadiánní systém jako o nežádoucím vedlejším účinku.





## 7. Závěr

Tato práce potvrdila, že vystavení krátkovlnnému světlu v noci přes zavřená víčka má dopad na lidský cirkadiánní systém. Potvrdili jsme účinek kontinuálního působení modrého (455 nm) i zeleného světla (505 nm) na hladinu melatoninu, které vyvolaly okamžitý pokles již po 10 minutách. Modrá a zelená složka světla působí na hladinu melatoninu s rozdílnou účinností. Největší změna byla naměřena u pulzu modrého světla, který vyvolal 51,58 % pokles maximální hladiny melatoninu. Potvrdili jsme výsledek dosavadních studií, že cirkadiánní systém je nejcitlivější na modré kontinuální světlo. Naopak u působení intermitentního modrého světla jsme účinek na cirkadiánní systém nepotvrdili.

Tyto znalosti mohou být potenciálně použity pro vývoj zařízení, které by bylo možné využít pro neinvazivní léčbu cirkadiánních rytmů.

## Literatura

- Abrahamson, Eric E., and Robert Y. Moore. 2001. "Suprachiasmatic Nucleus in the Mouse: Retinal Innervation, Intrinsic Organization and Efferent Projections." *Brain Research* 916 (1–2): 172–91.
- Anderson, Robert, Laurence Rapp, and Rex Wiegand. 1993. "Lipid Peroxidation and Retinal Degeneration" 12 (4): 293–301.
- Ando, Katsuhisa, Roger J Cole, Jeffrey A Elliott, and Daniel F. Kripke. 1999. "LIGHT MASK 500 LUX TREATMENT FOR DELiWED SLEEP PHASE SYNDROME."
- Ando, Katsuhisa, and Daniel F. Kripke. 1996. "Light Attenuation by the Human Eyelid." *Biological Psychiatry* 39 (1): 22–25.
- Arden, G. B., S. Jyothi, C. H. Hogg, Y. F. Lee, and S. Sivaprasad. 2011. "Regression of Early Diabetic Macular Oedema Is Associated with Prevention of Dark Adaptation." *Eye* 25 (12): 1546–54.
- Axelrod J, Wurtman RJ, Snyder SH. 1965. "Control of Hydroxyindole the Rat Pineal Gland by Environmental Activity Lighting." *Journal of Biological Chemistry* 240 (2): 949–54.
- Axelrod, Julius. 1974. "The Pineal Gland a Neurochemical Transducer." 274 (5287): 1187–91.
- Badia, P., B. Myers, M. Boecker, J. Culpepper, and J.R. Harsh. 1991. "Bright Light Effects on Body Temperature, Alertness, EEG and Behavior." *Physiology & Behavior* 50 (3): 583–88.
- Benloucif, Susan, Monica I. Masana, Ken Yun, and Margarita L. Dubocovich. 1999. "Interactions between Light and Melatonin on the Circadian Clock of Mice." *Journal of Biological Rhythms* 14 (4): 281–89.
- Benloucif, Susan, D Ph, Helen J Burgess, D Ph, Elizabeth B Klerman, D Ph, Alfred J Lewy, et al. 2008. "Measuring Melatonin in Humans" 4 (1): 6–9.
- Bernard, M, P M Iuvone, V M Cassone, P H Roseboom, S L Coon, and D C Klein. 1997. "Avian Melatonin Synthesis: Photic and Circadian Regulation of Serotonin N-Acetyltransferase mRNA in the Chicken Pineal Gland and Retina." *Journal of Neurochemistry* 68 (1): 213–24.
- Berson, David M., A. Felice Dunn, and Motoharu Takao. 2002. "Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock." *Science* 295 (5557): 1070–73.
- Bierman, Andrew, Mariana G. Figueiro, and Mark S. Rea. 2011. "Measuring and Predicting Eyelid Spectral Transmittance." *Journal of Biomedical Optics* 16 (6): 067011..
- Bojkowski. 1987. "Suppression of Nocturnal Plasma Melatonin and 6-Sulphatoxymelatonin by Bright and Dim Light in Man.Pdf."

Bordet, R., D. Devos, S. Brique, Y. Touitou, J. D. Guieu, C. Libersa, and A. Destée. 2003. "Study of Circadian Melatonin Secretion Pattern at Different Stages of Parkinson's Disease." *Clinical Neuropharmacology* 26 (2): 65–72.

Brainard, G C, J P Hanifin, J M Greeson, B Byrne, G Glickman, E Gerner, and M D Rollag. 2001. "Action Spectrum for Melatonin Regulation in Humans: Evidence for a Novel Circadian Photoreceptor." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (16): 6405–12.

Brainard, George C., Alfred Lewy, H Fredrickson, and G Weleber. 1993. "Effect of Light Wavelength on the Suppression of Nocturnal Plasma Melatonin in Normal Volunteers" 0344: 376–78.

Brainard, George C., Bruce A. Richardson, Larry J. Petterborg, and Russel J. Reiter. 1982. "The Effect of Different Light Intensities on Pineal Melatonin Content." *Brain Research* 233 (1): 75–81.

Brainard, George C, P John, Benjamin Warfield, Marielle K Stone, Mary E James, Melissa Ayers, Alan Kubey, Brenda Byrne, and Mark Rollag. 2015. "Short-Wavelength Enrichment of Polychromatic Light Enhances Human Melatonin Suppression Potency," 352–61..

Brainard, George, John P Hanifin, Marielle K Stone, Mary E James, Brenda Byrne, and Mark Rollag. 2015. "Short-Wavelength Enrichment of Polychromatic Light Enhances Human Melatonin Suppression Potency."

Breen, David P., Romina Vuono, Upekshani Nawarathna, Kate Fisher, John M. Shneerson, Akhilesh B. Reddy, and Roger A. Barker. 2015. "Sleep and Circadian Rhythm Regulation on Early Parkinsons Disease," 28–30.

Burgess, Helen J, Natasha Savic, Tracey Sletten, Gregory Roach, Saul S Gilbert, Drew Dawson, J Helen, et al. 2010. "The Relationship Between the Dim Light Melatonin Onset and Sleep on a Regular Schedule in Young Healthy Adults The Relationship Between the Dim Light Melatonin Onset and Sleep on a Regular Schedule in Young Healthy Adults," no. 935315210: 37–41.

Burkhart, Kimberly, James R Phelps, and Samaritan Mental Health. 2009. "Amber Lenses to Block Blue Light and Improve Sleep: A Randomized Trial" 26 (8): 1602–12.

Cajochen, Christian, Derk-jan Dijk, and Alexander A Borbeiy. 1992. "Dynamics of EEG Slow-Wave Activity and Core Body Temperature in Human Sleep After Exposure to Bright Light." *Sleep* 25 (June 2017).

Cajochen, Christian, Mirjam Mu, Szymon Kobialka, Kurt Kra, Roland Steiner, and Peter Oelhafen. 2005. "High Sensitivity of Human Melatonin , Alertness , Thermoregulation , and Heart Rate to Short Wavelength Light" 90 (3): 1311–16.

- Cajochen, Christian, Jamie M Zeitzer, Charles A Czeisler, and Derk-Jan Dijk. 2000. “Dose-Response Relationship for Light Intensity and Ocular and Electroencephalographic Correlates of Human Alertness/relates of Human Alertness.” *Behavioural Brain Research* 115: 75–83.
- Cao, Dingcai, Andrew J Zele, and Joel Pokorny. 2007. “Linking Impulse Response Functions to Reaction Time : Rod and Cone Reaction Time Data and a Computational Model” 47: 1060–74.
- Carrillo-Vico, Antonio, Juan R. Calvo, Pedro Abreu, Patricia J. Lardone, Sofía García-Mauriño, Russel J. Reiter, and Juan M. Guerrero. 2004. “Evidence of Melatonin Synthesis by Human Lymphocytes and Its Physiological Significance: Possible Role as Intracrine, Autocrine, and/or Paracrine Substance.” *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (3): 537–39.
- Castel, M., M. Belenky, S. Cohen, O. P. Ottersen, and J. Storm-Mathisen. 1993. “Glutamate-like Immunoreactivity in Retinal Terminals of the Mouse Suprachiasmatic Nucleus.” *European Journal of Neuroscience* 5 (4): 368–81.
- Cauter, E V E V A N, Jeppe Sturis, Maria M Byrne, John D Blackman, Gilad Ofek, Fred W Turek, Van Cauter, et al. 1994. “Demonstration of the Human of Rapid Light-Induced Advances and Delays Circadian Clock Using Hormonal Phase Markers.”
- Chang, Anne-Marie, Frank A. J. L. Scheer, Charles A. Czeisler, and Daniel Aeschbach. 2013a. “Direct Effects of Light on Alertness, Vigilance, and the Waking Electroencephalogram in Humans Depend on Prior Light History.” *Sleep* 36 (8): 1239–46.
- Charman, W. N. 2003. “Age, Lens Transmittance, and the Possible Effects of Light on Melatonin Suppression.” *Ophthalmic and Physiological Optics* 23 (2): 181–87.
- CHIK, C. L., A. TALALLA, and G. M. BROWN. 1985. “Effect of Pinealectomy on Serum Melatonin, Luteinizing Hormone and Prolactin: A Case Report.” *Clinical Endocrinology* 23 (4): 367–72.
- Claustrat, Bruno, Jocelyne Brun, and Guy Chazot. 2005. “The Basic Physiology and Pathophysiology of Melatonin.” *Sleep Medicine Reviews* 9 (1): 11–24.
- Cole, Roger J, Julian S Smith, Yvonne C Alcalá, Jeffrey A Elliott, and Daniel F Kripke. 2002. “Bright-Light Mask Treatment of Delayed Sleep Phase Syndrome” 17 (1).
- Conti, a, S Conconi, E Hertens, K Skwarlo-Sonta, M Markowska, and J M Maestroni. 2000. “Evidence for Melatonin Synthesis in Mouse and Human Bone Marrow Cells.” *Journal of Pineal Research* 28 (4): 193–202.
- Czeisler, Charles A, Jeanne F Duffy, Theresa L Shanahan, Emery N Brown, Jude F Mitchell, David W Rimmer, Joseph M Ronda, et al. 1999. “Stability , Precision , and Near – 24-Hour Period of the Human Circadian Pacemaker.” *Science* 284 (JUNE): 2177–82.

- Damiola, F., N. Le Minli, N. Preitner, B. Kornmann, F. Fleury-Olela, and U. Schibler. 2000. "Restricted Feeding Uncouples Circadian Oscillators in Peripheral Tissues from the Central Pacemaker in the Suprachiasmatic Nucleus." *Genes and Development* 14 (23): 2950–61.
- De Girolami, U., M. Fèvre-Montange, D. Seilhean, and A. Jouvet. 2008. "Pathology of Tumors of the Pineal Region." *Revue Neurologique* 164 (11): 882–95.
- Dillon, James, Lei Zheng, John C Merriam, and Elizabeth R Gaillard. 2004. "Transmission of Light to the Aging Human Retina : Possible Implications for Age Related Macular Degeneration" 79: 753–59.
- Drasdo, N., Z. Chiti, D. R. Owens, and R. V. North. 2002. "Effect of Darkness on Inner Retinal Hypoxia in Diabetes." *Lancet* 359 (9325): 2251–53.
- Drew, J E, P Barrett, J G Mercer, K M Moar, E Canet, P Delagrang, and P J Morgan. 2001. "Localization of the Melatonin-Related Receptor in the Rodent Brain and Peripheral Tissues" 13: 453–58.
- Drijfhout, W J, a G van der Linde, S E Kooi, C J Grol, and B H Westerink. 1996. "Norepinephrine Release in the Rat Pineal Gland: The Input from the Biological Clock Measured by in Vivo Microdialysis." *Journal of Neurochemistry* 66 (2): 748–55.
- Figueiro, Mariana G., Andrew Bierman, and Mark S. Rea. 2013. "A Train of Blue Light Pulses Delivered through Closed Eyelids Suppresses Melatonin and Phase Shifts the Human Circadian System," 133–41.
- Figueiro, Mariana G, and Mark S Rea. 2012. "Preliminary Evidence That Light through the Eyelids Can Suppress Melatonin and Phase Shift Dim Light Melatonin Onset."
- Fourtillan, J. B., A. M. Brisson, P. Gobin, I. Ingrand, J. P. Decourt, and J. Girault. 2000. "Bioavailability of Melatonin in Humans after Day-Time Administration of D7melatonin." *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 21 (1): 15–22.
- Fredriksson, R. 2003. "The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families." *Molecular Pharmacology* 63 (6): 1256–72.
- Gekakis, Nicholas, David Staknis, Hubert B Nguyen, Fred C Davis, Lisa D Wilsbacher, David P King, Joseph S Takahashi, and Charles J Weitz. 1998. "Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism" 280 (June): 6.
- Gerdin, Matthew J, Monica I Masana, Moisés a Rivera-Bermúdez, Randall L Hudson, David J Earnest, Martha U Gillette, and Margarita L Dubocovich. 2004. "Melatonin Desensitizes Endogenous MT2 Melatonin Receptors in the Rat Suprachiasmatic Nucleus: Relevance for Defining the Periods of Sensitivity of the Mammalian Circadian Clock to Melatonin." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (14): 1646–56.

- Gest, Stephanie, Martin Holtmann, Sarah Bogen, Carina Schulz, Benjamin Pniewski, and Tanja Legenbauer. 2016. "Chronotherapeutic Treatments for Depression in Youth." *European Child & Adolescent Psychiatry* 25 (2). Springer Berlin Heidelberg: 151–61.
- Gooley, Joshua J, Shantha M W Rajaratnam, George C Brainard, Richard E Kronauer, Charles A Czeisler, and Steven W Lockley. 2010. "Spectral Responses of the Human Circadian System Depend on the Irradiance and Duration of Exposure to Light."
- Guo, H., J. M. Brewer, M. N. Lehman, and E. L. Bittman. 2006. "Suprachiasmatic Regulation of Circadian Rhythms of Gene Expression in Hamster Peripheral Organs: Effects of Transplanting the Pacemaker." *Journal of Neuroscience* 26 (24): 6406–12.
- Hajak, G, a Rodenbeck, J Staedt, B Bandelow, G Huether, and E R  ther. 1995. "Nocturnal Plasma Melatonin Levels in Patients Suffering from Chronic Primary Insomnia." *Journal of Pineal Research* 19 (3): 116–22
- Hannibal, Jens, Niels Vrang, J. Patrick Card, and Jan Fahrenkrug. 2001. "Light-Dependent Induction of CFos during Subjective Day and Night in PACAP-Containing Ganglion Cells of the Retinohypothalamic Tract." *Journal of Biological Rhythms* 16 (5): 457–70.
- Hattar, Author S, H Liao, M Takao, D M Berson, and K Yau. 2016. "Melanopsin-Containing Retinal Ganglion Cells : Architecture , Projections , and Intrinsic" 295 (5557): 1065–70.
- Hayaishy, Osamu, and Fusao Hirata. 1974. "In Vitro and in Vivo Formation of Two New Metabolites of Melatonin." 249 (4): 1311–13.
- Heckenlively, J. R. 2011. "New Concept: Treating Nonproliferative Diabetic Retinopathy with Light Adaptation of Rods during Sleep." *Eye* 25 (12). Nature Publishing Group: 1533–34.
- Herljevic, Mirela, Benita Middleton, Kavita Thapan, and Debra J Skene. 2005. "Light-Induced Melatonin Suppression : Age-Related Reduction in Response to Short Wavelength Light" 40: 237–42.
- Hickman, Alison Burgess, David C. Klein, and Fred Dyda. 1999. "Melatonin Biosynthesis: The Structure of Serotonin N-Acetyltransferase at 2.5 A Resolution Suggests a Catalytic Mechanism." *Molecular Cell* 3 (1): 23–32.
- Hr, Wright, Lack Lc, Partridge Kj, Helen R Wright, Leon C Lack, and Kelly J Partridge. 2001. "Light Emitting Diodes Can Be Used to Phase Delay the Melatonin Rhythm," 350–55.
- Hu, Caiping, Dijon D Hill, and Kwoon Y Wong. 2013. "Intrinsic Physiological Properties of the Five Types of Mouse Ganglion-Cell Photoreceptors," 1876–89.
- Illnerova, H, J Vanecek, and K Hoffmann. 1989. "Different Mechanisms of Phase Delays and Phase Advances of the Circadian Rhythm in Rat Pineal N-Acetyltransferase Activity." *J.Biol.Rhythms* 4 (2): 187–200.

- Isobe, Yoshiaki, and Hitoo Nishino. 2004. "Signal Transmission from the Suprachiasmatic Nucleus to the Pineal Gland via the Paraventricular Nucleus: Analysed from Arg-Vasopressin Peptide, RPer2 mRNA and AVP mRNA Changes and Pineal AA-NAT mRNA after the Melatonin Injection during Light and Dark Periods." *Brain Research* 1013 (2): 204–11.
- Jouvet, A., E. Derrington, J. Pialat, C. Lapras, M. Fèvre-Montange, R. Besançon, M. F. Belin, and G. Saint-Pierre. 1994. "Structural and Ultrastructural Characteristics of Human Pineal Gland, and Pineal Parenchymal Tumors." *Acta Neuropathologica* 88 (4): 334–48.
- Kalsbeek, Andries, Marie Laure Garidou, Inge F. Palm, Jan Der Van Vliet, Valérie Simonneaux, Paul Pevet, and Ruud M. Buijs. 2000. "Melatonin Sees the Light: Blocking GABA-Ergic Transmission in the Paraventricular Nucleus Induces Daytime Secretion of Melatonin." *European Journal of Neuroscience* 12 (9): 3146–54.
- Karasek, M., E. Karasek, and H. Stepien. 1978. "Effect of Castration on the Concentration of Adenosine 3', 5'-Monophosphate in the Rat Pineal Organ." *Journal of Neural Transmission* 42 (2): 145–49.
- Kessel, Line, Jesper Holm Lundeman, and Kristina Herbst. 2010. "Age-Related Changes in the Transmission Properties of the Human Lens and Their Relevance to Circadian Entrainment." *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 36 (2). ASCRS and ESCRS: 308–12.
- Klein, Barbara E K, Scot E Moss, and Ronald Klein. 1990. "Effect of Pregnancy on Progression of Diabetic Retinopathy." *Diabetes Care* 13 (1): 34–40.
- Kohner, Eva, Vinod Patel, and Salwan Rassam. 1995. "Role of Blood Flow and Impaired Autoregulation in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy." *Journal of the National Medical Association* 54 (1): 476–78.
- Kumar, Pragati, Medha Tatke, Ajay Sharma, and Daljit Singh. 2006. "Histological Analysis of Lesions of the Pineal Region: A Retrospective Study of 12 Years." *Pathology Research and Practice* 202 (2): 85–92.
- Laakso, Maija-Liisa -L, Taina Hätönen, Dag Stenberg, Aino Alila, and Sabrina Smith. 1993. "One-hour Exposure to Moderate Illuminance (500 Lux) Shifts the Human Melatonin Rhythm." *Journal of Pineal Research* 15 (1): 21–26.
- Laakso, Maija Liisa, Tarja Porkka Heiskanen, Dag Stenberg, Aino Alila, Maija-liisa Laakso, Tarja Porkka-heiskanen, Dag Stenberg, and Aino Alila. 1994. "Suppression of Human Melatonin by Light over the Course of the Rising Phase of the Synthesis" 1016 (February).
- Lack, Leon, Michelle Bailey, Nicole Lovato, and Helen Wright. 2009. "Chronotype Differences in Circadian Rhythms of Temperature, Melatonin, and Sleepiness as Measured in a Modified Constant Routine Protocol." *Nature and Science of Sleep* 1: 1–8.



- Lam, Raymond W., Alan L. Berkowitz, Sarah L. Berga, Campbell M. Clark, Daniel F. Kripke, and J. Christian Gillin. 1990. "Melatonin Suppression in Bipolar and Unipolar Mood Disorders." *Psychiatry Research* 33 (2): 129–34. doi:10.
- Lee, Grotta., R Holloway, Wm, and Gregory M. Brown. 1982. "24- Hour Rhythm of Hypothalamic Melatonin Immunofluorescence Correlates with Serum and Retinal Melatonin Rhythms."
- Lehnkering, Hanna, and Renate Siegmund. 2007. "Influence of Chronotype, Season, and Sex of Subject on Sleep Behavior of Young Adults." *Chronobiology International* 24 (5): 875–88.
- Lerner, Aaron B., James D. Case, Yoshiyata Takahashi, Teh H. Lee, and Wataru Mori. 1958. "Isolation of Melatonin, the Pineal Gland Factor That Lightens Melanocytes." *Journal of the American Chemical Society* 80 (10): 2587.
- Levitt, Anthony J, Raymond W Lam, and Robert Levitan. 2002. "A Comparison of Open Treatment of Seasonal Major and Minor Depression with Light Therapy" 71: 243–48.
- Lewy, Alfred J., and Robert L. Sack. 1989. "The Dim Light Melatonin Onset as a Marker for Circadian Phase Position." *Chronobiology International* 6 (1): 93–102.
- Lewy, Alfred J., Thomas A. Wehr, Frederick K. Goodwin, David A. Newsome, and Norman E. Rosenthal. 1981. "Manic-Depressive Patients May Be Supersensitive To Light." *The Lancet* 317 (8216): 383–84.
- Lewy, Alfred, and Thomas Wehr. 1980. "Light Suppresses Melatonin Secretion in Humans.," no. September: 11–13.
- Liu, Chen, David R. Weaver, Xiaowei Jin, Lauren P. Shearman, Rick L. Pieschl, Valentin K. Gribkoff, and Steven M. Reppert. 1997. "Molecular Dissection of Two Distinct Actions of Melatonin on the Suprachiasmatic Circadian Clock." *Neuron* 19 (1): 91–102.
- Lockley, Steven W., George C. Brainard, and Charles A. Czeisler. 2003. "High Sensitivity of the Human Circadian Melatonin Rhythm to Resetting by Short Wavelength Light." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88 (9): 4502–5.
- Lucas, R. J., S. Hattar, M. Takao, D. M. Berson, R. G. Foster, and K. W. Yau. 2003. "Diminished Pupillary Light Reflex at High Irradiances in Melanopsin-Knockout Mice." *Science* 299 (5604): 245–47.
- Maestroni, Georges J.M., Ario Conti, and Walter Pierpaoli. 1986. "Role of the Pineal Gland in Immunity Circadian Synthesis and Release of Melatonin Modulates the Antibody Response and Antagonizes the Immunosuppressive Effect of Corticosterone." *Journal of Neuroimmunology* 13 (1): 19–30.
- Mahowald, Mark W., and Carlos H. Schenck. 2010. *REM Sleep Parasomnias. Principles and Practice of Sleep Medicine: Fifth Edition.* Fifth Edition. Elsevier Inc.

- Májovský, Martin, Lenka Řezáčová, Alena Sumová, Lenka Pospíšilová, David Netuka, Ondřej Bradáč, and Vladimír Beneš. 2017. "Melatonin and Cortisol Secretion Profile in Patients with Pineal Cyst before and after Pineal Cyst Resection." *Journal of Clinical Neuroscience* 39: 155–63..
- McIntyre, IM; Norman, TR; Burrows, GD; Armstrong, SM. 1989. "Human Melatonin Supression by Light Is Intensity Dependent." *Journal of Pineal Research* 6 (2): 149–56.
- McIntyre, Iain M., Trevor R. Norman, Graham D. Burrows, and Stuart M. Armstrong. 1989. "Quantal Melatonin Suppression by Exposure to Low Intensity Light in Man." *Life Sciences* 45 (4): 327–32.
- McIntyre, Ian M., Trevor R. Norman, Graham D. Burrows, and Stuart M. Armstrong. 1989. "Human Melatonin Response to Light at Different Times of the Night." *Psychoneuroendocrinology* 14 (3): 187–93.
- Meesters, Ybe, Wianne B Duijzer, and Vanja Hommes. 2018. "The Effects of Low-Intensity Narrow-Band Blue-Light Treatment Compared to Bright White-Light Treatment in Seasonal Affective Disorder." *Journal of Affective Disorders* 232 (January). Elsevier B.V.: 48–51.
- Melyan, Z., E. E. Tarttelin, J. Bellingham, R. J. Lucas, and M. W. Hankins. 2005. "Addition of Human Melanopsin Renders Mammalian Cells Photoresponsive." *Nature* 433 (7027): 741–45.
- Messner, Michael, Gerald Huether, Thomas Lorf, Giuliano Ramadori, and Harald Schwörer. 2001. "Presence of Melatonin in the Human Hepatobiliary-Gastrointestinal Tract." *Life Sciences* 69 (5): 543–51.
- Minneman, Kenneth P., Harry Lynch, and Richard J. Wurtman. 1974. "Relationship between Environmental Light Intensity and Retina-Mediated Suppression of Rat Pineal Serotonin-n-Acetyl-Transferase." *Life Sciences* 15 (10): 1791–96.
- Minors, David S., James M. Waterhouse, and Anna Wirz-Justice. 1991. "A Human Phase-Response Curve to Light." *Neuroscience Letters* 133 (1): 36–40.
- Miyamoto, Y, and A Sancar. 1998. "Vitamin B2-Based Blue-Light Photoreceptors in the Retinohypothalamic Tract as the Photoactive Pigments for Setting the Circadian Clock in Mammals." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (11): 6097–6102.
- Moore, Robert Y., Joan C. Speh, and Rehana K. Leak. 2002. "Suprachiasmatic Nucleus Organization." *Cell and Tissue Research* 309 (1): 89–98.
- Morin, Lawrence P., and Jane H. Blanchard. 2001. "Neuromodulator Content of Hamster Intergeniculate Leaflet Neurons and Their Projection to the Suprachiasmatic Nucleus or Visual Midbrain." *Journal of Comparative Neurology* 437 (1): 79–90.
- Moseley, M.J., S.C. Bayliss, and A.R. Fielder. 1988. "Light Transmission through the Human Eyelid: In Vivo Measurement." *Ophthal. Physiol. Opt.* 8: 229–30..

Najjar, Raymond P, Luzian Wolf, Jacques Taillard, Luc J M Schlangen, Alex Salam, Christian Cajochen, and Claude Gronfier. 2014. "Chronic Artificial Blue-Enriched White Light Is an Effective Countermeasure to Delayed Circadian Phase and Neurobehavioral Decrements" 9 (7).

Nelson, Dwight, and Joseph S. Takahashi. 1991. "Sensitivity and Integration in a Visual Pathway for Circadian Entrainment in the Hamster (*Mesocricetus Auratus*)." *Physiology*, 115–45.

Newman, Lucy A., Marquis T. Walker, R. Lane Brown, Thomas W. Cronin, and Phyllis R. Robinson. 2003. "Melanopsin Forms a Functional Short-Wavelength Photopigment." *Biochemistry* 42 (44): 12734–38.

Niwa, Fumitoshi, Nagato Kuriyama, Masanori Nakagawa, and Jiro Imanishi. 2011. "Circadian Rhythm of Rest Activity and Autonomic Nervous System Activity at Different Stages in Parkinson's Disease." *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 165 (2). Elsevier B.V.: 195–200.

Nosjean, Olivier, Myriam Ferro, Francis Cogé, Philippe Beauverger, Jean Michel Henlin, François Lefoulon, Jean Luc Fauche, Philippe Delagrange, Emmanuel Canet, and Jean A. Boutin. 2000. "Identification of the Melatonin-Binding Site MT3 as the Quinone Reductase 2." *Journal of Biological Chemistry* 275 (40): 31311–17.

Ohashi, Y, N Okamoto, K Uchida, M Iyo, N Mori, and Y Morita. 1999. "Daily Rhythm of Serum Melatonin Levels and Effect of Light Exposure in Patients with Dementia of the Alzheimer's Type." *Biol.Psychiatry* 45 (12): 1646–52.

Ozawa, Mika, Yoshiharu Minoshima, Hisatoshi Saito, and Hiroshi Abe. 1995. "Magnetic Resonance Images Reveal a High Incidence of Asymptomatic Pineal Cysts in Young Women" 37 (1).

Panda, Satchidananda, Ignacio Provencio, Daniel C. Tu, Susana S. Pires, Mark D. Rollag, Ana Maria Castrucci, Mathew T. Pletcher, et al. 2003. "Melanopsin Is Required for Non-Image-Forming Photic Responses in Blind Mice." *Science* 301 (5632): 525–27.

Peirson, Stuart N., Henrik Oster, Sarah L. Jones, Michael Leitges, Mark W. Hankins, and Russell G. Foster. 2007. "Microarray Analysis and Functional Genomics Identify Novel Components of Melanopsin Signaling." *Current Biology* 17 (16): 1363–72.

Perreau-Lenz, Stéphanie, Andries Kalsbeek, Marie Laure Garidou, Joke Wortel, Jan Van Der Vliet, Caroline Van Heijningen, Valérie Simonneaux, Paul Pévet, and Ruud M. Buijs. 2003. "Suprachiasmatic Control of Melatonin Synthesis in Rats: Inhibitory and Stimulatory Mechanisms." *European Journal of Neuroscience* 17 (2): 221–28.

Pévet, Paul, and Etienne Challet. 2011. "Melatonin: Both Master Clock Output and Internal Time-Giver in the Circadian Clocks Network." *Journal of Physiology Paris* 105 (4–6). Elsevier Ltd: 170–82.

- Politis, Marios, Kit Wu, Sophie Molloy, Peter G. Bain, K. Ray Chaudhuri, and Paola Piccini. 2010. "Parkinson's Disease Symptoms: The Patient's Perspective." *Movement Disorders* 25 (11): 1646–51.
- Poon, A M, A S Mak, and H T Luk. 1996. "Melatonin and 2[125I]Iodomelatonin Binding Sites in the Human Colon." 22 (1): 77–94.
- Postuma, Ronald B., Anthony E. Lang, Jessica Massicotte-Marquez, and Jacques Montplaisir. 2006. "Potential Early Markers of Parkinson Disease in Idiopathic REM Sleep Behavior Disorder." *Neurology* 66 (6): 845–51.
- Provencio, Ig., G. Jiang, W. J. De Grip, W. P. Hayes, and M. D. Rollag. 1998. "Melanopsin: An Opsin in Melanophores, Brain, and Eye." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (1): 340–45.
- Provencio, Ignacio R. Rodriguez, Guisen Jiang, William Pär Hayes, Ernesto F. Moreira, and Mark D. Rollag. 2000. "A Novel Human Opsin in the Inner Retina." *The Journal of Neuroscience* 20 (2): 600–605.
- Reiter, Russel, Dun Tan, Emilio SanchezBarcelo, Maria Mediavilla, Eloisa Gitto, and Ahmet Korkmaz. 2011. "Circadian Mechanisms in the Regulation of Melatonin Synthesis: Disruption with Light at Night and the Pathophysiological Consequences." *Journal of Experimental and Integrative Medicine* 1 (1): 13..
- Reppert, Steven M., David R. Weaver, and Takashi Ebisawa. 1994. "Cloning and Characterization of a Mammalian Melatonin Receptor That Mediates Reproductive and Circadian Responses." *Neuron* 13 (5): 1177–85.
- Reuss, S, and H Schroder. 1987. "Neuropeptide Y Effects on Pineal Melatonin Synthesis in the Rat." *Neuroscience Letters* 74: 158–62.
- Revell, Victoria L, and Debra J Skene. 2007. "Light - Induced Melatonin Suppression in Humans with Polychromatic and Monochromatic Light," no. February.
- Robillard, R., S. L. Naismith, N. L. Rogers, E. M. Scott, T. K C Ip, D. F. Hermens, and I. B. Hickie. 2013. "Sleep-Wake Cycle and Melatonin Rhythms in Adolescents and Young Adults with Mood Disorders: Comparison of Unipolar and Bipolar Phenotypes." *European Psychiatry* 28 (7).
- Robinson, Judith, Susan C. Bayliss, and Alistair R. Fielder. 1991. "Transmission of Light across the Adult and Neonatal Eyelid in Vivo." *Vision Research* 31 (10): 1837–40.
- Sasseville, Alexandre. 2006. "Blue Blocker Glasses Impede the Capacity of Bright Light to Suppress Melatonin Production," 73–78.
- Satake, Nobuhiro, Hiroshi Oe, and Shoji Shibata. 1991. "Vasorelaxing Action of Melatonin in Rat Isolated Aorta; Possible Endothelium Dependent Relaxation." *General Pharmacology* 22 (6): 1127–33.

Schenck, Carlos H., Bradley F. Boeve, and Mark W. Mahowald. 2013. "Delayed Emergence of a Parkinsonian Disorder or Dementia in 81% of Older Men Initially Diagnosed with Idiopathic Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder: A 16-Year Update on a Previously Reported Series." *Sleep Medicine* 14 (8). Elsevier B.V.: 744–48.

Shinohara, K., K. Tominaga, C. Fukuhara, Y. Otori, and S. I.T. Inouye. 1993a. "Processing of Photic Information within the Intergeniculate Leaflet of the Lateral Geniculate Body: Assessed by Neuropeptide Y Immunoreactivity in the Suprachiasmatic Nucleus of Rats." *Neuroscience* 56 (4): 813–22.

Shinohara, K, K Tominaga, Y Isobe, and S T Inouye. 1993b. "Photic Regulation of Peptides Located in the Ventrolateral Subdivision of the Suprachiasmatic Nucleus of the Rat: Daily Variations of Vasoactive Intestinal Polypeptide, Gastrin-Releasing Peptide, and Neuropeptide Y." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 13 (2): 793–800.

Sivaprasad, Sobha, Joana C Vasconcelos, A Toby Prevost, Helen Holmes, Philip Hykin, Sheena George, Caroline Murphy, and Joanna Kelly. 2018. "Clinical Efficacy and Safety of a Light Mask for Prevention of Dark Adaptation in Treating and Preventing Progression of Early Diabetic Macular Oedema at 24 Months ( CLEOPATRA ): A Multicentre , Phase 3 , Randomised Controlled Trial" 6 (May).

Skinner, D. C., and B. Malpoux. 1999. "High Melatonin Concentrations in Third Ventricular Cerebrospinal Fluid Are Not Due to Galen Vein Blood Recirculating through the Choroid Plexus." *Endocrinology* 140 (10): 4399–4405.

Smith, Mark R, Victoria L Revell, and Charmane I Eastman. 2009. "Phase Advancing the Human Circadian Clock with Blue-Enriched Polychromatic Light." *Sleep Medicine* 10 (3). Elsevier B.V.: 287–94.

Stephan, F K, and I Zucker. 1972. "Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69 (6): 1583–86.

Sulzman, Frank M., Charles A. Fuller, and Martin C. Moore-Ede. 1977. "Feeding Time Synchronizes Primate Circadian Rhythms." *Physiology and Behavior* 18 (5): 775–79.

Tan, D.-X., L C Manchester, R J reiter, B F Plummer, L J Hardies, S T Weintraub, Vijayalaxmi, and A M M Shepherd. 1998. "A Novel Melantonin Metabolite, Cyclic 3-Hydroxymelantonin: A Biomarker of in Vivo Hydroxyl Radical Generation." *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 253: 614–20.

Tapp, E, and Marianne Huxley. 1972. "The Histological Appearance of the Human Pineal Gland from Puberty to Old Age" 108.

Tapp, Edmund. 1979. "The Histology and Pathology of the Human Pineal Gland." *Progress in Brain Research* 52 (C): 481–500.

- Thapan, Kavita, Josephine Arendt, and Debra J Skene. 2001. "An Action Spectrum for Melatonin Suppression: Evidence for a Novel Non-Rod , Non-Cone Photoreceptor System in Humans," 261–67.
- Tosini, Gianluca, and Michael Menaker. 1998. "The Clock in the Mouse Retina: Melatonin Synthesis and Photoreceptor Degeneration." *Brain Research* 789 (2): 221–28.
- Turner, R., D. Matthews, a. Neil, and H. Mcelroy. 1998. "Tight Blood Pressure Control and Risk of Macrovascular and Microvascular Complications in Type 2 Diabetes: UKPDS 38." *British Medical Journal* 317: 703–13.
- Udaka, K, T J Tsomides, Martha Hotz Vitaterna, David P King, Anne-marie Chang, Jon M Kornhauser, Phillip L Lowrey, et al. 1994. "Mutagenesis and Mapping of a Mouse Gene, Clock, Essential for Circadian Behavior." *Science* 264 (April): 719–25.
- Van Leiden, Hendrik A., Jacqueline M. Dekker, Annette C. Moll, Giel Nijpels, Robert J. Heine, Lex M. Bouter, Coen D.A. Stehouwer, and Bettine C.P. Polak. 2002. "Blood Pressure, Lipids, and Obesity Are Associated with Retinopathy: The Hoorn Study." *Diabetes Care* 25 (8): 1320–25.
- Van Someren, Eus J.W., Eveline E.O. Hagebeuk, Cees Lijzenga, Philip Scheltens, Sophie E.J.A. De Rooij, Cees Jonker, Anne Margriet Pot, Majid Mirmiran, and Dick F. Swaab. 1996. "Circadian Rest-Activity Rhythm Disturbances in Alzheimer's Disease." *Biological Psychiatry* 40 (4): 259–70.
- Vandewalle, Gilles, Pierre Maquet, and Derk Jan Dijk. 2009. "Light as a Modulator of Cognitive Brain Function." *Trends in Cognitive Sciences* 13 (10): 429–38.
- Venegas, Carmen, José A. García, Germaine Escames, Francisco Ortiz, Ana López, Carolina Doerrier, Laura García-Corzo, Luis C. López, Russel J. Reiter, and Darío Acuña-Castroviejo. 2012. "Extrapineal Melatonin: Analysis of Its Subcellular Distribution and Daily Fluctuations." *Journal of Pineal Research* 52 (2): 217–27.
- Videnovic, Aleksandar, Charleston Noble, Kathryn J. Reid, Jie Peng, Fred W. Turek, Angelica Marconi, Alfred W. Rademaker, Tanya Simuni, Cindy Zadikoff, and Phyllis C. Zee. 2014. "Circadian Melatonin Rhythm and Excessive Daytime Sleepiness in Parkinson Disease." *JAMA Neurology* 71 (4): 463–69.
- Vivanco, P., V. Ortiz, M. A. Rol, and J. A. Madrid. 2007. "Looking for the Keys to Diurnality Downstream from the Circadian Clock: Role of Melatonin in a Dual-Phasing Rodent, Octodon Degus." *Journal of Pineal Research* 42 (3): 280–90.
- Waldhauser, Franz, Maria Waldhauser, Harris R. Lieberman, Mei Hua Deng, Harry J. Lynch, and Richard J. Wurtman. 1984. "Bioavailability of Oral Melatonin in Humans." *Neuroendocrinology* 39 (4): 307–13.

- Weissová, Kamila, Aleš Bartoš, Martin Sládek, Marta Nováková, and Alena Sumová. 2016. "Moderate Changes in the Circadian System of Alzheimer's Disease Patients Detected in Their Home Environment." *PLoS ONE* 11 (1): 1–19.
- Wever, R A, J Polásek, and C M Wildgruber. 1993. "Bright Light Affects Human Circadian Rhythms." *European Journal of Physiology* 396 (1983): 85–87.
- Whitehead, M. T., C. Oh, A. Raju, and Asim F. Choudhri. 2015. "Physiologic Pineal Region, Choroid Plexus, and Dural Calcifications in the First Decade of Life." *American Journal of Neuroradiology* 36 (3): 575–80.
- Wirz-Justice, Anna, Till Roenneberg, and Martha Merrow. 2003. "Life between Clocks: Daily Temporal Patterns of Human Chronotypes." *J Biol Rhythms* 18 (1): 80–90.
- Wright, Helen R, and Leon C Lack. 2001. "Effect of Light Wavelength on Suppression and Phase Delay of the Melatonin Rhythms" 18 (5): 801–8.
- Wurtman, Richard J. 1984. "Fall in Nocturnal Serum Melatonin during Prepuberty and Pubescence.," 362–65.
- Yamadera, H, T Ito, H Suzuki, K Asayama, R Ito, and S Endo. 2000. "Effects of Bright Light on Cognitive Disturbances in Alzheimer-Type Dementia." *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 54: 352–53.
- Ye, Rui, Christopher P. Selby, Nuri Ozturk, Yunus Annayev, and Aziz Sancar. 2011. "Biochemical Analysis of the Canonical Model for the Mammalian Circadian Clock." *Journal of Biological Chemistry* 286 (29): 25891–902. doi:10.1074/jbc.M111.254680.
- Yu, H. S., S. F. Pang, and P. L. Tang. 1981. "Increase in the level of retinal melatonin and persistence of its diurnal rhythm in rats after pinealectomy," no. 1979.
- Zaidi, Farhan H, Joseph T Hull, Stuart N Peirson, Katharina Wulff, Daniel Aeschbach, Joshua J Gooley, George C Brainard, et al. 2007. "Report Short-Wavelength Light Sensitivity of Circadian , Pupillary and Visual Awareness in Humans Lacking an Outer Retina," 2122–28.
- Zeitzer, Jamie M., Derk-Jan Dijk, Richard E. Kronauer, Emery N. Brown, and Charles A. Czeisler. 2000. "Sensitivity of the Human Circadian Pacemaker to Nocturnal Light, Melatonin Phase Resetting and Suppression." *Journal of Physiology* 526 (3): 695–702.
- Zhou, Jiang Ning, Rong Yu Liu, Wouter Kamphorst, Michel A. Hofman, and Dick F. Swaab. 2003. "Early Neuropathological Alzheimer's Changes in Aged Individuals Are Accompanied by Decreased Cerebrospinal Fluid Melatonin Levels." *Journal of Pineal Research* 35 (2): 125–30.
- Zylka, Mark J., Lauren P. Shearman, David R. Weaver, and Steven M. Reppert. 1998. "Three Period Homologs in Mammals: Differential Light Responses in the Suprachiasmatic Circadian Clock and Oscillating Transcripts Outside of Brain." *Neuron* 20 (6): 1103–10.

# Příloha 1

## *Porucha chování v REM spánku a melatonin (Weissová et al., v tisku)*

REM (rapid eye movement) je epizodická fáze spánku, charakterizována intenzitou mozkové činnosti na úrovni bdělosti, živými sny, rychlými očními pohyby a svalovou atonií. REM fáze zabírá asi 20-25 % celkové doby spánku a opakuje se během noc 4-5x. Celkový význam této fáze spánku není zcela objasněn, ale dle teorií slouží ke konsolidaci paměti, stimulaci neuronů během spánku během vývoje či regeneraci monoaminových receptorů (Nishida et al., 2008; Poe et al., 2000).

Porucha chování v REM spánku (RBD - REM sleep behavior disorder) je druh parasomnie, která se vyznačuje hlasovými vokalizacemi nebo atypickým motorickým chováním, které nastává kvůli ztrátě fyziologické svalové atonie (Mahowald and Schenck, 2010). Dosavadní studie naznačují, že u postižených s RBD může dojít k rozvoji neurodegenerativních chorob jako je Parkinsonova choroba. Bylo dokázáno, že až z 80% případů RBD postihne pacienty za průměrných 14 let tato choroba (Postuma et al., 2006; Schenck et al., 2013).

Narušení cirkadiálních rytmů může ovlivnit kvalitu spánku a zhoršit příznaky neurodegenerativních onemocnění. U mnoha pacientů s Parkinsonovou nemocí byla naměřena vysoká denní hladina melatoninu, která může vést k časté denní ospalosti. Ve srovnání s kontrolami byla celkově snižená amplituda a množství sekrece melatoninu (Videnovic et al., 2014). Narušení rytmů u těchto pacientů může být vyvolané již na úrovni hodinových genů nebo poškozením neuronů samotného SCN (Breen et al., 2015).

Cílem této studie bylo zjistit, zda jsou změny v koncentraci melatoninu patrné u Parkinsonovy nemoci, přítomny také u pacientů s RBD. Změny v cirkadiálním systému by mohly, ještě před vznikem motorických symptomů varovat před nástupem Parkinsonovy choroby.

## **Metody**

Mezi dobrovolníky bylo zařazeno 10 mužských pacientů, kteří byli léčeni s diagnózou RBD ve spánkové laboratoři v Národním ústavu duševního zdraví (NUDZ). Pacienti podstoupili pohovor, komplexní neurologické vyšetření a polysomnografické vyšetření.



Dobrovolníci byli požádáni, aby dodržovali přesný spánkový režim, který si zaznamenávali do spánkového deníku. Odběr probíhal 24 hodin, od 10 hodin do 10 hodin následujícího dne. Interval mezi jednotlivými odběry trval 3 hodiny.

Kontroly (n =10) byly stanovené podle věkového průměru pacientů a na základě zdravotního stavu, který vylučoval přítomnost psychiatrických či neurologických poruch ovlivňující spánek. Všichni účastníci poskytli písemný informovaný souhlas a protokol byl schválen etickou komisí NUDZ.

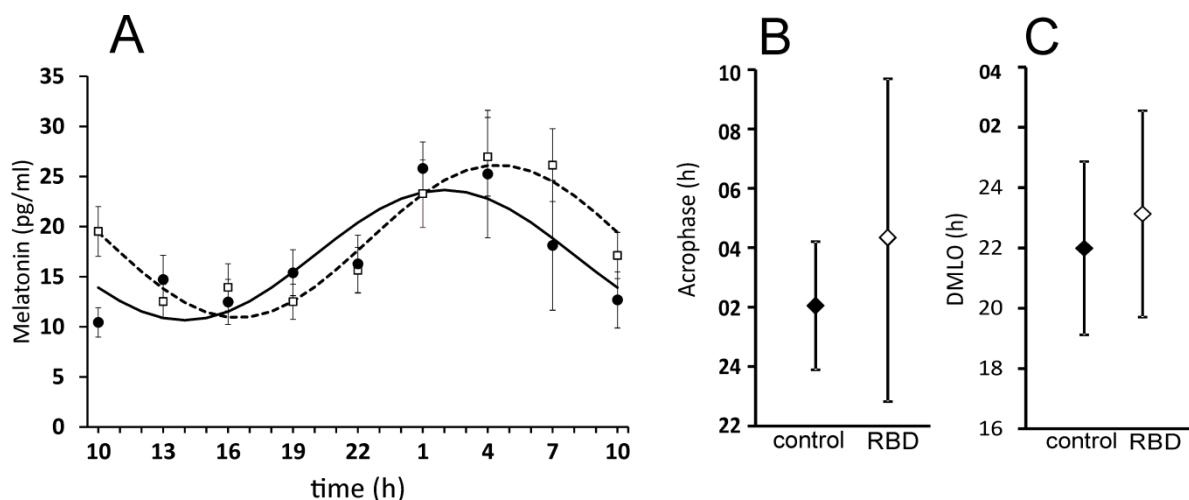
Pro určení koncentrace melatoninu ve vzorcích byla použita metoda RIA značky Melatonin Direct RIA od firmy Immuno-Biological Laboratories Inc. (IBL) a postup byl zachován jako u předchozí studie (viz. Metodika kap. 5).

Hladina melatoninu byla vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM pro skupinu pacientů a skupinu kontrolních subjektů. Rytmicita byla vyhodnocena s použitím jednocestné ANOVA pro efekt času a dále analyzována pomocí kosinorové analýzy s konstantní periodou 24 hodin. Fázové posuny mezi oběma skupinami byly hodnoceny stanovením akrofáze a DLMO (viz kapitola xxx), který byl pro tento pokus vypočten jako dvojnásobek směrodatné odchylky nad průměrnou bazální hladinou (tj. průměrem hladin melatoninu v 10:00, 13:00, a 16:00).

Výsledky byly zpracovány pomocí dvoucestné analýzy ANOVA.

## Výsledky

Naše výsledky ukázaly, že pacienti s RBD mají zachovaný denní rytmus melatoninu podobně jako zdravé subjekty stejného věku (obr. P1A); jednocestná ANOVA potvrdila významný efekt času (kontroly:  $F(8, 48) = 2.761$ ,  $P = 0.0136$ , RBD:  $F(8, 72) = 4.437$ ,  $P = 0.0002$ ) a rozdíl mezi průměrnými profily melatoninu u pacientů s RBD a kontrolními subjekty nebyl významný ( $P = 0,3479$ ). Při srovnání akrofáze melatoninových profilů jsme zjistili statisticky významný rozdíl mezi pacienty s RBD a kontrolními skupinami ( $P = 0,0337$ , obr. P1B), naznačující fázové zpoždění profilu melatoninu u pacientů s RBD ve srovnání s kontrolními skupinami. Srovnání DMLO sice také naznačilo fázové zpoždění nástupu melatoninu, tento rozdíl ale nebyl statisticky významný. Podobně se amplituda cirkadiálních rytmů, stanovená použitím 24-hodinové AUC, významně nelišila u pacientů a kontrol (RBD,  $389,54 \pm 25,1$ , kontrolní skupiny,  $355,75 \pm 43,2$ ).



Obr. 1. Změny hladin melatoninu v séru u pacientů s RBD (bílé čtverečky) a kontrolních subjektů (černé tečky). Krev odebírána ve tříhodinových intervalech od 10:00 do 24 hodin. A) Rytmické profily hladiny melatoninu u kontrolních subjektů a pacientů s RBD. Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM. B) Rozsah časových bodů, kdy maximální hladina melatoninu byla zjištěna kosinorovou analýzou jednotlivých melatoninových profilů. Diamantové značky demonstrují průměrný čas akrofáze u kontrolních subjektů (ve 2.005 hodin) a u pacientů s RBD (4.451 h). C) Rozsah časových bodů, kdy byl zjištěn DMLO jednotlivých melatoninových profilů. Diamantové značky ukazují průměrnou hodnotu DMLO u kontrolních subjektů (v 21.99h) a u pacientů s RBD (v 23.13h).

## Diskuse

Předložené výsledky jsou součástí studie Weissová et al., (v tisku), která obsahuje i výsledky detekce rytmické exprese hodinových genů v krevní plazmě pacientů s RBD a kontrolních osob. Na rozdíl od exprese hodinových genů, data neodhalila rozdílný rytmus melatoninu pacientů RBD ve srovnání s kontrolními subjekty. Syntéza melatoninu má prokazatelný cirkadiánní rytmus se srovnatelnou amplitudou mezi oběma skupinami. To se liší od nálezů Breen et al., (2014) a Videnovic et al., (2014), kteří popsali výrazně sníženou amplitudu u pacientů s PD.

Odchylnka byla ale nalezena při srovnání obou akrofází, která je u pacientů s RBD o dvě hodiny zpožděna. Fázový posun v rytmu melatoninu může odrážet vlastní spánkové preference, které se mohli lišit u pacientů s RBD, kteří byli doma v pracovní neschopnosti a

oproti kontrolním subjektům, kteří měli normální pracovní režim, mohla být jejich aktivní fáze posunutá do pozdějších nočních hodin. Fázový posun v rytmu melatoninu tedy může odrážet odlišné nastavení fáze spánku mezi oběma skupinami. Výsledky našich pokusů spíše naznačují, že rytmus produkce melatoninu není u pacientů s RBD výrazně narušen.

## Literatura

- Breen, David P., Romina Vuono, Upekshani Nawarathna, Kate Fisher, John M. Shneerson, Akhilesh B. Reddy, and Roger A. Barker. 2014. "Sleep and Circadian Rhythm Regulation in Early Parkinson Disease." *JAMA Neurology* 71 (5): 589–95.
- Mahowald, Mark W., and Carlos H. Schenck. 2010. *REM Sleep Parasomnias. Principles and Practice of Sleep Medicine: Fifth Edition*. Fifth Edition. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-1-4160-6645-3.00095-5.
- Nishida, Masaki, Jori Pearsall, Randy L Buckner, and Matthew P Walker. 2008. "REM Sleep , Prefrontal Theta , and the Consolidation of Human Emotional Memory," no. May 2009. doi:10.1093/cercor/bhn155.
- Poe, Gina R., Douglas A. Nitz, Bruce L. McNaughton, and Carol A. Barnes. 2000. "Experience-Dependent Phase-Reversal of Hippocampal Neuron Firing during REM Sleep." *Brain Research* 855 (1): 176–80. doi:10.1016/S0006-8993(99)02310-0.
- Schenck, Carlos H., Bradley F. Boeve, and Mark W. Mahowald. 2013. "Delayed Emergence of a Parkinsonian Disorder or Dementia in 81% of Older Men Initially Diagnosed with Idiopathic Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder: A 16-Year Update on a Previously Reported Series." *Sleep Medicine* 14 (8). Elsevier B.V.: 744–48.
- Videnovic, Aleksandar, Charleston Noble, Kathryn J. Reid, Jie Peng, Fred W. Turek, Angelica Marconi, Alfred W. Rademaker, Tanya Simuni, Cindy Zadikoff, and Phyllis C. Zee. 2014. "Circadian Melatonin Rhythm and Excessive Daytime Sleepiness in Parkinson Disease." *JAMA Neurology* 71 (4): 463–69.
- Weissová K, Jitka Škrabalová<sup>1,2</sup>, Kateřina Skálová<sup>2</sup>, Kateřina Červená<sup>2</sup>, Zdeňka Bendová<sup>1,2</sup>, Eva Miletínová<sup>1</sup>, Jana Kopřivová<sup>1,4</sup>, Karel Šonka<sup>3</sup>, Daniela Dudysová<sup>1</sup>, Aleš Bartoš<sup>1,4</sup>, Jitka Bušková<sup>1,4</sup>: Circadian rhythms of melatonin and peripheral clock gene expression in idiopathic REM sleep behavior disorder; *Sleep Medicine* – přijato do tisku

## Příloha 2

### *Hladina melatoninu u pacientů po pinealektomii*

Pinealektomie je chirurgický zákrok, při kterém dochází k částečnému nebo celkovému odstranění žlázy epifýzy. Podstupuje se jen při vzácných život ohrožujících případech. Onemocnění, které nejčastěji postihují epifýzu, jsou nádory, kalcifikace a cysty (Tapp, 1979; Jouvet et al., 1994). Cysty bývají bez subjektivních příznaků, ale svou velikostí mohou utlačovat okolní tkáň. Objevují se 25-40% případů onemocnění epifýzy a častěji postihují mladé ženy. Pacienti postižení cystou si zřejmě zachovávají rytmickou produkci melatoninu. Kalcifikace, ke které zde dochází během stárnutí, se vyskytuje ve většině žláz. Dochází v nich k ukládání soli vápníku, tzv. mozkového písku do bílkovinných útvarů (Whitehead et al., 2015; Májovský et al., 2017; Ozawa et al., 1995).

Hlavním důvodem pinealektomie bývá přítomnost tumoru. Nejčastější nádory epifýzy jsou pinealomy, nádory a neurální léze parenchymálních buněk. Nádory epifýzy jsou vzácné, tvoří pouze 1% z intrakraniálních nádorů. Pineoblastom je agresivnější forma pinealomů vyskytující se 5x častěji u dětí (Kumar et al., 2006; De Girolami et al., 2008).

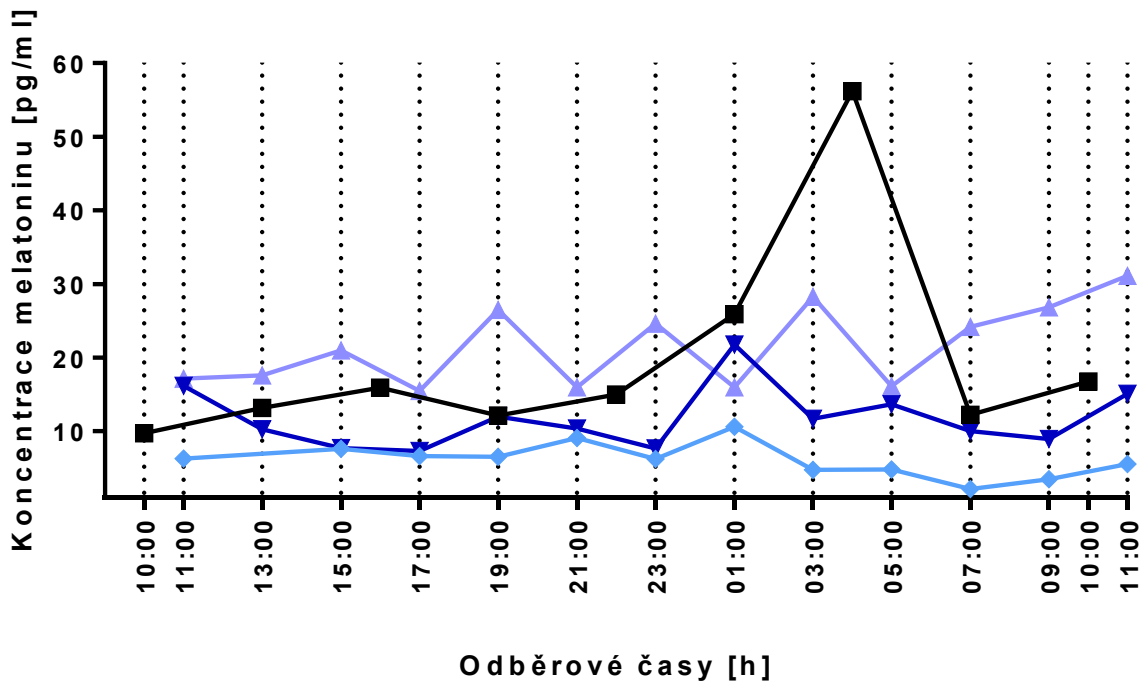
Některé studie ukazují, že po celkovém odstranění epifýzy, jsou některé struktury (např. retina) schopny udržet svou hladinu melatoninu, vykazují však rozdílný rytmus od kontrolních skupin (Yu et al., 1981).

Ve spolupráci s Neurochirurgickou a neuroonkologickou klinikou Vojenské ústřední nemocnice jsme testovali hladinu melatoninu v krvi u pacientů po zákroku pinealektomie. Zjišťovali jsme, zdali odstranění epifýzy zcela potlačí měřitelnou hladinu melatoninu v plazmě pacientů.

## **Metody**

Vzorky plazmy jsme obdrželi z výše zmíněné kliniky od 4 pacientů ve formě 2 zkumavek VACUETTE® pro hematologii s antikoagulantem - K3 EDTA. Odběry prováděli pracovníci kliniky. Odběr probíhal 24 hodin, od 11 hodin do 11 hodin následujícího dne. Pro určení koncentrace melatoninu ve vzorcích byla použita metoda RIA značky Melatonin Direct RIA od firmy Immuno-Biological Laboratories Inc. (IBL) a postup byl zachován jako u předchozí studie (viz. Metodiky kap. 5).

## Výsledky



Obr. P2. Srovnání denních profilů melatoninu pacientů po pinealektomii a jednoho kontrolního subjektu. Pacienti jsou označeni modře, kontrolní subjekt je označen černou barvou. Na ose x jsou odběrové časy, které probíhaly 24 hodin, od 11 hodin do 11 hodin následujícího dne. Odběrový čas kontrolního subjektu se shoduje s přílohou 1. Skupina kontrolních subjektů byla odebírána dle stejného harmonogramu. Pacienti po pinealektomii vykazují sníženou produkci melatoninu až na 10% hladinu zdravých jedinců. Produkce melatoninu není rytmická v porovnání s výsledky kontrolního subjektu. Hladina melatoninu v průměru nepřesahuje hladinu 25 pg/ml.

## Diskuse

Pineální regionální tumory vykazují heterogenní melatoninové profily podle histologického typu. U Germinomu (tumor nediferenciovaných zárodečných buněk) byl zjištěn úplný deficit sekrece melatoninu (CHIK et al., 1985). U pinealocytomů byl detekován pokles a ztráta rytmu sekrece melatoninu (Claustrat et al., 2005). V dalších studiích bylo ovšem nalezeno, že i po celkovém odstranění epifýzy jsou některé orgánové struktury schopny produkovat alespoň minimální hladinu melatoninu. Reziduální melatonin naměřený

v našich vzorcích je tedy zřejmě produkován sekundárními tkáněmi (například retinou, krevní destičky, mononukleární buňky, gastrointestinální trakt) (Yu, Pang, and Tang 1981; Poon, Mak, and Luk 1996; Venegas et al. 2012; Messner et al. 2001). Tato residuální hladina však postrádá rytmus a v průběhu dne se nemění.

## Literatura

- De Girolami, U., M. Fèvre-Montange, D. Seilhean, and A. Jouvét. 2008. "Pathology of Tumors of the Pineal Region." *Revue Neurologique* 164 (11): 882–95.
- Jouvét, A., E. Derrington, J. Pialat, C. Lapras, M. Fèvre-Montange, R. Besançon, M. F. Belin, and G. Saint-Pierre. 1994. "Structural and Ultrastructural Characteristics of Human Pineal Gland, and Pineal Parenchymal Tumors." *Acta Neuropathologica* 88 (4): 334–48.
- Kumar, Pragati, Medha Tatke, Ajay Sharma, and Daljit Singh. 2006. "Histological Analysis of Lesions of the Pineal Region: A Retrospective Study of 12 Years." *Pathology Research and Practice* 202 (2): 85–92.
- Májovský, Martin, Lenka Řezáčová, Alena Sumová, Lenka Pospíšilová, David Netuka, Ondřej Bradáč, and Vladimír Beneš. 2017. "Melatonin and Cortisol Secretion Profile in Patients with Pineal Cyst before and after Pineal Cyst Resection." *Journal of Clinical Neuroscience* 39: 155–63.
- Tapp, E., and Marianne Huxley. 1972. "The Histological Appearance of the Human Pineal Gland from Puberty to Old Age" 108.
- Tapp, Edmund. 1979. "The Histology and Pathology of the Human Pineal Gland." *Progress in Brain Research* 52 (C): 481–500.
- Yu, H. S., S. F. Pang, and P. L. Tang. 1981. "INCREASE IN THE LEVEL OF RETINAL MELATONIN AND PERSISTENCE OF ITS DIURNAL RHYTHM IN RATS AFTER PINEALECTOMY," no. 1979
- Whitehead, M. T., C. Oh, A. Raju, and Asim F. Choudhri. 2015. "Physiologic Pineal Region, Choroid Plexus, and Dural Calcifications in the First Decade of Life." *American Journal of Neuroradiology* 36 (3): 575–80.

