

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra fyziologie živočichů

**Synchronizace cirkadiánního systému  
během prenatálního a časného  
postnatálního vývoje**

Pavel Houdek

Vedoucí diplomové práce:  
PharmDr. Alena Sumová, DSc.

Praha 2010

Prohlašuji, že diplomová práce byla vypracována samostatně, pouze s použitím literárních pramenů uvedených v seznamu literatury.

V Praze dne 30. 8. 2010

Pavel Houdek

## **Poděkování**

Velmi děkuji své školitelce PharmDr. Aleně Sumové, DSc. za vedení mé práce, za mnoho trpělivosti a cenných rad. Děkuji také všem členům kolektivu oddělení Neurohumorálních regulací FgÚ AV ČR za vše, čemu mě naučili, za ochotnou pomoc a za to, že mne rádi vzali mezi sebe.

## Abstrakt

Jednou z nemnoha vlastností společných takřka všem živým organismům je schopnost vytvářet a udržet endogenní rytmy, které jsou řízeny biologickými hodinami. Opakují-li se takové děje s periodou přibližně 24 hodin, mluvíme o rytmech cirkadiálních. Cirkadiální hodiny řídí rytmy molekulárních, fyziologických i behaviorálních dějů a přizpůsobují jejich chod pravidelnému střídání dne a noci a změně roční doby. V případě savců je centrální oscilátor biologických hodin uložen v suprachiasmatických jádrech (SCN) hypotalamu a synchronizuje rytmy periferních oscilátorů uložených v buňkách ostatních tkání. Centrální oscilátor synchronizuje své rytmy s vnějším prostředím především skrze pravidelné střídání světla a tmy, ale mohou na něj působit i jiné podněty. Například, během prenatálního vývoje jsou fetální biologické hodiny v synchronizaci svých rytmů zcela odkázány na nesvětelné podněty vysílané mateřským organismem. Tato studie je zaměřena na zkoumání mechanismů komunikace mezi mateřským a fetálním centrálním oscilátorem. V práci je testována hypotéza, zda mateřský melatonin hraje významnou úlohu při zprostředkování synchronizace cirkadiálních hodin ve fetálních SCN. Navíc se práce zabývá také mechanismem, kterým by k této synchronizaci mohlo docházet na úrovni molekulárního mechanismu hodin v SCN. Výsledky prokázaly, že mateřský melatonin může fetální SCN synchronizovat pravděpodobně díky přímému účinku na expresi hodinových genů ve fetálních SCN.

## Abstract

One of the few attributes common to almost all living organisms is an ability to generate and maintain endogenous rhythms, which are controlled by a biological clock. The processes, which recur with a period of about 24 hours, are known as the circadian rhythms. The circadian clock controls rhythms of molecular, physiological as well as behavioral processes and adapts their activity to regularly appearing changes in day and night or season. In case of mammals, central oscillator is located in the hypothalamic suprachiasmatic nuclei (SCN). The SCN clock entrains rhythms of peripheral oscillators located in cells of other tissues. The central oscillator itself is synchronized with external environment mainly by a light-dark cycle, however, other cues can entrain the SCN clock as well. For example, during prenatal development, entrainment of a fetal clock is entirely dependent on non-photic cues derived from maternal organism. This study aimed to investigate a mechanism of the communication between the maternal and fetal central oscillators. A hypothesis was tested whether maternal melatonin may play a role in entrainment of the circadian clock in the fetal SCN. Furthermore, a mechanism, how melatonin may entrain the fetal clock was investigated at molecular level. The results provided evidence, that maternal melatonin may entrain the fetal SCN presumably due to a direct effect on the clock gene expression in the fetal SCN.

# Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Seznam použitých zkratek.....	8
1. ÚVOD.....	9
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	10
2.1. Cirkadiánní systém.....	10
2.1.1. Biologické hodiny.....	10
2.1.2. Suprachiasmatická jádra.....	10
2.1.3. Periferní oscilátory.....	11
2.1.4. Šišinka a hormon melatonin.....	12
2.2. Molekulární podstata biologických hodin.....	13
2.3. Světelná synchronizace centrálního oscilátoru.....	15
2.4. Ontogeneze centrálního oscilátoru.....	16
2.5. Synchronizace centrálního oscilátoru během prenatálního období.....	17
2.6. Synchronizace centrálního oscilátoru během postnatálního období.....	18
3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	21
4. MATERIÁL A METODY.....	22
4.1. Experimentální zvířata.....	22
4.2. Experimentální schémata.....	22
4.2.1. Opakované podávání melatoninu intaktním březím samicím.....	22
4.2.2. Opakované podávání melatoninu pinealektomovaným březím samicím .....	23
4.2.3. Akutní podání melatoninu březím samicím.....	23
4.2.4. Odběr krve pro stanovení hladin kortikosteronu u březích samic po injekční aplikaci ..	23
4.3. Zabřezávání.....	24
4.4. Monitorování pohybové aktivity.....	24
4.5. Operativní vynětí šišinky.....	24
4.5.1. Materiál a vybavení.....	24
4.5.2. Postup operace.....	25
4.6. Stanovení 24hodinového profilu transkripce genů c-Fos, Avp a Per1.....	26
4.6.1. Materiál a vybavení.....	26
4.6.2 Příprava tkáňových řezů.....	28
4.6.3 Příprava značené cRNA próby.....	29
4.6.3.1. Pracovní roztoky.....	29
4.6.3.2. Metoda.....	29
4.6.4. Prehybridizace.....	31
4.6.4.1. Pracovní roztoky.....	31
4.6.4.2. Metoda.....	32
4.6.5. Hybridizace.....	32
4.6.5.1. Pracovní roztoky.....	32
4.6.5.2. Metoda.....	33
4.6.6. Odmývání nezhybridizované próby a autoradiografie .....	33
4.6.6.1. Pracovní roztoky.....	33
4.6.6.2. Metoda.....	34
4.6.7. Kvantifikace radiografického signálu.....	35
4.7. Měření hladiny hormonu kortikosteronu metodou RIA.....	35
4.8. Měření hladiny hormonu melatoninu metodou RIA.....	36
5. VÝSLEDKY.....	37
5.1. Opakované podávání melatoninu intaktním březím samicím.....	37

5.1.1. Vliv experimentálních podmínek na pohybovou aktivitu.....	37
5.1.2. Vliv opakovaného podávání melatoninu březím samicím na 24hodinové profily exprese genů c-Fos a Avp v SCN jednodenních mlád'at.....	40
5.1.2.1. Vliv opakovaného podávání melatoninu březím samicím na 24hodinový profil hladiny c-Fos mRNA v SCN jednodenních mlád'at.....	41
5.1.2.2. Vliv opakovaného podávání melatoninu březím samicím na 24hodinový profil hladiny Avp hnRNA v SCN jednodenních mlád'at.....	42
5.2. Opakované podávání melatoninu pinealektomovaným březím samicím.....	47
5.2.1. Kontrola výsledku operace.....	47
5.2.2. Vliv opakovaného podávání melatoninu březím pinealektomovaným samicím na hladinu c-Fos mRNA v SCN jednodenních mlád'at v čase CT18 a CT6.....	47
5.2.3. Vliv opakovaného podávání melatoninu březím pinealektomovaným samicím na hladinu Avp hnRNA v SCN jednodenních mlád'at v čase CT18 a CT6.....	48
5.3. Akutní podání melatoninu březím samicím.....	50
5.3.1. Okamžitý vliv podání melatoninu březím samicím na hladinu c-Fos mRNA v SCN dvacetidenních plodů.....	50
5.3.2. Okamžitý vliv podání melatoninu březím samicím na hladinu Avp hnRNA v SCN dvacetidenních plodů.....	51
5.3.3. Okamžitý vliv podání melatoninu březím samicím na hladinu Per1 mRNA v SCN dvacetidenních plodů.....	52
5.4. Vliv injekční aplikace na hladinu kortikosteronu v krvi březích samic.....	57
6. DISKUZE.....	58
6.1. Opakované podávání melatoninu intaktním březím samicím.....	58
6.2. Opakované podání melatoninu pinealektomovaným březím samicím.....	60
6.3. Akutní podání melatoninu březím samicím.....	61
7. ZÁVĚR.....	64
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	65

## Seznam použitých zkratek

AA-NAT	arylalkylamin N-acetyltransferáza
Avp	gen pro arginin-vazopresin
Bmal1	brain and muscle ARNT-like 1
BSA	bovine serum albumin, hovězí sérový albumin
CAMS	circadian activity monitoring system
CK1 $\epsilon$	casein kinase 1 $\epsilon$
CRE	Ca <sup>2+</sup> /cAMP response element
CREB	Ca <sup>2+</sup> /cAMP response element binding protein
Cry	Cryptochrome
CT	circadian time, cirkadiánní čas
D1	dopaminový receptor
DEPC	diethylpyrokarbonát
dH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
dmSCN	dorzomediální část suprachiasmatických jader
DTT	dithiotreitol
E17 (apod.)	17. den embryonálního vývoje (apod.)
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
hnRNA	heteronukleární RNA
HP	hybridizační pufr
i.p.	intraperitoneálně
MT1, MT2	melatoninové receptory
NaPPi	pyrofosforečnan sodný
NMDA receptory	N-metyl-D-aspartátové receptory
P3 (apod.)	3. den postnatálního vývoje (apod.)
PBS	phosphate buffered saline, fosfátový pufr
P-CREB	fosforylovaný protein CREB
Per	Period
PFA	paraformaldehyd
PVP	polyvinylpyrrolidon
Rev-Erb $\alpha$	gen byl nalezen na antisense řetězci kódujícím gen Erb $\alpha$
RIA	radioimmunoassay
Ror $\alpha$	retinoic acid receptor-related orphan receptor $\alpha$
RORE	Ror $\alpha$ response element
SCN	suprachiasmatic nuclei, suprachiasmatická jádra
SDS	sodium dodecylsulfát
S.E.M.	standard error of mean, střední chyba průměru
SSC	sodium chloride - sodium citrate
TCA	trichloroctová kyselina
TEA	triethanolamin
TRIS	tri(hydroxymetyl)aminoetan
v. k.	výsledná koncentrace
vlSCN	ventrolaterální část suprachiasmatických jader



# 1. ÚVOD

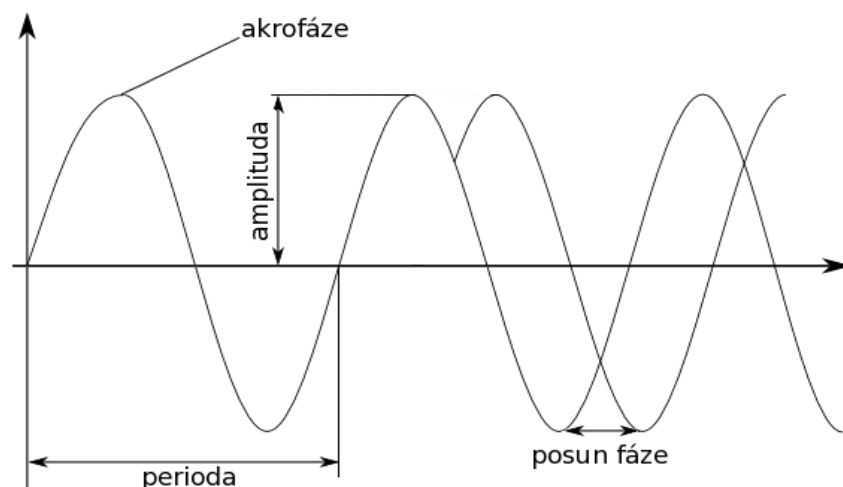
Podmínky pro život organismů v biosféře se mění. Některé z nich se mění a opakují periodicky a tomu se živé organismy přizpůsobily vyvinutím biologických hodin. Ty jim umožňují pravidelně se měnící životní podmínky předjímat a připravit se na ně. U živých organismů jsme tak schopni pozorovat a měřit mnohé fyziologické, metabolické a behaviorální rytmy. Tyto rytmy rozdělujeme podle délky periody na

**a)** ultradiánní, jejichž perioda je výrazně kratší než 24 hodin (například činnost srdce, plic, nervová aktivita);

**b)** cirkadiánní, jejichž perioda je přibližně 24 hodin (například cyklus spánku a bdění, příjem potravy, pohybová aktivita, hladina hormonů v krvi a exprese mnoha genů);

**c)** infradiánní, jejichž perioda je výrazně delší než 24 hodin (například estrální a menstruační cyklus, hibernace, respektive estivace).

Máme-li hovořit o rytmech a cyklických dějích, nevyhneme se obecným základním pojmům, jako jsou perioda, amplituda a fáze (viz obr. 1). Perioda je délka jednoho cyklu, od libovolného bodu do následujícího bodu, v němž se začíná proces opakovat. V případě cirkadiánních rytmů je to vždy přibližně 24 hodin. V grafické podobě je ideálním průběhem biologického rytmu sinusoida, kde je na vodorovné ose vynesena čas. Polovina rozdílu mezi nejvyšším a nejnižším bodem takového grafu se nazývá amplituda, neboli rozkmit, odráží mohutnost rytmu. Fáze značí orientaci rytmu vůči jinému rytmu, nebo vůči vnějšímu měřítku. Je-li tedy pomyslný začátek jednoho rytmu ve 3:00 a druhého v 6:00, je druhý vůči prvnímu fázově opožděn o 3 hodiny. Časový bod, ve kterém rytmus dosahuje svého maxima v rámci periody, se nazývá akrofáze.



**Obr 1:** Znárodnění pojmů perioda, amplituda, posun fáze a akrofáze. Vysvětlení viz text výše.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. Cirkadiánní systém

#### 2.1.1. *Biologické hodiny*

Biologické hodiny mají charakter vnitřního oscilátoru. To znamená, že jím indukované rytmy jsou endogenního původu a přetrvávají i ve zcela neperiodickém prostředí, například ve stálé tmě. V takovém prostředí pak oscilují podle své vnitřní periody  $\tau$ , která je pouze přibližně 24 hodin. Podle toho, zda je  $\tau$  kratší či delší než 24 hodin, pak organismus chovaný ve stálé tmě začíná svůj subjektivní den buď stále časněji, nebo stále později (shrnutí v Hastings, 1997). V přírodě se biologické hodiny synchronizují s objektivním časem především pomocí denního světla (Daan a Pittendrigh, 1976), dále také v závislosti na živočišném druhu pohybovou aktivitou, teplotou okolního prostředí, sociální interakcí, příjmem potravy nebo farmakologicky účinnými látkami.

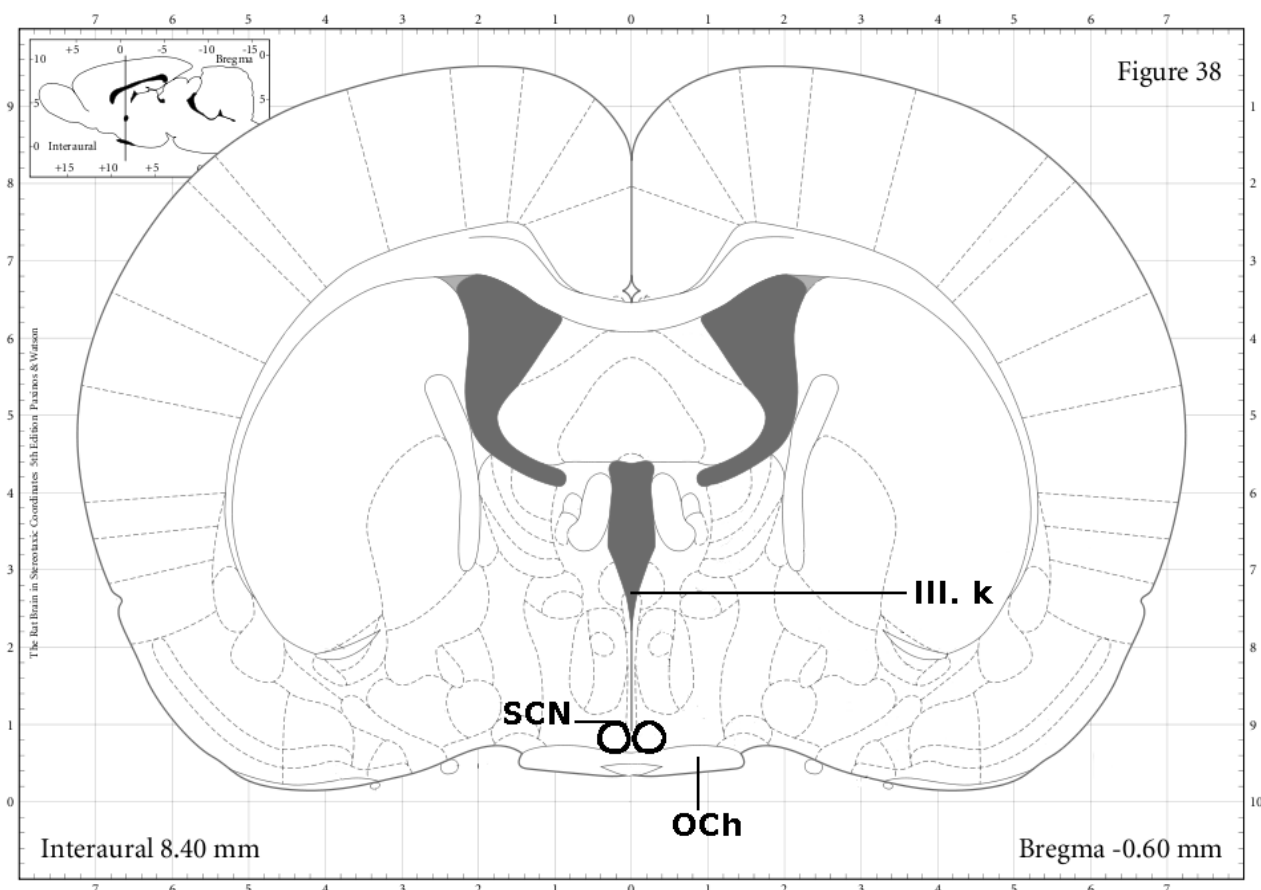
Pro účely výzkumu či terapie je často zapotřebí změřit, v jaké fázi se biologické hodiny právě nacházejí. Fázi lze zjistit například sledováním pohybové aktivity, příjmu potravy a tekutin nebo hladiny melatoninu. Všechny tyto fyziologické funkce jsou časově řízeny biologickými hodinami, takže vykazují cirkadiánní rytmus a jsou tak výstupem z cirkadiánního systému. Velikého kvalitativního skoku obor chronobiologie doznal po objevu tzv. hodinových genů (viz níže), protože měřením jejich přepisu a překladu je možné sledovat fázi hodin na úrovni mechanismu, který je poháněn, a nahlížet přímo do nitra systému samého.

#### 2.1.2. *Suprachiasmatická jádra*

Biologické hodiny pozorujeme u všech světlocitlivých druhů organismů, od cyanobakterií po savce (shrnutí v Schibler, 2005). U savců je vnitřní oscilátor, neboli pacemaker, uložen v suprachiasmatických jádrech (SCN) hypotalamu (viz obr. 2). Pokud savčí organismus podrobíme lézi SCN, přestane tento vykazovat rytmy, včetně pohybové aktivity (Stephan a Zucker, 1972) nebo sekrece mnoha hormonů (Moore a Eichler, 1972). Jedná se o párový orgán uložený laterálně III. mozkové komory nad optickým chiasma. Každé z obou jader obsahuje přibližně 10 000 neuronů a dělíme je na dorzomediální (dmSCN) a ventrolaterální (vlSCN) část. DmSCN částečně obklopuje vlSCN a je zodpovědné za udržení endogenních rytmů. Naproti tomu vlSCN zprostředkovává efekt světla a dalších stimulů na synchronizaci rytmů s vnějším prostředím. Každá část také produkuje odlišné

neurotransmitery: dmSCN arginin-vazopresin a vlSCN vazointestinální peptid. Obě části shodně produkují  $\gamma$ -aminomáselnou kyselinu (Abrahamson a Moore, 2001).

Experimenty ukázaly, že většina neuronů SCN je samostatným oscilátorem s různou periodou  $\tau$ . Jednotný výstupní cirkadiánní rytmus vzniká až na úrovni neuronální sítě (Welsh *et al.*, 1995). Pro vzájemnou komunikaci mezi neurony, díky níž jednotný výstup vzniká, je klíčový vazointestinální peptid v roli neuropřenašeče. Chybí-li buňkám SCN totiž jeho receptor, nejsou schopné jednotný rytmus vytvořit (Maywood *et al.*, 2006).



**Obr. 2:** Poloha suprachiasmatických jader na frontálním řezu mozku dospělého potkana. SCN leží při spodině III. mozkové komory (III. k) nad optických chiasma (OCh). Upraveno dle Paxinos a Watson, 2005.

### 2.1.3. Periferní oscilátory

Zásadní zlom v pojetí cirkadiánního systému savců znamenal objev, že vnitřní oscilátor není uložen pouze v neuronech SCN, nýbrž i buňkách mnohých periferních tkání. Expres hodiny genů (viz níže) byla prokázána mimo SCN i v dalších částech mozku, v sítnici, srdci, játrech, plicích, ledvinách, kosterním svalstvu a jiných periferních tkáních. Pokud byly tyto tkáně izolovány *in vitro*, udržely svůj rytmus ještě přibližně 3 cykly a poté se jeho

amplituda stala nečitelnou (shrnutí v Reppert a Weaver, 2001). Tento výsledek byl nejprve interpretován tak, že SCN je pro udržení oscilací periferních orgánů nezbytné. Teprve později se ukázalo, že na buněčné úrovni běží oscilace dále, ale jednotlivé buněčné oscilátory se bez přítomnosti SCN vzájemně rozešly a jejich rytmy na úrovni celé tkáně proto nebyly zřetelné. Centrální oscilátor v SCN je tedy nutný pro vzájemnou synchronizaci periferních oscilátorů, nikoliv pro udržení jejich oscilací (Yoo *et al.*, 2004).

Periferní oscilátory jsou o 3 až 9 hodin fázově opožděné oproti SCN. Na jejich synchronizaci se také významnou měrou podílí načasování příjmu potravy. Jakým způsobem je předávána informace o vnitřním biologickém čase z centrálního k periferním oscilátorům, zatím není známo. Patrně se jedná o kombinaci signálu neuronálního i humorálního (shrnutí v Schibler *et al.*, 2003).

#### **2.1.4. Šišinka a hormon melatonin**

Důležitým efektozem cirkadiálního systému je endokrinní žláza šišinka, neboli epifyza. Šišinka je coby nepárový orgán součástí mezimozku (diencefalonu) a do krevního oběhu secernuje hormon melatonin. Jeho syntéza v šišince začíná u tryptofanu a pokračuje přes serotonin, z kterého se následně pomocí klíčových enzymů arylalkylamin N-acetyltransferázy (AA-NAT) a hydroxyindol-O-metyltransferázy tvoří melatonin. Hladina melatoninu v krvi charakteristicky kolísá v průběhu 24 hodin: vysoká je během subjektivní noci a naopak velmi nízká během subjektivního dne. Tím se v organismu přenáší nejen informace o tom, která je právě fáze dne, ale délkou melatoninového signálu je vyjádřena i aktuální roční doba (shrnutí v Illnerová, 1996).

Tvorba melatoninu v šišince je řízena světlem, a sice dvěma způsoby. Jednak percepce světla přes sítnici přímo inhibuje syntézu melatoninu (Illnerová *et al.*, 1978) a jednak rytmus střídání světla a tmy nastavuje biologické hodiny v SCN a ty pak přes výstupní signály řídí rytmus tvorby melatoninu v šišince. SCN s šišinkou spojuje multisynaptická dráha nervových spojů, z nichž poslední předává šišince signál v podobě zvýšeného výlevu noradrenalinu během tmavé části dne (Kalsbeek a Buijs, 2002; Møller a Baeres, 2002; Drijfhout, 1996).

Účinky melatoninu v organismu se realizují skrze vysokoafinitní receptory spřažené s G-proteiny MT1 a MT2. Hlavní účinek melatoninu tkví v tom, že inhibuje tvorbu cyklického AMP a tím i snižuje fosforylaci transkripčního faktoru CREB (z angl. *Ca<sup>2+</sup>/cAMP response element binding protein*) (Vaněček a Vollrath, 1989; Kopp *et al.*, 1997). Krom toho, že se receptory melatoninu vyskytují v mnoha různých tkáních celého organismu, nacházíme je i v samotných suprachiasmatických jádrech (Vaněček *et al.*, 1987). Melatonin zde působí

dvěma různými efekty. Jednak inhibuje nervovou aktivitu a také mění fázi biologických hodin. Podání melatoninu ve večerních hodinách způsobí jejich fázové předběhnutí a oproti tomu zrání melatonin biologické hodiny opožďuje.

Navzdory uvedeným faktům není melatonin u savců pro fungování samotného centrálního oscilátoru v SCN nepostradatelný, neboť chirurgické odnětí šišinky (tedy pinealektomie) nemá podstatný vliv na cirkadiánní rytmus v pohybové aktivitě (Quay, 1968; Cheung a McCormack, 1982).

## 2.2. Molekulární podstata biologických hodin

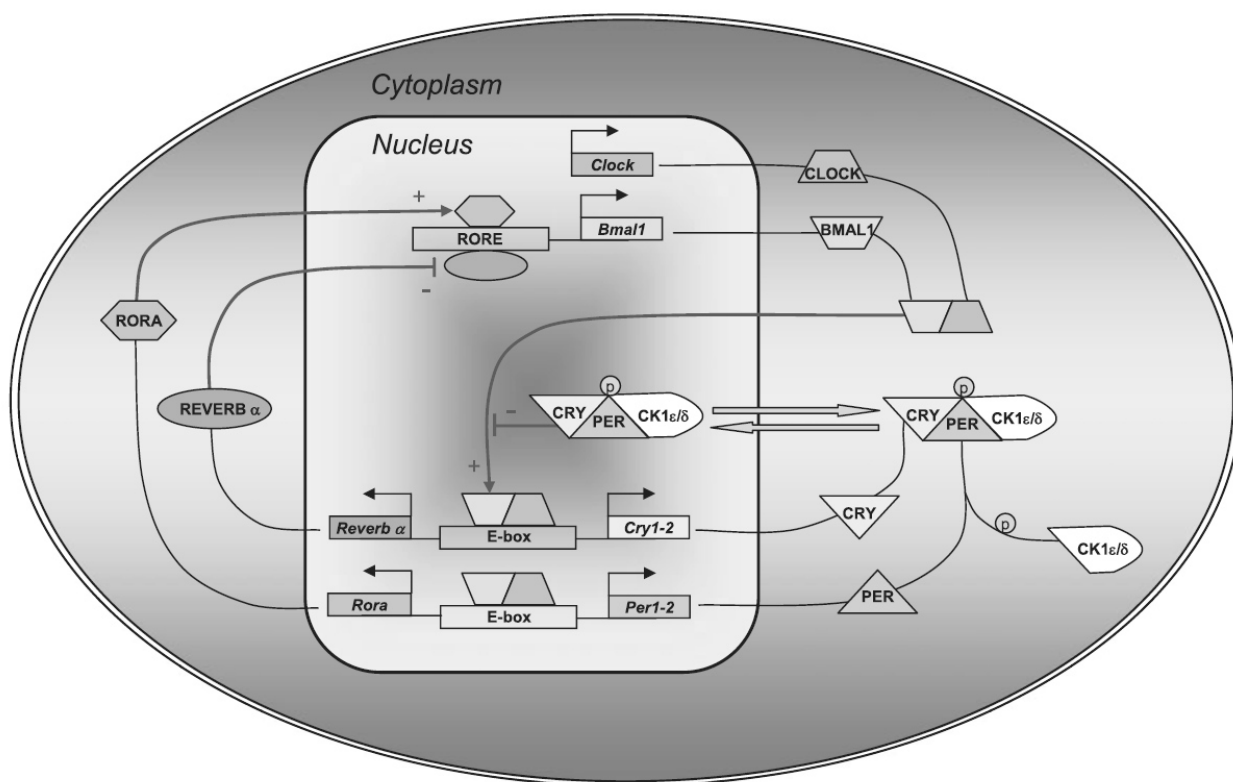
Jak již bylo zmíněno dříve, je tedy každá nervová buňka suprachiasmatického jádra, a také buňky mnoha periferních tkání, samostatným oscilátorem. Molekulární podstata oscilací v těchto buňkách tkví v produktech tzv. hodinových genů, tedy genů, které jsou pro funkci biologických hodin nepostradatelné nebo při jejich obměně je jejich funkce významně ovlivněna. Řadíme k nim geny *Clock*, *Bmal1*, *Per* (jsou známy homology *Per1*, *Per2* a *Per3*), *Cry* (homology *Cry1* a *Cry2*), *Rev-erba*, *Rora* a *CK1ε*. Oscilace vznikají v důsledku nejméně dvou transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček, ve kterých proteinové produkty ovlivňují transkripci vlastní mRNA (viz obr. 3).

Na počátku první z nich stojí proteiny CLOCK a BMAL1, které zastávají funkci pozitivní části smyčky. Tyto dva proteiny spolu tvoří heterodimery a vstupují do jádra, kde se váží na sekvence tzv. E-boxů na promotorech ostatních hodinových genů. Navázáním na E-boxy genů *Per* a *Cry* působí heterodimer CLOCK:BMAL1 jako jejich pozitivní transkripční faktor a zvyšuje tím koncentraci jejich mRNA v cytoplasmě až na maximum v polovině subjektivního dne (Gekakis *et al.*, 1998). Koncentrace samotných proteinů PER a CRY je nejvyšší koncem subjektivního dne. Proteiny PER a CRY spolu následně tvoří heterodimer, vstupují do jádra, interagují s dimerem CLOCK:BMAL1 a zabraňují tak jeho další aktivitě, čímž působí jako negativní faktor své vlastní transkripce. V důsledku toho koncentrace dimeru PER:CRY během subjektivní noci klesá a na začátku subjektivního dne přestává inhibovat CLOCK:BMAL1. Správný průběh transkripčně-translačních cyklů závisí na činnosti kinázy CK1ε, která svou činností řídí načasování vstupu heterodimeru PER:CRY do jádra, případně jeho degradaci v proteazomu (Vielhaber *et al.*, 2000).

Ve druhé transkripčně-translační smyčce dimer CLOCK:BMAL1 aktivuje přepis genu *Rev-erba*, jehož proteinový produkt v jádře působí také jako transkripční faktor. Váže se na promotorové sekvence RoRE, negativně tak ovlivňuje přepis genu *Bmal1* a tím opět i vlastní

transkripci. Naopak pozitivně na přepis genu *Bmal1* působí další hodinový protein ROR $\alpha$  (shrnuto v Reppert a Weaver, 2001). Výsledkem této regulace je fakt, že koncentrace BMAL1 je během subjektivního dne nízká a stoupá až za subjektivní noci, kdy přestávají působit inhibitory PER:CRY a REV-ERB $\alpha$ . *Bmal1* je tedy vždy exprimován v opačné fázi cyklu než *Per* a *Cry*. BMAL1 ve vysoké koncentraci opět vytvoří heterodimery s molekulou CLOCK a tím je smyčka uzavřena. Přepis genu *Clock* je v SCN narozdíl od ostatních hodinových genů stálý, nebo se mění pouze minimálně (Sumová *et al.*, 2003).

Rytmus v expresi však nepozorujeme pouze u hodinových genů, ale i u mnoha dalších, do jejichž transkripční regulace hodinový mechanismus promlouvá, například navázáním hodinových proteinů na sekvence E-boxů či RoRE jejich promotorů. Takovým genům říkáme hodinami kontrolované. Patří mezi ně i gen pro arginin-vazopresin *Avp*. Jeho transkripce je skrze E-box spjata s transkripcí hodinových genů v dmSCN a platí tak za dobrý ukazatel fáze biologických hodin (Jin *et al.*, 1999). Z rytmického spínání transkripce hodinami kontrolovaných genů potom vychází cirkadiánní projevy nejrůznějších fyziologických funkcí na úrovni buněk, tkání i celého organismu.



**Obr. 3:** Schema molekulárního mechanismu vzniku cirkadiánních oscilací. Podrobný výklad v textu výše. Převzato z Guilding a Piggins, 2007.

## 2.3. Světelná synchronizace centrálního oscilátoru

Jak již bylo uvedeno výše, vnitřní perioda  $\tau$  není přesně rovná 24 hodinám a vznikající odchylka musí být denně vyrovnávána, aby nedošlo k časové desynchronizaci. Hlavním zdrojem časové informace, podle které hodiny poopravují svůj chod, je denní střídání světla a tmy. Během první poloviny subjektivní noci reagují hodiny na světelný puls svým zpožděním, během druhé poloviny subjektivní noci předběhnutím. Během subjektivního dne světlo chod hodin neovlivňuje. Vliv světla na cirkadiánní hodiny je tak tzv. vrátkován (Aschoff *et al.*, 1975).

Čítí světla probíhá na buňkách sítnice. Jsou do ní zapojeny tyčinky, čípky a gangliové buňky, které syntetizují pigment melanopsin. Biologické hodiny tak mohou být seřizovány i v případě slepoty z důvodu nefukčních tyčinek a čípků, pokud je zachována percepce světla gangliovými buňkami (Panda *et al.*, 2003).

Do SCN je informace o recepci světla na sítnici vedena dvěma cestami. Ze sítnice vede přímé nervové spojení do SCN přes retinohypotalamický trakt. Druhá cesta vede ze sítnice přes intergenikulární lístek v talamu a odtud takto nepřímou do SCN tzv. genikulohypotalamickým traktem. Třetí cesta přivádějící informace do SCN je rovněž nepřímá a vede z *nuclei raphe* (shrnutí v Morin a Allen, 2005). Pomocí této dráhy jsou SCN informována o změně vnějšího prostředí nesvětelnými signály. Výstupní dráhy ze SCN vedou do ostatních částí hypotalamu a do dalších oblastí mozku a míchy.

Z nervových zakončení retinohypotalamického traktu se při osvětlení sítnice v noci vylévá glutamát a váže se na NMDA receptory buněk v SCN. Tím se spouští signální kaskáda, zahrnující zvýšenou hladinu  $Ca^{2+}$  a aktivaci NO-syntázy, na jejímž konci stojí fosforylace proteinu CREB (Ding *et al.*, 1997). Fosforylovaný CREB se stává transkripčním faktorem a skrze sekvence CRE v promotorech aktivuje transkripci hodinových genů *Per1* a *Per2* (Shearman *et al.*, 1997). Takto původní světelný impuls zasahuje až do vnitřního mechanismu hodin a posunuje tak jejich fázi. Kromě toho aktivuje transkripci časných raných genů *c-Fos* a *jun-B*, které jsou proto dobrým ukazatelem okamžité nervové aktivity indukované světlem (Kornhauser *et al.*, 1992).

Vystavení pokusných zvířat stálému světlu postupně zcela rozruší behaviorální cirkadiánní rytmy, například spánkové nebo v pohybové aktivitě (Daan a Pittendrigh, 1976), a působí změny v expresi hodinových genů *Per1* a *Per2* (Sumová a Illnerová, 2005; Sudo *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2005). Oproti tomu vypuštění do stálé tmy rytmy zachovává, ale neposkytuje žádné stimuly pro korekci periody na 24 hodin.

## 2.4. Ontogeneze centrálního oscilátoru

Centrální oscilátor uložený v SCN se zakládá v prenatalním období spolu s dalšími mozkovými strukturami a jeho vývoj pokračuje i po porodu. Tak, jak dozrávají ostatní orgány v rodícím se organismu, objevují se v nich postupně i cirkadiánní rytmy, nejsou však přítomny všechny od počátku. Tato práce je zaměřena na vývoj cirkadiánního systému laboratorního potkana a proto se omezím pouze na tento druh.

Prenatální vývoj u potkana trvá 22-23 dnů. SCN se zakládají mezi 14. a 17. dnem embryonálního vývoje (tj. v E14-E17) z ventrálního diencefalického zárodečného epitelu ve skupině paraventriculárních buněk. Neurogeneze buněk SCN je završena v E18, dál ale probíhají morfologické změny (Moore, 1991). Zejména synapsí je mezi neurony SCN zpočátku velmi málo, dokonce méně než v okolních mozkových tkáních. Propojenost buněk se sice postupně zvyšuje, ale výrazně se proces zrychluje teprve 4. dne postnatálního vývoje (tj. v P4) a úroveň dospělce dosahuje až v P10 (Moore a Bernstein, 1989).

Vývoj rytmů v SCN včetně exprese hodinových genů lze shrnout den po dni následovně:

- **E19:** hodinové geny jsou transkribovány (*Bmal1* více než *Per1* a *Cry1*), avšak rytmus nevykazují, hodinové proteiny nebyly detekovány (Sládek *et al.*, 2004). Byl ale prokázán rozdíl mezi dnem a nocí ve vstřebávání značené glukózy, tedy v metabolické aktivitě neuronů fetálních SCN (Reppert a Schwartz, 1984).

- **E20:** objevuje se rytmus v transkripci *Per1*, další hodinové geny se začínají přepisovat rytmicky až po porodu (Kováčiková *et al.*, 2006). Jiná vědecká skupina našla kromě rytmu *Per1* i rytmus *Per2* již v E20 (Ohta *et al.*, 2002). Přítomna je heteronukleární RNA (hnRNA) *Avp*, ale ještě nevykazuje rytmus (Kováčiková *et al.*, 2006).

- **E21:** pozorován rozdíl mezi denní a noční expresí mRNA *Avp*, tedy rytmus v přepisu hodinami kontrolovaného genu (Reppert a Uhl, 1987).

- **E22:** zachycen rytmus v pálení neuronů SCN (Shibata a Moore, 1987).

- **P1:** zřetelný rytmus v hnRNA *Avp* (Kováčiková *et al.*, 2006).

Všechny uvedené rytmy jsou v počátcích pouze nevýrazné a postupně se zvětšuje jejich amplituda spolu s tím, jak po porodu dozrávají SCN a zřejmě v důsledku pokračující synaptogeneze. V P10 potom dosahují úroveň srovnatelné s dospělci (shrnuto v Sumová *et al.*, 2006).

Stanovit přesnou hranici, od které chvíle se již fetální či novorozený oscilátor osamostatňuje od mateřského vlivu a počíná utvářet vlastní endogenní rytmy, je nesnadné.



Zbývá více otázek než odpovědí, například je nepřítomnost transkripčních rytmů v E19 způsobena skutečně nedostatkem vlastní rytmicity, nebo jsou jen jednotlivé buněčné oscilátory vzájemně v různých fázích? Závěr prozatím zní tak, že SCN novorozeného potkana jsou spíše nezralé a postnatálně ještě dovršují svůj vývoj.

## 2.5. Synchronizace centrálního oscilátoru během prenatálního období

Přirozenou vlastností biologických hodin, jak již bylo řečeno z úvodu, je jejich seřizování s vnějším prostředím. Zatímco u dospělých jedinců jsou ústředním synchronizátorem světelné podněty, v případě plodů a novorozených mláďat je hlavním zdrojem informace o vnějším čase matka. Vyplývá to přirozeně z toho, že při nitroděložním vývoji nemají plody přístup ke světelnému rytmu a také nemají dosud plně vyvinutý retinohypotalamický trakt, který v dospělosti přivádí do SCN informaci o světle z retiny (Speh a Moore, 1993). Po porodu je převažující mateřský vliv na seřízení hodin mláďate zachován a teprve během 2. postnatálního týdne začíná převládat světelná synchronizace (viz dále).

Mláďata potkanů se rodí s biologickými hodinami (viz předchozí kapitola), jejichž fáze je nastavena shodně s fází mateřských hodin (Kováčiková *et al.*, 2006). Klíčovou roli hrají mateřská SCN, jsou-li odstraněna, novorozená mláďata nejsou synchronní s vnějším prostředím (Reppert a Schwartz, 1986b; Jud a Albrecht, 2006). Vlastní vývoj biologických hodin mláďat však ovlivněn nebyl, pouze fáze hodin jednotlivých mláďat byly volně rozprostřeny po celých 24 hodinách. Z toho vyplývá, že úlohou mateřského SCN je právě synchronizovat fetální oscilátory v rámci celého vrhu vůči vnějšímu prostředí. Podobně synchronizace plodů nebyly schopny ani matky vystavené stálému světlu, díky kterému jejich SCN nevytvářelo rytmický signál (Shibata a Moore, 1988).

Vývoj synchronizace fetálních hodin je do značné míry závislý na živočišném druhu. Pokusy na křečcích zlatých (*Mesocricetus auratus*) ukázaly, že synchronizace fetálních hodin spadá do období těsně po dokončení neurogeneze v SCN plodu. Při lézi mateřských SCN v 10. dni vývoje plodů nebyly fetální hodiny synchronizovány ani v rámci vrhu, ani vůči vnějšímu prostředí. Byla-li ale provedena léze o dva dny později, kdy již byla neurogeneze završena, k synchronizaci došlo (Davis a Gorski, 1988).

Dlouhou dobu se už pátrá po tom, jakým druhem signálu, či jakou signální molekulou, se informace o fázi z mateřských do fetálních hodin přenáší. Až doposud jednoznačný závěr

vynesen nebyl snad právě proto, že se s nejvyšší pravděpodobností jedná o více druhů signálů, povahy jak neuronální, tak humorální, které se pravděpodobně navzájem doplňují. Nejvýraznějším adeptem pro tuto funkci je hormon melatonin díky cirkadiánnímu rytmu výlevu a také díky tomu, že snadno prochází placentou (Reppert *et al.*, 1979). Když však byla provedena pinealektomie březích samic laboratorního potkana, chovaných v pravidelném světelném režimu, rytmická metabolická aktivita fetálních SCN narušena nebyla (Reppert a Schwartz, 1986a). Podobně je neovlivnilo ani (samostatně provedené) vynětí hypofýzy, nadledvinek, štítné žlázy ani vaječníků. Na druhou stranu ale další pokus na křečcích zlatých ukázal, že melatonin jistou úlohu hraje. Březím samicím byla nejprve provedena léze SCN a následně jim byl pravidelně injikován melatonin, jejich mláďata potom vykazovala synchronní rytmus v pohybové aktivitě i bez přítomnosti mateřského SCN (Davis a Mannion, 1988). Takto podávaný melatonin mohl působit i přímo ve fetálních SCN, neboť tato exprimují melatoninové receptory i v prenatalním období (Duncan a Davis, 1993).

Ve fetálních SCN potkana byly kromě melatoninových receptorů nalezeny i receptory D1 pro dopamin (Weaver *et al.*, 1992). Obdobně jako v případě melatoninu bylo zjištěno, že tyto receptory jsou schopné nastavovat fetální hodiny (Viswanathan *et al.*, 1994). Přirozeně je hladina dopaminu vysoká přes den a nízká v noci, a tak bývá někdy označován za signál dne zatímco melatonin jako signál noci. Společně by pak mohly tvořit robustní a redundantní systém signálů matky k nastavení biologických hodin jejich plodů. Některé práce také zmiňují vliv rytmického přijímání potravy březími samicemi na synchronizaci mláďat (Weaver a Reppert, 1989; Nováková *et al.*, 2010), což naznačuje, že seznam potenciálních mateřských signálů stále nemusí být úplný.

## **2.6. Synchronizace centrálního oscilátoru během postnatálního období**

Mláďata potkanů se rodí holá, slepá a zcela závislá na péči matky. Ta nadále pokračuje v jejich synchronizaci s vnějším časem. Pro bližší objasnění tohoto procesu byla podniknuta řada experimentů s náhradními matkami. Mláďata potkana, jejichž matka byla během březosti chována na pravidelném režimu s 12 hodinami světla a 12 hodinami tmy, byla ihned po porodu umístěna do stálé tmy, aby se vyloučila možnost jejich synchronizace pomocí světla. Pokud byla mláďata nadále v péči své vlastní matky, byl desátého dne po porodu nalezen v jejich šišinkách odpovídající rytmus v aktivitě enzymu AA-NAT. Jestliže však byla svěřena do péče jiné, náhradní matky, která byla vůči jejich vlastní matce o 12 hodin fázově posunuta,

tedy byla v protifázi, zjistilo se, že synchronizační vlivy obou samic se navzájem potřeily a mláďata byla v aktivitě AA-NAT vzájemně v rámci vrhu arytmiická (Reppert *et al.*, 1984). Možnost seřizování hodin matkami v postnatálním období byla později prokázána přímo na úrovni exprese hodinových genů (Ohta *et al.*, 2002).

Matky na své potomky působí prostřednictvím mateřského mléka a řady behaviorálních kontaktů. Účinným synchronizačním podnětem se v nejranějším věku ukázala být i prostá nepřítomnost matky. Pravidelná nepřítomnost matky během světlé části dne v prvním týdnu po porodu může zcela převrátit rytmus v aktivitě AA-NAT (Sugishita *et al.*, 1993) i v expresi hodinových genů *Per1* a *Per2* v SCN mláděte (Ohta *et al.*, 2003).

Tyto poznatky dobře korespondují s tím, jak se volně žijící hlodavci starají o svá mláďata. Ta obvykle v hnízdě nemohou vnímat střídání světla a tmy a o denním rytmu je informuje matka: její přítomnost, kdy mláďata převážně kojí, značí subjektivní den, a nepřítomnost, kdy matka sama shání pro sebe potravu, představuje subjektivní noc. Vliv matky na synchronizaci novorozených mláďat však po prvním týdnu od porodu slábne, až zmizí úplně (Reppert *et al.*, 1984; Shimoda *et al.*, 1986). Nepřítomnost matky během subjektivního dne, tedy v hlavní době kojení, pociťují mláďata jako silný stres, který je patrně účinným synchronizátorem novorozených SCN až na úroveň transkripce genů. Tato vlastnost však v dospělosti vymizí a u dospělých potkanů stres nemůže nastavit fázi SCN (Takahashi *et al.*, 2001).

S postupujícím vývojem potkaních mláďat se jim stále důležitějším vodítkem stává světelný rytmus. Retinohypotalamický trakt dozrává v prvních dnech po porodu (Speh a Moore, 1993) a mláďata jsou tak schopna světlo vnímat, přestože k otevírání očí dochází až patnáctého dne od porodu. V roce 1986 byla provedena práce, která dokládá, že již v P6 lze rytmus aktivity AA-NAT světelným režimem ovlivnit a že v P8 začíná vliv světla převažovat nad vlivem mateřským (Duncan *et al.*, 1986).

U dospělých potkanů světlo seřizuje hodiny v SCN pouze během subjektivní noci (viz též kapitolu 2.4.). Tato vlastnost však není u novorozených potkanů přítomna okamžitě. Hned v prvních dnech po porodu lze světelným pulsem vyvolat nejen expresi genu *c-Fos* (Weaver a Reppert, 1995; Leard *et al.*, 1994), ale i genů *Per1*, *Per2* (Matějů *et al.*, 2009), což dokládá, že cirkadiánní systém už je schopen světlo vnímat. Transkripční odpověď na světelný puls je ve všech částech dne stejná (Matějů *et al.*, 2009). První náznaky vrátkování odpovědi na světlo byly nalezeny v expresi časného raného genu *c-Fos* v P2 (Weaver a Reppert, 1995). V jiné práci však bylo pro *c-Fos* doloženo až v P5, pro gen *Per1* v P3 a pro gen *Per2* v P10 (Matějů *et al.*, 2009; Bendová *et al.*, 2004). Schopnost cirkadiánních hodin časově omezovat

citlivost na světlo, je pravděpodobně způsobena tím, že neurony v dorzomediální části SCN, odpovědné za endogenní rytmicitu, časově řídí fotosenzitivitu neuronů ventrolaterální části (Antle *et al.*, 2007). Na základě výše zmíněných údajů je tedy možné spekulovat, že vývoj schopnosti časově regulovat svou fotosenzitivitu závisí na dobrém propojení vlSCN a dmSCN nervovými synapsemi, které se dovršuje právě v P10 (Moore a Bernstein, 1989). Bez této časové regulace nemůže světlo cirkadiánní hodiny seřizovat a zřejmě proto přinejmenším v prvním týdnu života mláďat potkana nehraje světlo důležitou úlohu pro jejich synchronizaci.

### 3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Obecným cílem této diplomové práce bylo objasnit úlohu mateřského melatoninu při synchronizaci fetálních SCN a současně přispět k poznání mechanismu, kterým k této synchronizaci dochází. Za tímto účelem byl zkoumán účinek opakované aplikace melatoninu samicím s potlačenou tvorbou endogenního melatoninu vlivem expozice stálému světlu a/nebo pinealektomie na genovou expresi v SCN novorozených mláďat (cíle 1 a 2). Dále byl sledován akutní účinek podání melatoninu na expresi genů v SCN 20denních fetů (cíl 3).

#### **Konkrétní cíle:**

1. Porovnat rytmy v expresi genů *c-Fos* a *Avp* v SCN jednodenních mláďat, jejichž matky byly chovány na stálém světle a bylo jim opakovaně podáváno vehikulum nebo melatonin.

2. Porovnat rytmy v expresi genů *c-Fos* a *Avp* v SCN jednodenních mláďat, jejichž matky byly podrobeny pinealektomii, chovány na stálém světle a bylo jim opakovaně podáváno vehikulum nebo melatonin.

3. Porovnat okamžité hodnoty exprese genů *c-Fos*, *Avp* a *Per1* ve čtyřech různých časech během dne v SCN dvacetidenních plodů, jejichž matky byly chovány na stálém světle a bylo jim v různém intervalu před odběrem plodů podáno vehikulum nebo melatonin.

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1. Experimentální zvířata

K pokusům byly použity dospělé samice mladší jednoho roku života, mláďata a plody potkana (*Rattus norvegicus*) kmene Wistar (BioTest s.r.o., Konárovice, ČR). Zvířata byla chována ve standardních podmínkách, při regulované vlhkosti a teplotě 23 °C ± 2 °C a světelném režimu s 12 h světla a 12 h tmy (tma od 18:00 do 06:00). Osvětlení o intenzitě 50-200 luxů (dle umístění ve zvěřinci) dodávaly zářivky, které byly řízeny elektrickými spínacími hodinami. Samice byly chovány v chovných nádobách individuálně a během celého experimentu měly přístup ke standardním krmným peletám a vodě *ad libitum*.

Všechny experimenty byly prováděny ve shodě se zákonem na ochranu zvířat (license č. 42084/2003-1020) a byly schváleny etickou komisí Fyziologického ústavu AVČR (A5228-01).

### 4.2. Experimentální schémata

#### 4.2.1. Opakované podávání melatoninu intaktním březím samicím

V prvních dnech po řízeném zabřeznutí (metoda viz 4.3.) byly samice vystaveny stálému světlu a drženy v těchto podmínkách až do konce experimentu. Čas původního přechodu tmavé do světlé fáze, tj. 06:00 ráno, byl označen jako CT0 (z angl. *circadian time* 0, tj. počátek subjektivního dne) a čas přechodu světlé do tmavé fáze jako CT12 (tj. počátek subjektivní noci). První den, kdy byly samice shledány březí (metoda viz 4.3.) byl počítán jako E0. Počínaje dnem E17 byl každý den mezi CT11 a CT12 až do porodu intraperitoneálně (i.p.) aplikován pokusným samicím melatonin (v dávce 1 mg/kg, objem 200 µl) a kontrolním samicím vehikulum (fyziologický roztok s 1,5% etanolem, 200 µl).

Porody byly monitorovány buď vizuálně během pravidelných návštěv zvěřince, nebo případně pomocí videozáznamu pořízeného videokamerami umístěnými nad některým chovnými nádobami.

Novorozená mláďata byla odebírána během prvního dne po porodu každé 3 hodiny počínaje CT12 (tj. v CT12, CT15, CT18, CT21, CT0, CT3, CT6, CT9 a opět CT12). Vrhly mláďat byly odebírány buď celé, nebo případně půleny. Mláďata byla usmrcena rychlou dekapitací nůžkami. Hlavy byly okamžitě zamrazeny na suchém ledu, zabaleny do parafilmu proti vyschnutí a uchovávány při -80 °C až do následného zpracování pro stanovení profilů exprese genů *c-Fos* a *Avp* v SCN pomocí hybridizace *in situ* (viz 4.6.).

#### **4.2.2. Opakované podávání melatoninu pinealektomovaným březím samicím**

Samice byly podrobeny pinealektomii (operativnímu odnětí šišinky) nebo pouze slepé operaci (zvíře prodělalo všechny pomocné zákroky, ale šišinka mu vyoperována nebyla) a ponechány rekonvalescenci (metoda viz 4.5.). Poté byly zabřeznuty a umístěny na stálé světlo. Zbývající průběh pokusu se nelišil od 4.2.1.

Úspěšnost operativního odnětí či zachování šišinky byla na konci experimentu kontrolována dvěma způsoby: **1)** Samice podrobené pinealektomii a slepé operaci byly po porodech synchronizovány na světelném režimu s 12 h světla a 12 h tmy po dobu 10 dnů a poté byly v době mezi CT17 a CT20 (tj. uprostřed subjektivní noci, kdy je hladina endogenního melatoninu nejvyšší) v hluboké narkóze (thiopental, Valeant Czech Pharma, v dávce 50 mg/kg, i.p.) usmrceny rychlou dekapitací a vykřevy do připravených zkumavek. Krev byla ponechána 45 minut při pokojové teplotě a následně centrifugována (30 minut, 5 000 g). Odebrané sérum bylo použito na stanovení hladiny endogenního melatoninu (viz 4.8.). **2)** Bylo provedeno chirurgické otevření lebky a vizuálně byla zkoumána přítomnost/nepřítomnost šišinky „naslepo“, tj. bez znalosti experimentální procedury.

#### **4.2.3. Akutní podání melatoninu březím samicím**

Samice byly po zabřeznutí vystaveny stálému světlu (viz 4.2.1.). V E20 byl samicím podán jednorázově melatonin nebo vehikulum (dávka a podání viz 4.2.1.). Aplikace byla provedena buď v CT0, CT6, CT12 nebo CT18 a následně za 30, 60, 90, případně 120 minut byly samice uvedeny do hluboké anestézie (thiopental 50 mg/kg, i.p.) a usmrceny dekapitací. Plody byly vyňaty z těla matky a dekapitovány. Hlavy plodů byly okamžitě zmrazeny na suchém ledu, zabaleny do parafilmu proti vyschnutí a uchovávány při -80 °C do stanovení exprese *c-Fos*, *Avp* a *Per1* v SCN plodů pomocí hybridizace *in situ*.

#### **4.2.4. Odběr krve pro stanovení hladin kortikosteronu u březích samic po injekční aplikaci**

10 samic bylo zabřeznuto a chováno na stálém světle stejně jako v 4.2.1. V E17 bylo 5 pokusným samicím aplikováno vehikulum (200 µl fyziologického roztoku s 1,5% etanolu, i.p.) v době mezi CT11 a CT12 a 5 kontrolních samic bylo ponecháno intaktních. 30 minut po aplikaci vehikula byly samice uvedeny do hluboké narkózy (thiopental, 50 mg/kg, i.p.), dekapitovány a jejich krev zachycena do zkumavky. Současně byla odebrána krev i kontrolním samicím. Krev byla ponechána 45 minut při pokojové teplotě a následně

centrifugována (30 minut, 5 000 g). Získané sérum bylo zamraženo při -20 °C do stanovení hladin kortikosteronu (viz 4.7.).

### **4.3. Zabřezávání**

Pro určení stáří plodů během prenatalního období je nutné znát přesný termín početí. Užívá se proto plánovaného připouštění. Samice potkana procházejí čtyřdenním ovulačním cyklem, k zabřeznutí jsou připraveny jen ve fázi proestru. Před plánovaným zabřeznutím byly proto prováděny vaginální výplachy za pomoci kapátka a podle tvaru histologicky obarvených buněk (krezylová violet, Sigma) byla určena fáze ovulačního cyklu. V den proestru byly samice přes noc připuštěny k samcům a ráno byl proveden kontrolní výplach pro zjištění přítomnosti spermií. Den nálezu spermií se označuje jako E0. Porod přichází obvykle v E22 nebo E23.

### **4.4. Monitorování pohybové aktivity**

Pohybová aktivita zvířat v průběhu pokusu byla monitorována pomocí systému CAMS (Circadian Activity Monitoring System, INSERM, Francie). Systém snímá pohyb detektory infračerveného záření umístěnými přibližně 40 cm nad úroveň podestýlky. Signál z detektorů zaznamenává průmyslový počítač. Data se následně převedou na grafický záznam pohybové aktivity, tzv. aktogram. Aktogramy byly analyzovány pomocí programu Actiview (Mini Mitter Company, Inc. Bend, Oregon, USA).

### **4.5. Operativní vynětí šišinky**

#### **4.5.1. Materiál a vybavení**

##### **Nástroje a pomůcky:**

- stereotaktický aparát
- chirurgické nástroje: skalpely, nůžky, háky, pátradla, pinzety, jehelce, jehly a stehy
- elektrokauter
- zubní vrtačka
- injekční stříkačky a injekční jehly
- vatové tampóny
- Gelaspon (Chauvin ankerpharm GmbH, Německo)
- elektrická vyhřívaná dečka



### **Chemikálie a farmaka:**

- etanol (Tamda)
- fyziologický roztok
- ketamin (Narketan, Vétoquinol)
- xylazin (Xylapan, Vétoquinol)
- atropin (BB Pharma)
- Ajatin (Profarma-produkt)
- Ophthalmoseptonex (Galena)
- Framykoin (Biomedica)
- adrenalin (Zentiva)
- peroxid vodíku (Coopharma)
- Nurofen s příchutěmi, dva druhy (BCM Ltd., Velká Británie)

### **4.5.2. Postup operace**

Pinealektomie byla prováděna za účelem úplného odstranění zdroje endogenního melatoninu, cíle tedy mohlo být dosaženo jak v případě, kdy byla celá šišinka operativně vyjmuta, tak i v případě, kdy se nepodařilo šišinku celou vyjmout, ale byla zničena in situ. Operovány byly samice o váze 180-200 g. Úspěšnost zákroku byla kontrolována na konci experimentu (viz 4.2.2.).

Noc před operací bylo samicím odebráno krmivo pro lepší účinek anestézie. Do operační místnosti byly samice přeneseny nejméně půl hodiny před začátkem zákroku, aby přivykly novému prostředí. Anestézie byla navozena i.p. podáním 0,2 ml ketaminu (85 mg/kg) a 0,1 ml xylazinu (10 mg/kg). Do 10 minut zvířata ztratila vědomí a necítila nadále bolest. Při prvních náznacích probuzení během operace byla dávka anestetik navýšena. Pro snížení hlenění a rizika zadušení při operačním zákroku bylo dále aplikováno intramuskulárně 0,2 ml atropinu v dávce 0,1 mg/kg. Zvířatům byla ostříhána srst na temeni a odhalená kůže byla potřena Ajatinem pro dezinfekci operačního pole. Hlava byla upevněna do stereotaktického aparátu bez nároku na přesnost, zato však na pevnost úchytu. Oči byly pokryty Ophthalmoseptonexem, aby bylo zamezeno vysychání a náhodnému poranění.

Operace byla prováděna nástroji, které byly sterilizovány v autoklávu a pro opakovanou sterilizaci během operace byly pravidelně namáčeny do etanolu. Ostrým skalpelem byla rozříznuta kůže na hlavě podél šípového švu, rána byla roztažena háky, vazivo bylo

odstraněno a byla odhalena lebka. Pro zviditelnění lebečních švů bylo na lebku kápnuto několik kapek 3% peroxidu vodíku. Elektrokauterem bylo zabráněno případnému krvácení. Šišinka se nachází uprostřed pod lambdovým švem. Zubním vrtáčkem byl v tomto místě vyvrtán v lebce kruhový, případně trojúhelníkový otvor o průměru 3-5 mm. Do otvoru v lebce byl nakapán vychlazený fyziologický roztok nebo adrenalin pro omezení krvácení. Unikající krev byla zachytávána vatovými tampóny. Velmi ostrým skalpelem byla opatrně protrhnuta měkká mozková plena. Přímo nad šišinkou se nachází velký žilní splav a je proto třeba pinzetou pátrat pod ním, více kaudálním směrem pokud možno tak, aby nedošlo k jeho poškození. Šišinka je drobný kulovitý útvar nepřesahující rozměrem 1 mm.

Otvor v lebce byl vyplněn Gelasponem a okraje rány opět sešity k sobě. Zašitá rána byla posypána Framykoinem proti infekci a zvíře bylo umístěno na elektricky vyhřívanou dečku. Na kompenzaci ztrát tekutin byl zvířeti injekčně podán až 1 ml teplého fyziologického roztoku. Po probuzení (asi hodinu po podání anestetik) bylo zesláblé zvíře umístěno v chovné nádobě do těsné blízkosti potravy a vody.

Během prvního pooperačního dne dostala zvířata do pití přídavek analgetika Nurofenu s příchutí. Kvůli silné podmíněné chuťové averzi u potkanů byla příchut' Nurofenu následujícího dne změněna, aby se zvíře netrápilo žízni. Zvířata byla držena jednotlivě, aby se navzájem nezranila v pooperační ráně. Stehy byly vytaženy 10-14 dní po operaci. K zabřezávání byly samice připuštěny teprve nejméně měsíc po operaci, kdy byla operační rána zcela zhojena a překryta novou srstí.

## **4.6. Stanovení 24hodinového profilu transkripce genů c-Fos, Avp a Per1**

### **4.6.1. Materiál a vybavení**

#### **Přístroje:**

- Cryocut Leica CM 1850
- pH metr Denver Instruments BASIC
- termoblok Biometra TB1
- vodní lázně Julaba, Memmert
- horizontální elektroforéza Sigma
- spektrofotometr Eppendorf
- stereomikroskop Olympus SZX9

- automatická vyvolávačka Optimax x-ray processor
- counter Beckman LS 6500

**Chemikálie:**

- $^{35}\text{S}$ -UTP (1250 mCi/mmol; 10 mCi/ml) (M.G.P.)
- diethylpyrokarbonát (Sigma)
- acetát amonný ( $\text{NH}_4$ -acetát) (Sigma)
- kyselina trichloroctová (TCA) (P-lab)
- trietanolamin (TEA) (Sigma)
- fenol (Fluka)
- chloroform (Lachema)
- izoamylalkohol (Sigma)
- chlorid sodný (Sigma)
- dihydrogenfosforečnan sodný ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (Sigma)
- hydrogenfosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Sigma)
- paraformaldehyd (Fluka)
- kyselina chlorovodíková (Penta)
- acetanhydrid (Sigma)
- 96% etanol (Tanda)
- kvasinková tRNA (Sigma)
- agaróza (Seakem)
- etidiumbromid (Sigma)
- formamid (Sigma)
- mixed-bed resine (Bio-Rad)
- etylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Sigma)
- hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma)
- Ficoll-400 (Sigma)
- PVP-360 (Sigma)
- sodium dodecylsulfát (SDS) (Sigma)
- pyrofosforečnan sodný ( $\text{NaPPi}$ ) (Sigma)

- dithiotreitol (DTT) (Sigma)
- Denhardtův roztok (Sigma) (1x Denhardt's obsahuje 0,02% BSA, 0,02% PVP, 0,02% Ficoll)
- dextran sulfát (Sigma)
- Salmon sperm DNA (10 mg/ml) (Sigma)
- citrát sodný (Sigma)
- trizma base (Sigma)
- vývojka Adefomix (Fomax)
- ustalovač Adefofix (Fomax)
- tri(hydroxymetyl)aminoetan (TRIS) (Sigma)
- RNáza A (Sigma)
- octan amonný (Sigma)
- krezylová violet' (Sigma)
- histologický balzám DPX (Fluka)
- scintilační roztok Rotiszint eco plus (P-lab)
- xylen (Sigma)

#### **Kity:**

MaxiScript *in vitro* transkripční kit SP6 nebo T3 (Ambion):

- RNA polymeráza T3 a T7, nebo SP6
- 10x transkripční pufr
- ATP, GTP, CTP, UTP (10mM)
- DNáza I (prostá RNáz)
- nanášecí pufr II pro elektroforézu
- H<sub>2</sub>O (prostá RNáz)
- myší pTRI-aktin (0,5 mg/ml)

#### **4.6.2 Příprava tkáňových řezů**

Hlavy usmrcených mláďat byly okamžitě zmrazeny na suchém ledu, zabaleny do parafilmu proti vyschnutí a uchovávány při -80 °C. Na přístroji Cryocut Leica CM 1850 byly při teplotě přibližně -24 °C připraveny koronální 12 µm silné řezy mozkiem obsahující celý

rostro-kaudální rozsah SCN. Pro fixaci mozku na krájecí bloček byl použit Cryomount (Histolab Products AB, Švédsko) a nakrájené řezy byly umístěny na podložní skla SuperFrost Plus (Menzel GmbH & Co KG, Německo). Po zaschnutí řezů byla skla skladována při -80 °C.

### 4.6.3 Příprava značené cRNA próby

#### 4.6.3.1. Pracovní roztoky

- chloroform/izoamylalkohol (IC): chloroform a izoamylalkohol v poměru 49:1
- fenol/chloroform/izoamylalkohol (PIC): smíchat chloroform a IC v poměru 1:1
- DEPC H<sub>2</sub>O – 1 ml diethylpyrokarbonátu na 1 litr dH<sub>2</sub>O
- 75% etanol: 37,5 ml 96% etanolu + DEPC H<sub>2</sub>O
- 7,5M NH<sub>4</sub>-acetát: 57,81 g NH<sub>4</sub>-acetát do 100 ml DEPC H<sub>2</sub>O, filtrace přes 0,22µm filtr
- 5M NH<sub>4</sub>-acetát: 38,54 g NH<sub>4</sub>-acetát do 100 ml DEPC H<sub>2</sub>O, filtrace přes 0,22µm filtr
- 10% TCA: 20% TCA a DEPC H<sub>2</sub>O v poměru 1:1

#### 4.6.3.2. Metoda

Přímo v tkáňových řezech byly hladiny *c-Fos* mRNA, *Avp* hnRNA a *Per1* mRNA detekovány hybridizací se značenou antisense próbou. Próba byla značena radioaktivním uridinem <sup>35</sup>S-UTP (1250 mCi/mmol, 10 mCi/ml), který byl do próby zainkorporován při syntéze RNA polymerázou podle daného templátu. Jako templát byly posloužily cDNA fragmenty příslušných genů vložené do vektorů pGem-T Easy, laskavě věnovaných profesorem Hitoshi Okamura (Kobe University School of Medicine, Japonsko). Vlastnosti takto získaných prób jsou shrnuty v následující tabulce:

gen	insert (bp)	linearizční enzym	RNA polymeráza	hybridizační teplota (°C)	expozice filmu (dny)
<b>r <i>c-Fos</i></b>	1160	Hind III	T3	60	14
<b>r <i>Avp</i></b>	506	Nco I	SP6	60	14
<b>r <i>Per1</i></b>	980	Sal I	T7	60	10

#### Postup:

##### 1. Linearizace plazmidu (bulk linearizace) pro přípravu antisense cRNA próby

– do reakce napipetovat:

- 30 µg plazmidu
- 25 µl restriční pufru
- 25 µl restriční endonukleázy
- celou reakci doplnit ddH<sub>2</sub>O do výsledného objemu 250 µl
- inkubovat 4 hodiny při 37 °C v termobloku

## 2. Analýza na 1% agarózovém gelu

### 3. Purifikace linearizovaných plazmidů:

- k 250µl reakci přidat 250 µl PIC, promíchat, centrifugace 5 minut (18 000 rpm, 4 °C)
- k horní vodné fázi přidat 250 µl PIC, promíchat, centrifugace 5 minut (18 000 rpm, 4 °C)
- k horní vodné fázi přidat 250 µl IC, promíchat, centrifugace 5 minut (18 000 rpm, 4 °C)
- k horní vodné fázi přidat 75 µl 10M NH<sub>4</sub>-acetátu (výsledná koncentrace 2,5 M) a 650 µl 96% etanolu (-20 °C), promíchat
- precipitace 40 minut v -80 °C, centrifugace 20 minut (18 000 rpm, 4 °C), odebrat supernatant
- promýt peletu 700 µl 75% etanolu (-20°C), centrifugace 20 minut (18 000 rpm, 4 °C), odebrat zcela supernatant
- vysušit peletu 15 minut při pokojové teplotě a rozpustit ve 30 µl DEPC H<sub>2</sub>O
- kontrola purifikovaného plazmidu elektroforeticky na 1% agarózovém gelu a spektrofotometricky

### 4. Radioaktivní značení ribopróby pomocí *in vitro* transkripce

- do sterilní zkumavky napipetovat (při pokojové teplotě):
- 5,5 µl DEPC H<sub>2</sub>O
- 1,5 µl plazmidu (upravit dle koncentrace plazmidu, 1 µg do reakce)
- 2 µl 10x transkripčního pufru
- 1 µl 10mM ATP
- 1 µl 10mM CTP
- 1 µl 10mM GTP
- 1 µl neznačeného UTP (200 µM)

- 5  $\mu\text{l}$   $^{35}\text{S}$ -UTP (1250 mCi/mmol)
- 2  $\mu\text{l}$  RNA polymerázy (SP6/T7/T3)
- promíchat pipetou, inkubovat 60 minut při 37 °C v termobloku
- přidat 1  $\mu\text{l}$  DNázy I, inkubovat 20 minut při 37 °C v termobloku
- zastavit reakci přidávkem 1  $\mu\text{l}$  sterilní 0,5M EDTA (pH 8,0)
- purifikace radioaktivně značené ribopróby pomocí kolonek Clontech (Chromaspin), centrifugace (5 min, 1000 g)
- uložit až do dalšího použití do -80 °C

#### 5. Stanovení inkorporace $^{35}\text{S}$ -UTP

- k 19  $\mu\text{l}$  DEPC H<sub>2</sub>O přidat 1  $\mu\text{l}$  značené ribopróby
- vystříhat Whatman GF/A filtry (Sigma) různého tvaru, 4 ks pro každou ribopróbu
- na každý ze čtyř filtrů napipetovat po 2  $\mu\text{l}$  příslušné ředěné próby, po zaschnutí dva z každé čtveřice filtrů vložit do scintilační zkumavky s 10 ml scintilačního roztoku Rotiszint eco plus (= total)
- zbývající dva z čtveřic filtrů: promýt 20 ml 10% TCA (4 °C), 3x po 5 minutách
- promýt 20 ml 96% etanolu (4 °C), 5 minut
- nechat filtry uschnout, roztrždit podle odlišných tvarů, vložit do 10 ml scintilačního roztoku Rotiszint eco plus (= wash)
- analýza vzorků pomocí scintilačního počítače; poměr  $\frac{\text{wash}(cpm)}{\text{total}(cpm)}$  udává procenta inkorporace  $^{35}\text{S}$ -UTP do cRNA próby

### 4.6.4. Prehybridizace

#### 4.6.4.1. Pracovní roztoky

- DEPC H<sub>2</sub>O – 1 ml diethylpyrokarbonátu na 1 litr dH<sub>2</sub>O
- DEPC-PBS: 8,77 g NaCl + 0,36 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> v 1 litru DEPC H<sub>2</sub>O, pH upravit na 7,4
- 4% PFA: 20 g paraformaldehydu v 500 ml DEPC H<sub>2</sub>O, rozpuštěno zahřátím na 65 °C, pH upraveno na 7,4; vždy čerstvý roztok
- 0,2N HCl: 16,67 ml HCl (12N, 36,97%) v 1 litru DEPC H<sub>2</sub>O
- 0,1M TEA: 18,57 g trietanolaminu v 1 l DEPC H<sub>2</sub>O, pH upravit na 8,0; vždy čerstvý roztok

- pro acetylaci použít 1 ml acetanhydridu na 400 ml TEA
- 70% etanol: 350 ml 96% etanolu + 130 ml DEPC H<sub>2</sub>O

#### 4.6.4.2. Metoda

Mozkové řezy je třeba před samotnou hybridizací připravit promýváním sérií roztoků. Skla s řezy se nechají prohřát na pokojovou teplotu a oschnout. Celá prehybridizace probíhá při pokojové teplotě a ve sterilních podmínkách. Skla ve stojáncích po dvaceti jsou umístěna v kyvetách se 400 ml příslušného roztoku.

#### Postup:

- fixace: 4% PFA v DEPC-PBS, 40 minut
- promytí: 2x DEPC-PBS po 5 minutách
- deproteinace: 0,2N HCl, 5 minut
- promytí: DEPC-PBS, 5 minut
- inkubace v 0,1M TEA, 2 minuty, třepat
- acetylace: 0,25% acet anhydrid v TEA, 10 minut, třepat
- promytí: DEPC-PBS, 5 minut
- dehydratace: 70% etanol, 5 minut; 96% etanol, 5 minut

Skla se nechají oschnout při pokojové teplotě a jsou připravena k následné hybridizaci.

#### 4.6.5. Hybridizace

##### 4.6.5.1. Pracovní roztoky

- deionizovaný formamid: 50 ml formamidu + 2,5 g mixed bed resine (Bio-Rad), 30 minut míchat, filtrace přes 0,22μm filtr, uchovávat v -20 °C
- DEPC H<sub>2</sub>O – 1 ml diethylpyrokarbonátu na 1 litr dH<sub>2</sub>O
- 20x SSPE: 40 ml DEPC H<sub>2</sub>O + 12,62 g NaCl + 1,66 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 2,4 ml EDTA (0,5M, pH 8,0), promíchat, doplnit DEPC H<sub>2</sub>O na 60 ml
- 100x Denhardt's: 200 mg BSA + 200 mg Ficoll-400 + 200 mg PVP-360 + 10 ml DEPC H<sub>2</sub>O
- kvasinková tRNA: 25 mg tRNA + 1 ml DEPC H<sub>2</sub>O
- 10% SDS: 10 g SDS + 100 ml DEPC H<sub>2</sub>O, rozpustit zahřátím na 50 °C
- 5% NaPPi: 2,5 g pyrofosforečnanu sodného + 50 ml DEPC H<sub>2</sub>O, filtrace přes 0,22μm filtr



- 0,5M DTT: 0,1542 g DTT + 2 ml DEPC H<sub>2</sub>O
- hybridizační pufr (HP):
  - 25 ml deionizovaný formamid (výsledná koncentrace 10 %)
  - 5 g dextran sulfát (v. k. 10 %)
  - 12,5 ml 20x SSPE (v. k. 0,9M NaCl, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5mM EDTA)
  - 1 ml 100x Denhardt's (v. k. 0,4% BSA, 0,4% Ficoll, 0,4% PVP)
  - 1 ml kvasinkové tRNA (25 mg/ml) (v. k. 500 µg/ml)
  - 2,5 ml Salmon sperm DNA (10 mg/ml) (v. k. 500 µg/ml)
  - 0,5 ml 10% SDS (v. k. 0,1%)
  - 1 ml 5% NaPPi (v. k. 0,1%)
  - doplnit DEPC H<sub>2</sub>O do objemu 50 ml

#### 4.6.5.2. Metoda

##### Postup:

- na ledu k 1 ml hybridizačního pufru přidat 100 µl 0,5M DTT, promíchat.
- přidat připravenou ribopróbu (takové množství, aby výsledná aktivita byla  $2,75 \times 10^6$  cpm na 1 ml hybridizačního pufru)
- denaturace 5 minut při 85°C v termobloku
- přenést hybridizační pufr do termobloku s hybridizační teplotou (v tomto případě vždy 60 °C)
- nanést 70 µl hybridizačního pufru na krycí sklíčko a přiložit prehybridizované podložní sklo s řezy, je důležité nezanést mezi sklíčka žádné bublinky
- vyskládat skla do hybridizačního boxu, přidat dva drobné uzávěry od scintilačních lahvíček s DEPC-H<sub>2</sub>O pro udržení vlhkosti, obalit box alobalem
- nechat inkubovat 20-24 hodin při hybridizační teplotě (60 °C)

#### 4.6.6. Odmývání nezhybridizované próby a autoradiografie

##### 4.6.6.1. Pracovní roztoky

- 20x SSC: 175,3 g NaCl + 88,2 g citrátu sodného v 1 litru dH<sub>2</sub>O, pH upravit na 7,0
- 2x SSC / 0,05% NaPPi / 1mM EDTA: 200 ml 20x SSC + 20 ml 5% NaPPi + 4 ml 0,5M EDTA v 1776 ml dH<sub>2</sub>O
- 0,1x SSC / 0,05% NaPPi / 1mM EDTA: 10 ml 20x SSC + 20 ml 0,05% NaPPi + 4 ml 0,5M

EDTA v 1996 ml dH<sub>2</sub>O

- 1M Tris-HCl: 60,55 g Trizma base + 400 ml dH<sub>2</sub>O + 21 ml HCl, pH upravit na 8,0, doplnit dH<sub>2</sub>O do 500 ml
- RNázový pufr: 29,2 g NaCl + 990 ml dH<sub>2</sub>O + 10 ml tris-HCl (pH 8,0)
- RNáza A (20 mg/ml): 20 mg lyofilizované RNázy + 1 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), povahění zbaví RNázu stopové DNázové aktivity
- 96% etanol / 0,3M octan amonný: 9,248 g octan amonný + 400 ml 96% etanolu
- 70% etanol / 0,3M octan amonný: 9,248 g octan amonný + 292 ml 96% etanolu + 108 ml dH<sub>2</sub>O
- CV diferenciál: 90 ml 96% etanolu + 10 ml chloroformu + kapka kyseliny octové

#### 4.6.6.2. Metoda

V tkáňových řezech došlo k hybridizaci značené ribopróby s přirozeně transkribovanou mRNA. Přebytná próba byla odstraněna, aby bylo zamezeno její nespecifické vazbě. Ze skel s řezy bylo mácháním v roztoku 2x SSC odstraněno krycí sklíčko a skla byla vyskládána do stojánků. Odmývání bylo prováděno v 400ml kyvetách, jednotlivé roztoky jsou uvedeny níže. Při práci je třeba dbát pravidel bezpečnosti práce s radioaktivním materiálem.

- 2x SSC, 30 minut, pokojová teplota
- RNáza A v RNázovém pufru (10 µg/ml), 60 minut, 42 °C, vodní lázeň
- 2x SSC, 30 minut, pokojová teplota
- 0,1x SSC, 2x 30 minut, vodní lázeň za hybridizační teploty (60 °C)
- 0,1x SSC, 2x 20 minut, pokojová teplota
- 70% etanol / 0,3M octan amonný, 5 minut, pokojová teplota
- 96% etanol / 0,3M octan amonný, 5 minut, pokojová teplota

Skla se nechala oschnout a vyskládala se do autoradiografické kazety. Potmě byl na skla přiložen vysokocitlivý film Kodak BioMax MR. Film se nechal exponovat při -20 °C v případě genů *c-Fos* a *Avp* 14 dní, pro gen *Per1* 10 dní. Filmy byly vyvolány na automatickém přístroji Optimax x-ray processor.

Přítomnost a poloha SCN na radiografickém filmu byla detekována pomocí porovnání obrazu na filmu s histologicky obarvenými mozkovými řezy na sklech. Řezy na sklech byly proto obarveny krezylou violetí a byly z nich připraveny trvalé preparáty. Skla byly obarvena po jednom postupně v kyvetách s následujícími roztoky:

- xylen, 5 minut
- 95% etanol, 2x 3 minuty
- 70% etanol, 3 minuty
- dH<sub>2</sub>O, 1 minuta
- 0,25% krezolová violet', 2 minuty
- dH<sub>2</sub>O, 2x 15 sekund
- CV diferenciál, 1 minuta
- 70% etanol, 30 sekund
- 95% etanol, 2x 30 sekund
- xylen, 2x 30 sekund

Po obarvení byl na skla nanesen histologický balzám (DPX, Sigma) a byla přiklopena krycím sklíčkem smočeným v xylenu. Skla se nechala tři dny zaschnout a před mikroskopickým pozorováním z nich bylo odstraněno přebytečné lepidlo.

#### **4.6.7. Kvantifikace radiografického signálu**

Mezi obarvenými řezy na sklech byly pod mikroskopem (Olympus SZX9) vyhledány optimální řezy obsahující reprezentativní SCN. Odpovídající obrazy řezů na filmech byly zvětšeny pod mikroskopem, nasnímány černobílou kamerou Sony a převedeny do počítačového programu Cell<sup>P</sup> (Olympus) pro digitální analýzu obrazu. Jeho pomocí byla proměřena optická denzita obou SCN a pozadí. Hodnoty byly převedeny do tabulky a v programu Excel (Microsoft) byl spočten průměr mezi levým a pravým SCN a odečtena od něj optická denzita pozadí.

### **4.7. Měření hladiny hormonu kortikosteronu metodou RIA**

#### **Přístroje:**

- termoblok Biometra TB1
- centrifuga
- counter Beckman LS 6500

#### **Kit:**

Rat corticosterone <sup>3</sup>H kit (MP Biomedicals), který obsahuje:

- protilátku antikortikosteron
- kortikosteron značený <sup>3</sup>H

- standardy kortikosteronu 0,025-1,0 ng/0,5 ml
- živočišné uhlí v prášku
- rozpouštědlo živočišného uhlí
- rozpouštědlo steroidů

Potkaní sérum bylo zpracováno podle návodu pro práci s kitem Rat cortikosterone <sup>3</sup>H od MP Biomedicals. Hladina kortikosteronu byla v séru proměřena metodou RIA.

## 4.8. Měření hladiny hormonu melatoninu metodou RIA

### Přístroje:

- termoblok Biometra TB1
- centrifuga
- counter Beckman LS 6500

### Kit:

Melatonin Research RIA kit (Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG, Německo), který obsahuje:

- melatonin antisérum
- melatonin s navázaným <sup>125</sup>I
- srážecí činidlo
- standardy melatoninu
- kontrolní roztoky
- suspenzi živočišného uhlí
- enzymatický roztok
- dva druhy pufrů
- filtry a zkumavky

Potkaní sérum bylo zpracováno podle návodu pro práci s kitem Melatonin Research RIA od Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG. Hladina melatoninu byla v séru proměřena metodou RIA.

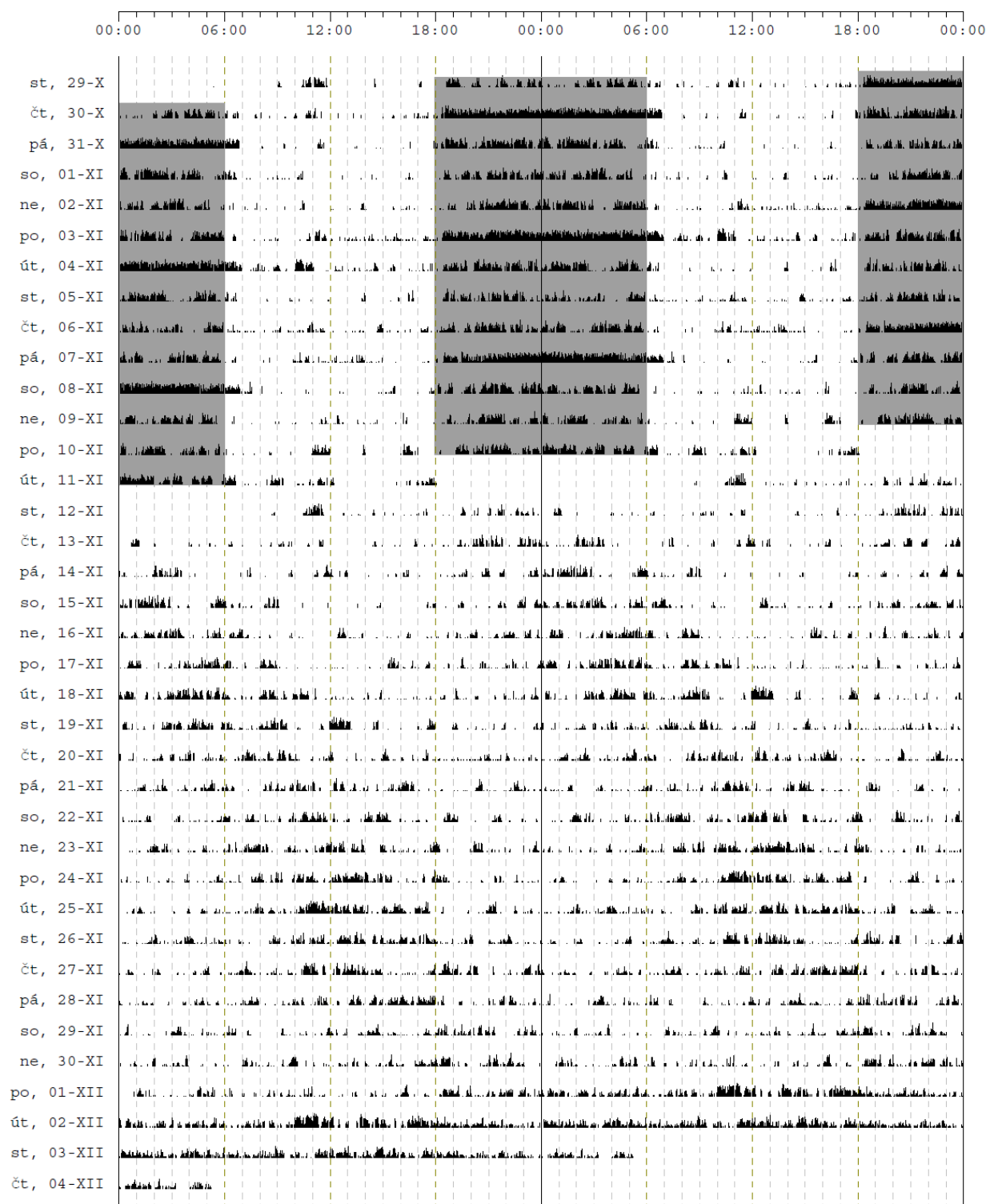
## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Opakované podávání melatoninu intaktním březím samicím

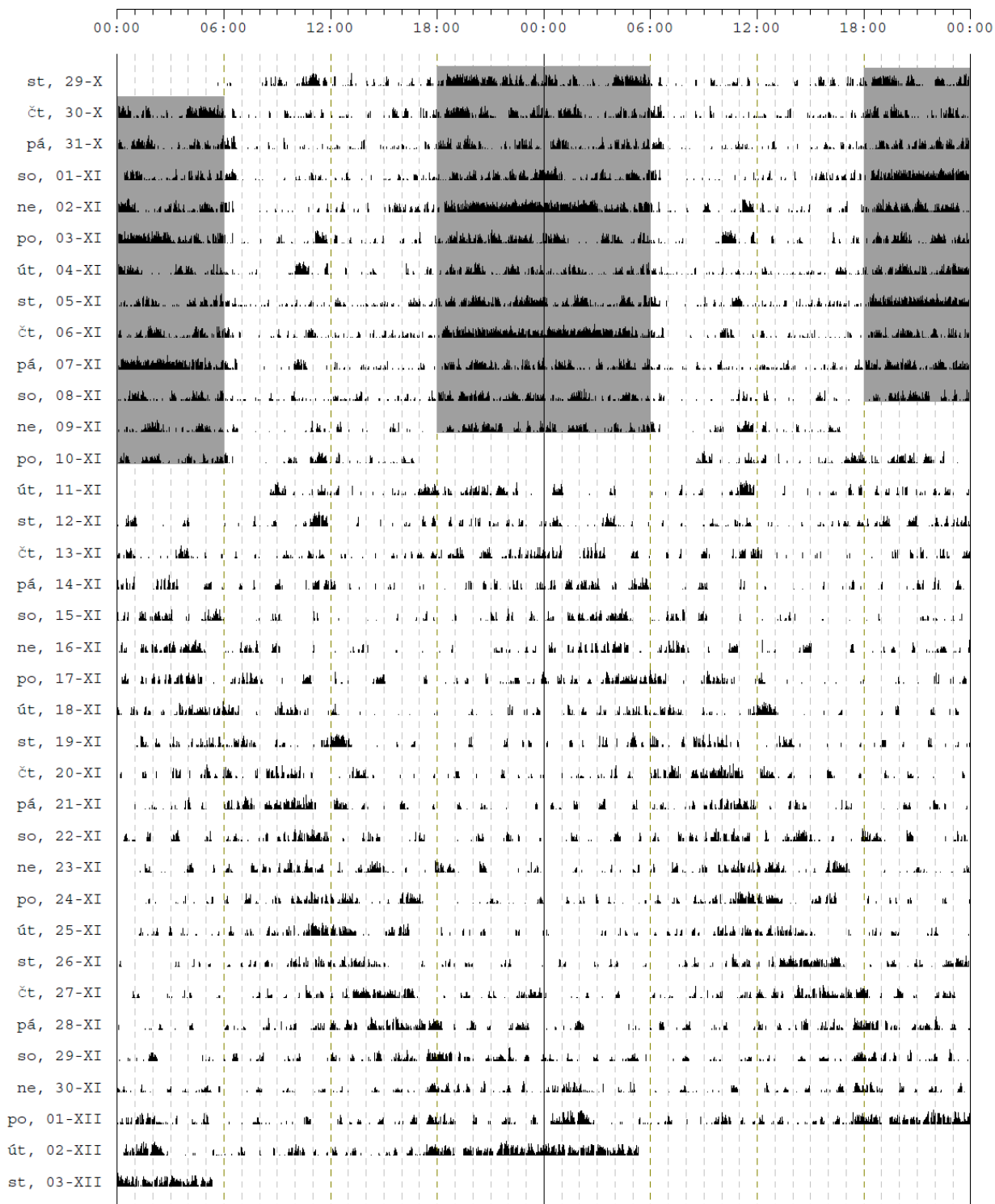
Cílem tohoto pokusu bylo zjistit vliv opakovaného podávání melatoninu v době od E17 do porodu březím samicím chovaným na stálém světle na expresi genů *c-Fos* a *Avp* v SCN jejich novorozených mlád'at.

#### 5.1.1. Vliv experimentálních podmínek na pohybovou aktivitu

V průběhu pokusu byla po dobu pěti týdnů monitorována pohybová aktivita potkanů v chovných nádobách (viz 4.4.). Záznamy aktivity (aktogramy) zachycují období od umístění samic ve zvěřinci na standardním režimu 12 h světla a 12 h tmy, přes zabřeznutí a umístění na stálé světlo, až po porod a odběr mlád'at (viz obr. 4 a 5). Podle očekávání byly samice na světelném režimu 12 h světla a 12 h tmy aktivní převážně během tmavé fáze dne. Po zabřeznutí byly vypuštěny na stálé světlo a jejich pohybová aktivita začala nejprve „volně běžet v čase“ s periodou delší než 25 h. Ve druhé polovině březosti se postupně rytmus rozpadal a v závěru březosti byly samice zcela arytmičné. Injekční aplikace melatoninu a vehikula od E17 do porodu každý den okolo CT12 mělo různý vliv na aktivitu samic. Přibližně u poloviny samic byla pohybová aktivita synchronizována dobou injekční aplikace, přičemž nebyl žádný rozdíl mezi samicemi, kterým byl aplikován melatonin (56 % ovlivněných, 44 % neovlivněných), a těmi, které obdržely vehikulum (50 % ovlivněných, 50 % neovlivněných). Reprezentativní aktogram samice, jejíž pohybová aktivita nebyla významně injekčním podáním ovlivněna je na obr. 4. a aktogram samice, jejíž aktivita byla naopak ovlivněna významně je na obr. 5.



**Obr. 4:** Reprezentivní aktogram samice, jejíž pohybová aktivita nebyla významně ovlivněna injekční aplikací. Černě je vynesena záznam intenzity pohybu. Vodorovně je znázorněn průběh času v hodinách v rámci dvou po sobě následujících dnů. V době od 29. X. do 12. XI. byla samice potkana vystavena pravidelnému střídání 12 hodin světla (6:00 - 18:00) a 12 tmy (18:00 - 6:00) - tma je vyznačena tmavými obdélníky. V noci z 11. na 12. XI. byla samice připuštěna k samci mimo monitorovací systém. Od 12. XI. až do 4. XII. byla samice vystavena stálému světlu. Od 29. XI. do 3. XII. včetně byla samici podávána injekce každý den mezi 17:00 a 18:00. Porod nastal 4. XII. v ranních hodinách.



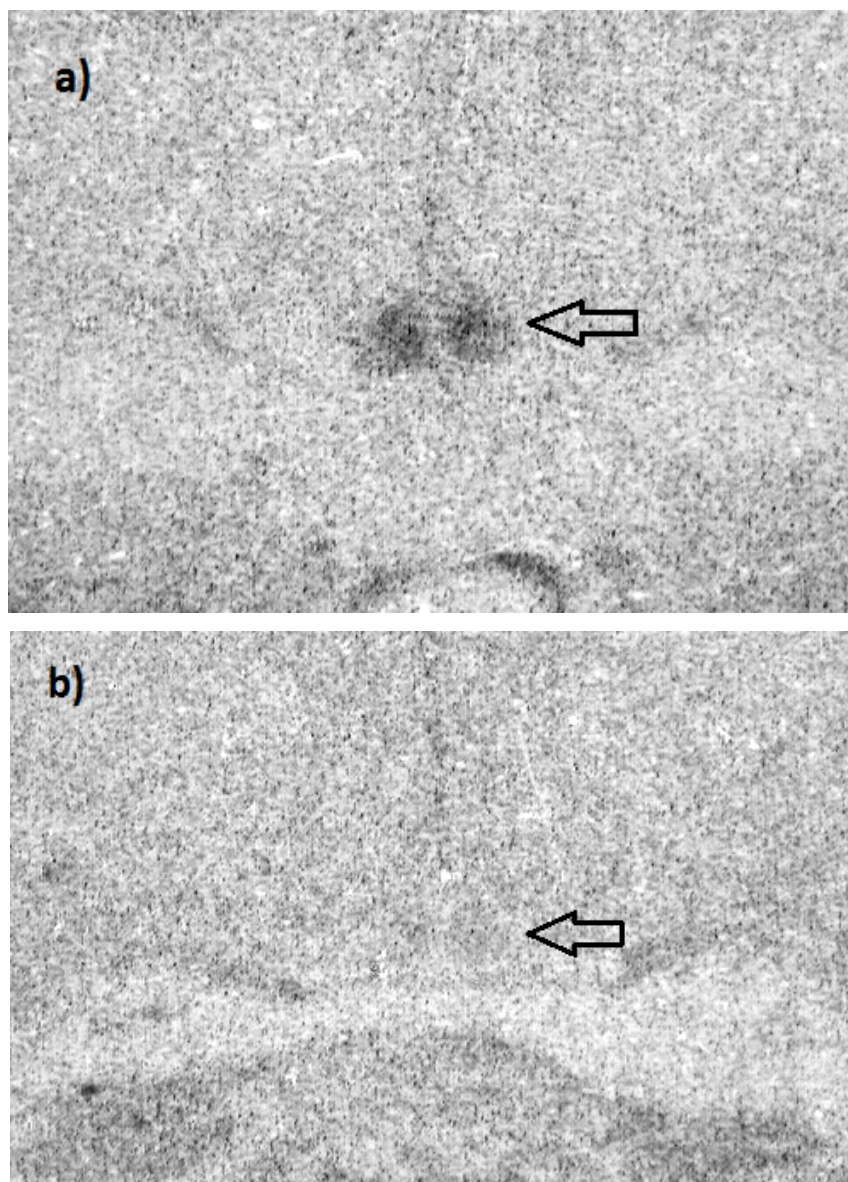
**Obr. 5:** Reprezentativní aktogram samice, jejíž pohybová aktivita byla významně ovlivněna injekční aplikací. Černě je vynesena záznam intenzity pohybu. Vodorovně je znázorněn průběh času v hodinách v rámci dvou po sobě následujících dnů. V době od 29. X. do 11. XI. byla samice potkana vystavena pravidelnému střídání 12 hodin světla (6:00 - 18:00) a 12 tmy (18:00 - 6:00) - tma je vyznačena tmavými obdélníky. V noci z 10. na 11. XI. byla samice připuštěna k samci mimo monitorovací systém. Od 11. XI. až do 4. XII. byla samice vystavena stálému světlu. Od 28. XI. do 2. XII. včetně byla samici podávána injekce každý den mezi 17:00 a 18:00. Porod nastal 3. XII. v ranních hodinách.

### **5.1.2. Vliv opakovaného podávání melatoninu březím samicím na 24hodinové profily exprese genů *c-Fos* a *Avp* v SCN jednodenních mlád'at**

Denní profily hladin *c-Fos* mRNA a *Avp* hnRNA byly stanoveny v SCN jednodenních mlád'at narozených matkám, kterým byl podáván melatonin (pokusná skupina), a matkám, kterým bylo podáváno vehikulum (kontrolní skupina) pomocí metody hybridizace *in situ*. Obr. 6 demonstruje polohu a intenzitu hybridizačního signálu na autoradiografickém filmu v případě maximální hodnoty signálu (obr. 6a) a minimálního signálu (obr. 6b).

Každý časový bod ve výsledných denních profilech exprese genů reprezentuje 4-12 naměřených hodnot (ve dvou případech jsou to pouze 3 hodnoty). Pro stanovení denního profilu exprese genu *c-Fos* bylo použito celkem 134 reprezentativních řezů mláděcích SCN, pro gen *Avp* 71 reprezentativních řezů.





**Obr. 6:** Ukázka reprezentativního autoradiografického filmu zachycujícího hybridizační signál radioaktivní próby v SCN jednodenního mláděte po hybridizaci in situ. Obrázek demonstruje **a)** SCN s vysokou hladinou exprese genu *c-Fos*, obrázek **b)** SCN s nízkou hladinou exprese genu *c-Fos*. Umístění SCN je naznačeno šipkami.

#### **5.1.2.1. Vliv opakovaného podávání melatoninu březím samicím na 24hodinový profil hladiny *c-Fos* mRNA v SCN jednodenních mlád'at**

Denní profily hladin *c-Fos* mRNA v SCN pokusných a kontrolních mlád'at, zobrazené na obr. 7a, byly podrobeny statistickému porovnání pomocí dvojné analýzy variance. Dvojná analýza variance prokázala statisticky významný vliv času ( $F = 6,809$ ,  $p < 0,001$ ). Rozdíl mezi skupinami kontrolních a pokusných zvířat nedosahoval statistické významnosti ( $F = 1,980$ ,  $p = 0,162$ ), avšak test odhalil statisticky významné interakce mezi vlivem času a skupin ( $F = 6,511$ ,  $p < 0,001$ ). Následný Student-Newman-Keulsův test prokázal na 5% hladině

pravděpodobnosti signifikantní rozdíly mezi oběma profily v pěti časových bodech: CT12, CT18, CT21, CT24 a CT3 (viz obr. 7a). U kontrolních zvířat hladiny mRNA významně klesaly z vysokých hodnot v CT18 k nízkým hodnotám v CT3 ( $p = 0,005$ ). U pokusných mláďat hladiny mRNA významně stoupaly z nízkých hodnot v CT 12 (oproti CT 21,  $p < 0,001$ ) a od CT21 opět významně klesaly až k CT12' ( $p < 0,001$ ). Ze statistického porovnání je tedy patrné, že se profily exprese *c-Fos* v SCN pokusných a kontrolních mláďat významně liší.

Pro zjištění vzájemného fázového vztahu mezi oběma profily byla použita metoda kosinorové analýzy, která umožňuje naměřenými hodnotami proložit sinusoidální křivku (viz obr. 8). Pro skupinu kontrolních zvířat byla vypočtena akrofáze v  $CT17,2 \pm 0,6$  h ( $R^2 = 0,34$ ) a pro skupinu pokusných zvířat akrofáze v  $CT22,9 \pm 0,7$  h ( $R^2 = 0,4$ ). Porovnání hodnot akrofází t-testem prokázalo vysoce signifikantní rozdíl mezi akrofázemi obou skupin ( $p < 0,001$ ).

Výsledky ukázaly, že opakované podávání melatoninu březím samicím v období před porodem mělo významný vliv na rytmus v expresi genu *c-Fos* v SCN jejich novorozených mláďat. Podávání melatoninu vyvolalo fázové předběhnutí tohoto rytmu přibližně o 6 hodin oproti podávání vehikula.

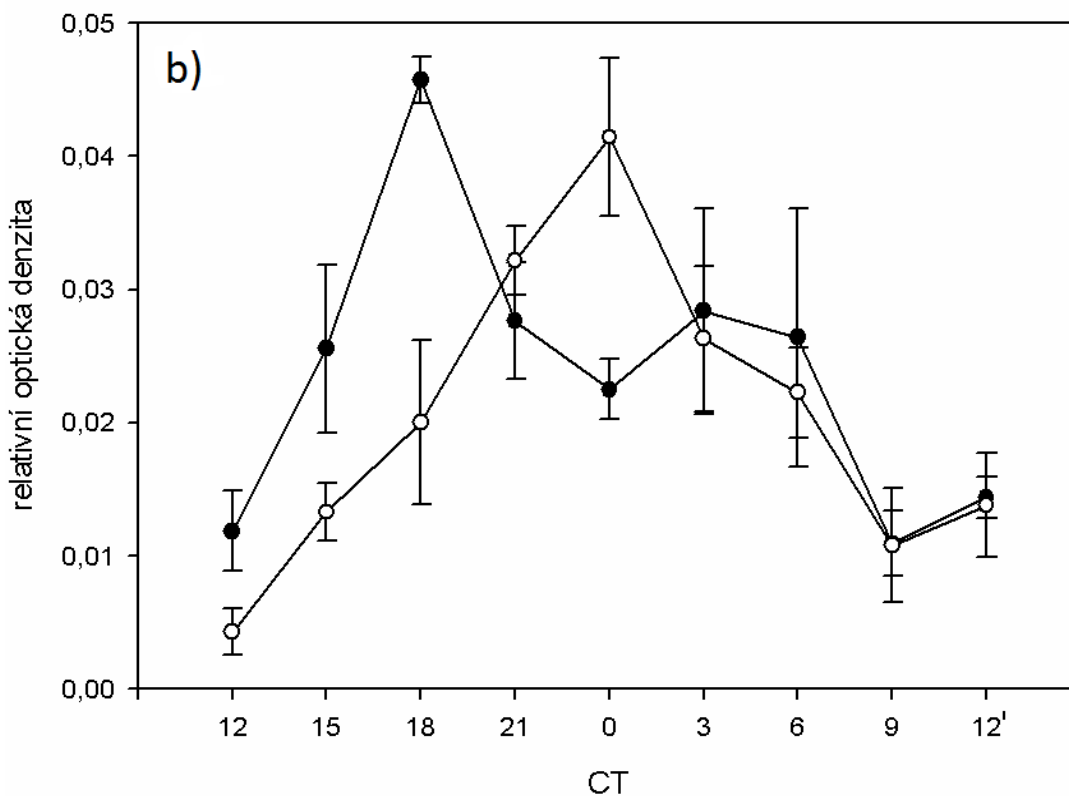
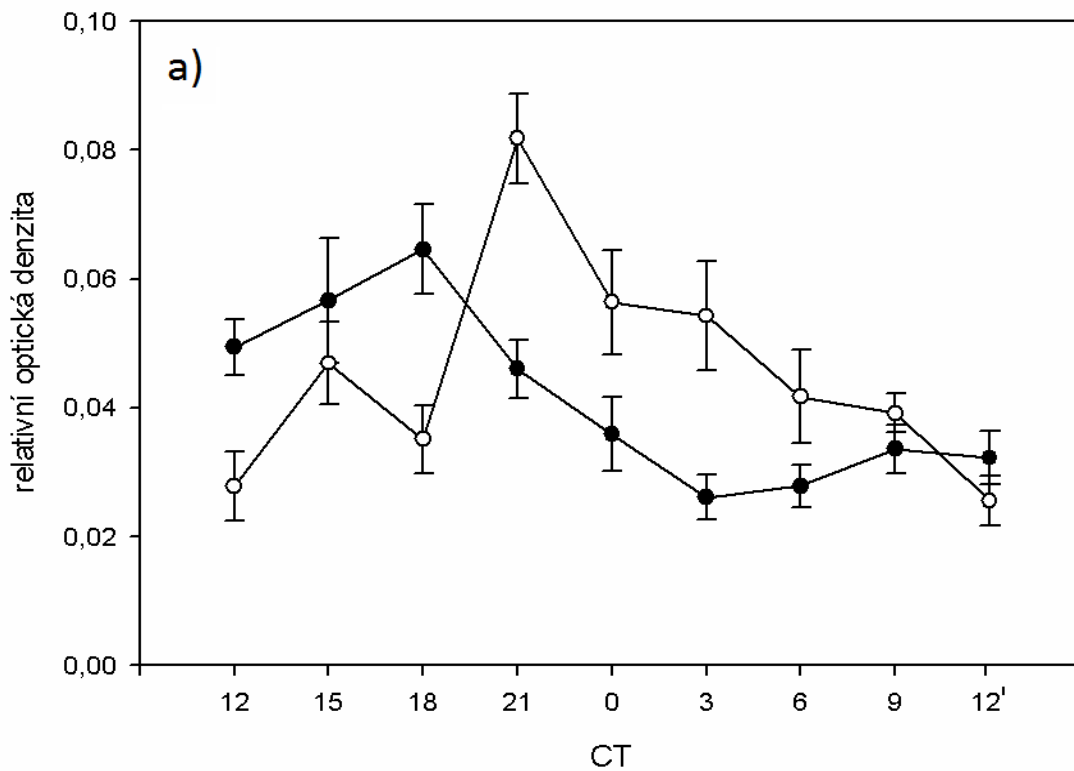
#### **5.1.2.2. Vliv opakovaného podávání melatoninu březím samicím na 24hodinový profil hladiny *Avp* hnRNA v SCN jednodenních mláďat**

Denní profily hladin *Avp* hnRNA v SCN pokusných a kontrolních mláďat, zobrazené na obr. 7b, byly podrobeny statistickému porovnání pomocí dvojné analýzy variance. Byl prokázán statisticky významný vliv času ( $F = 7,583$ ,  $p < 0,001$ ). Rozdíl mezi oběma skupinami nebyl statisticky významný ( $F = 2,021$ ,  $p = 0,161$ ), byla však prokázána signifikantní interakce času a skupin ( $F = 3,236$ ,  $p = 0,005$ ). Student-Newman-Keulsův test dále vyhodnotil na 5% hladině jako signifikantně rozdílné hodnoty obou profilů v časových bodech CT18 a CT0 (viz obr. 7b). U kontrolních zvířat hladiny hnRNA významně stoupaly z nízkých hodnot v CT12 (oproti CT18,  $p < 0,001$ ) a opět významně klesaly až do CT9 (oproti CT18,  $p < 0,001$ ). U pokusných mláďat hladiny hnRNA statisticky významně stoupaly mezi CT12 a CT0 ( $p < 0,001$ ) a opět významně klesaly od CT0 k CT9 ( $p = 0,005$ ). Ze statistického porovnání je tedy patrné, že se profily exprese *Avp* v SCN pokusných a kontrolních mláďat významně liší.

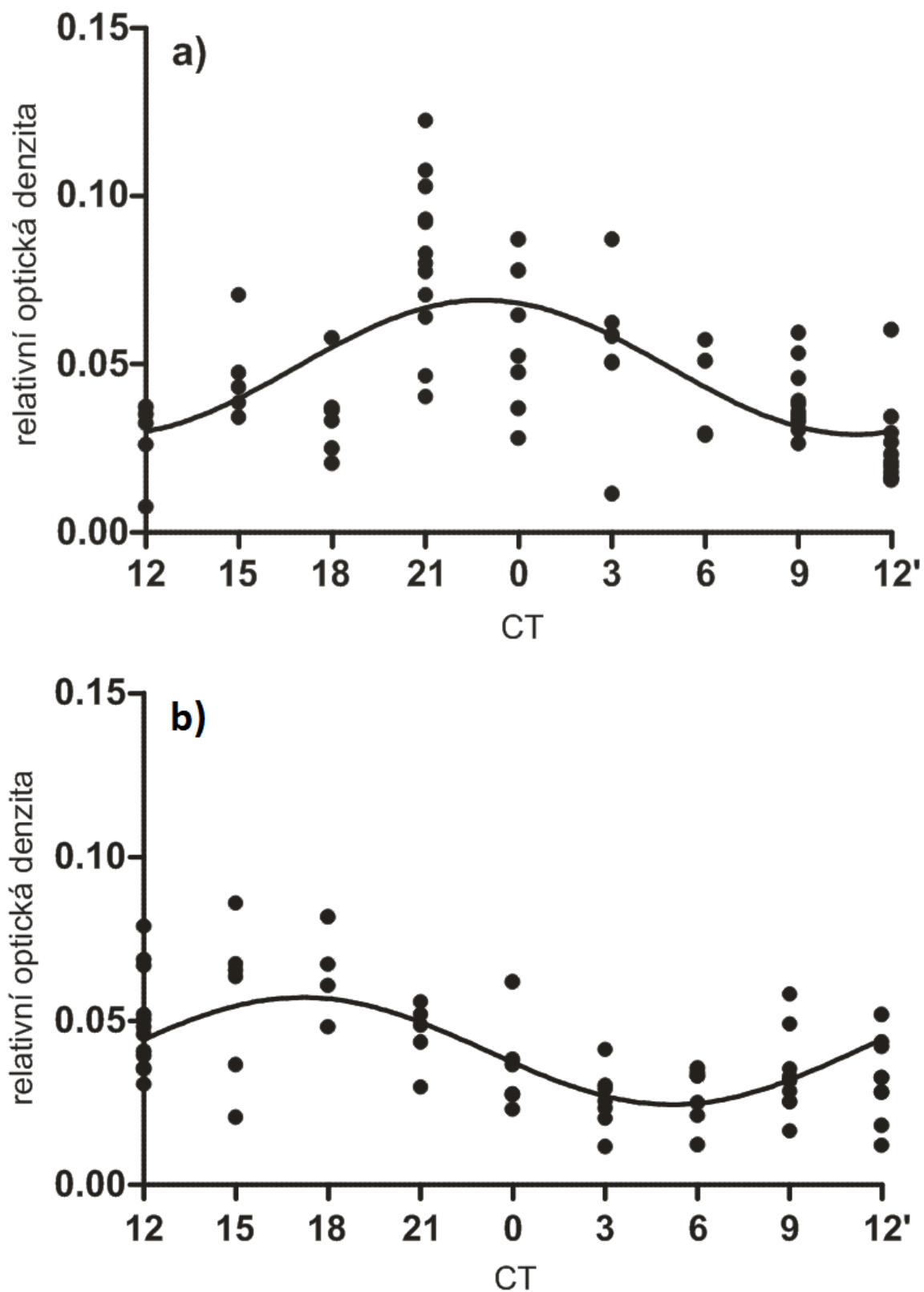
Pro porovnání fáze profilů kontrolních a pokusných zvířat byla pomocí kosinorové analýzy proložena jednotlivými hodnotami sinusoidální křivka (viz obr. 9) a vypočteny

akrofáze. V případě kontrolních mláďat byla akrofáze v  $CT20,7 \pm 1,0$  h ( $R^2 = 0,28$ ) a akrofáze u pokusných mláďat v  $CT23,7 \pm 0,6$  h ( $R^2 = 0,63$ ). Porovnáním obou akrofází t-testem byl prokázán statisticky významný rozdíl na hladině pravděpodobnosti  $p = 0,012$ .

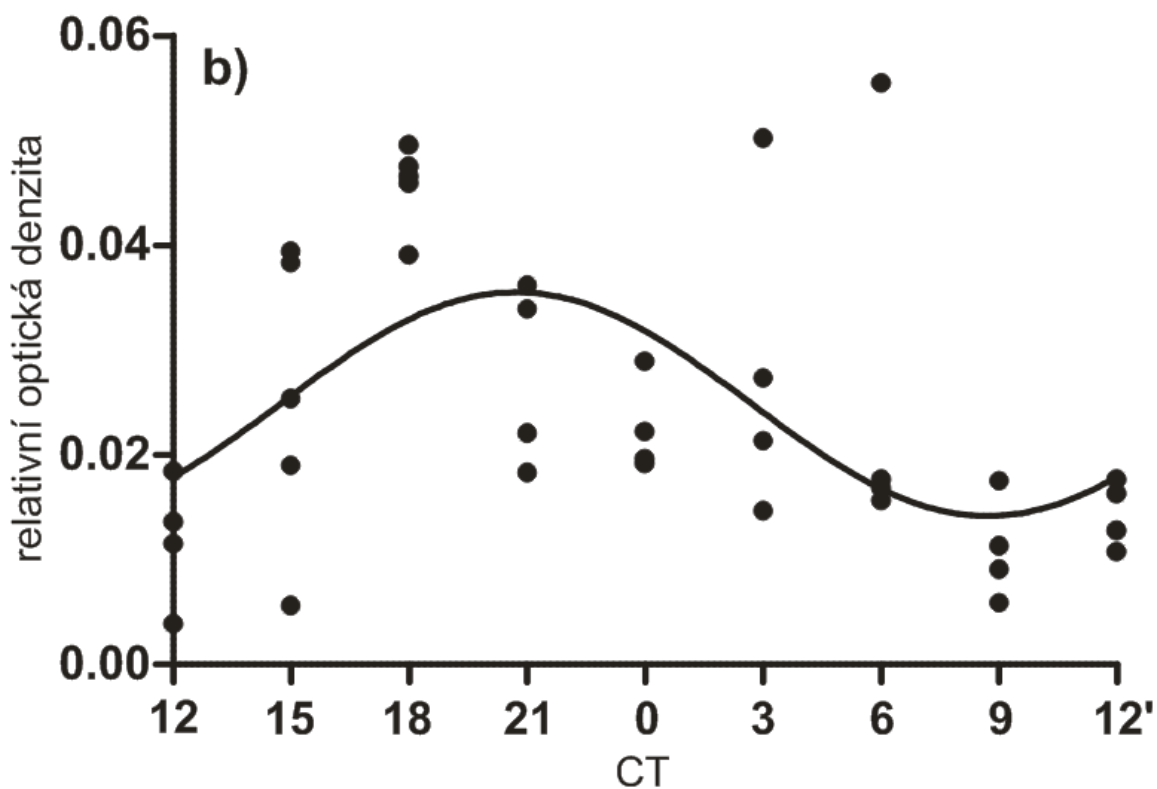
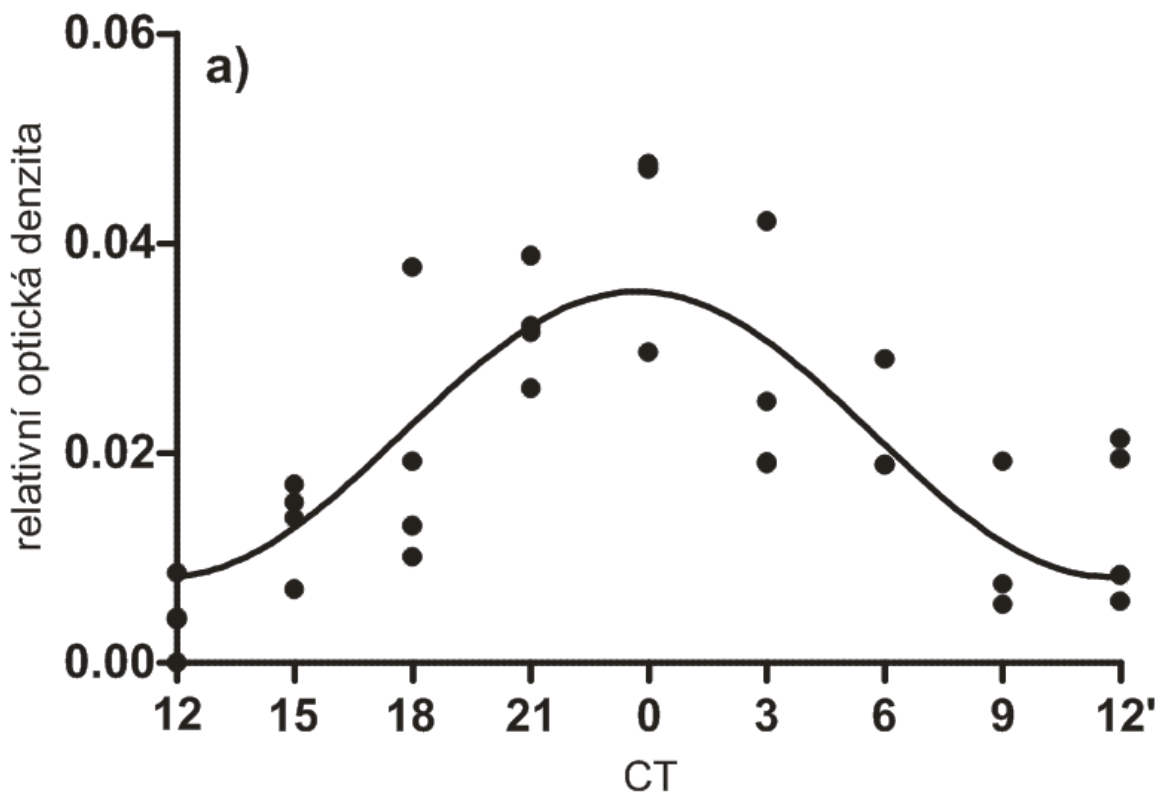
Z výsledků je patrné, že podávání melatoninu březím samicím v období před porodem mělo významný vliv i na expresi genu *Avp* v SCN jednodenních mláďat. Fáze rytmu v expresi *Avp* hnRNA pokusných zvířat byla přibližně o 3 hodiny fázově předběhnuta oproti fázi rytmu zvířat kontrolních.



**Obr. 7:** 24hodinové profily exprese **a)** c-Fos mRNA, **b)** Avp hnRNA v SCN novorozených mláďat. Matkám pokusných mláďat (bílá kolečka) byl před porodem opakovaně aplikován melatonin, matkám kontrolních mláďat (černá kolečka) bylo podáváno vehikulum (viz 4.2.1.). Na vodorovné ose je časový průběh v hodinách CT, na svislé ose je vynesena relativní optická denzita SCN vůči pozadí. Každý bod grafu představuje průměr z naměřených hodnot  $\pm$  S.E.M.



**Obr. 8:** Jednotlivé naměřené hodnoty exprese c-Fos mRNA s proloženou sinusoidální křivkou **a)** u pokusných mláďat, jejichž matkám byl podáván melatonin, a **b)** u kontrolních mláďat, jejichž matkám bylo podáváno vehikulum (viz 4.2.1.). Na vodorovné ose je vynesena čas v hodinách CT, na svislé ose je znázorněna relativní optická denzita.



**Obr. 9:** Jednotlivé naměřené hodnoty exprese *Avp hnRNA* s proloženou sinusoidální křivkou **a)** u pokusných mláďat, jejichž matkám byl podáván melatonin, a **b)** u kontrolních mláďat, jejichž matkám bylo podáváno vehikulum (viz 4.2.1.). Na vodorovné ose je vynesena čas v hodinách CT, na svislé ose je znázorněna relativní optická denzita.

## 5.2. Opakované podávání melatoninu pinealektomovaným březím samicím

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit vliv opakovaného podávání melatoninu březím samicím chovaným na stálém světle a zbavených šišinky na expresi genu *c-Fos* a *Avp* v SCN jejich novorozených mlád'at. Pinealektomované samice byly umístěny na stálém světle okamžitě po zabřeznutí a byly jim pravidelně každý den v době od E17 do porodu podávány injekce melatoninu nebo vehikula. Hladiny *c-Fos* mRNA a *Avp* hnRNA byly stanoveny v SCN jednodenních mlád'at narozených matkám, kterým byl podáván melatonin (pokusná skupina), a matkám, kterým bylo podáváno vehikulum (kontrolní skupina) pomocí metody hybridizace *in situ*. Na rozdíl od pokusu ad 1., byly v tomto experimentu hladiny exprese obou genů porovnávány pouze ve dvou časových intervalech, tj. uprostřed subjektivního dne v CT6 a uprostřed subjektivní noci v CT18.

Každá skupina kontrolních i pokusných dat u každého genu v CT6 i v CT18 reprezentuje 6-11 naměřených hodnot. Pouze pokusná skupina v CT6 u genu *c-Fos* reprezentuje 3 naměřené hodnoty.

### 5.2.1. Kontrola výsledku operace

Charakter operace vynětí šišinky si vyžaduje zpětnou kontrolu úspěšnosti tohoto zákroku (viz 4.2.2. a 4.5.2.). Kontrola byla uskutečněna dvěma způsoby: a) vizuální kontrolou přítomnosti či nepřítomnosti šišinky *post mortem* a b) proměřením hladiny melatoninu v krvi (resp. v séru) operovaných zvířat usmrčených v době kolem subjektivní půlnoci, kdy je endogenní hladina melatoninu maximální. Koncentrace melatoninu byla změřena metodou RIA a porovnána s koncentracemi melatoninu v séru intaktních kontrolních zvířat. Výsledky shrnuté na obr. 10 dokumentují nízké hladiny melatoninu (pod 50 pg/ml) u samic s úspěšně provedenou pinealektomií ve srovnání s hladinami kontrolních zvířat, která nebyla operována.

V jednom případě nebylo možné provést kontrolu hladiny melatoninu z důvodu předčasného úhynu samice a byla proto provedena pouze vizuální kontrola podle a).

### 5.2.2. Vliv opakovaného podávání melatoninu březím pinealektomovaným samicím na hladinu *c-Fos* mRNA v SCN jednodenních mlád'at v čase CT18 a CT6

Naměřené hodnoty exprese *c-Fos* mRNA pokusných a kontrolních zvířat, znázorněné na obr. 11a, byly porovnány t-testem ve dvou časových bodech: uprostřed subjektivní noci v CT18 a uprostřed subjektivního dne v CT6. V časovém bodě CT18 byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi pokusnými a kontrolními zvířaty ( $p = 0,017$ ), narozdíl od časového

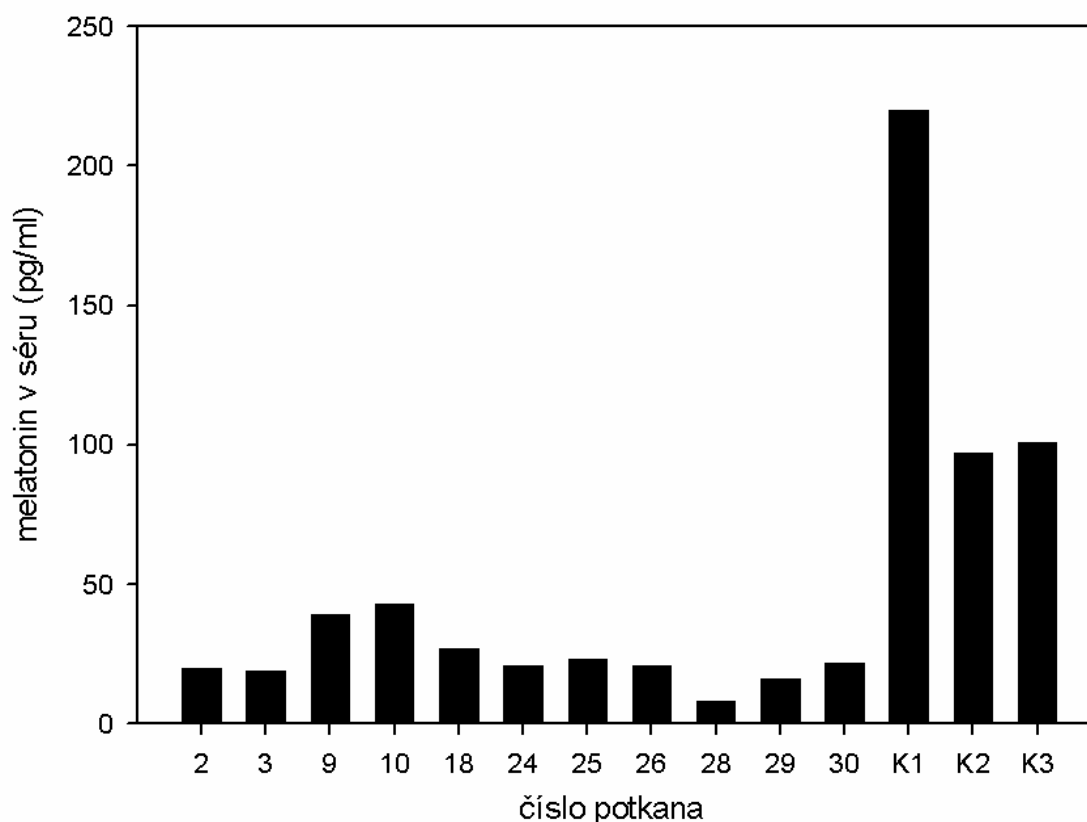
bodů CT6, kdy nebyl signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami prokázán ( $p = 0,602$ ).

Z výsledků plyne, že opakované podávání melatoninu březím pinealektomovaným samicím významně ovlivnilo hladinu *c-Fos* mRNA v SCN jejich novorozených mlád'at.

### **5.2.3. Vliv opakovaného podávání melatoninu březím pinealektomovaným samicím na hladinu *Avp* hnRNA v SCN jednodenních mlád'at v čase CT18 a CT6**

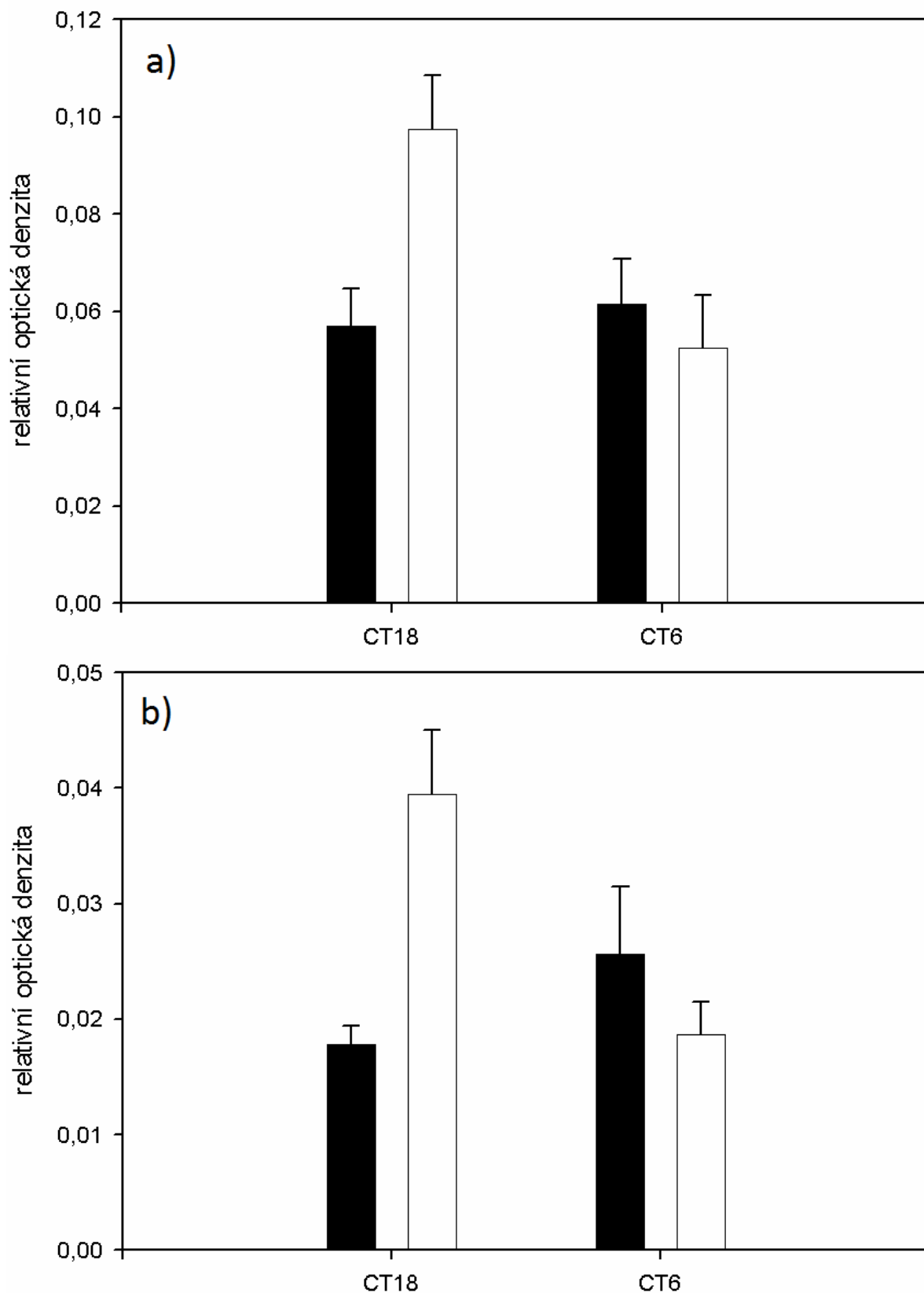
Hodnoty genové exprese *Avp* hnRNA kontrolních a pokusných mlád'at, znázorněné na obr. 11b, byly podrobeny statistickému porovnání t-testem ve dvou časových bodech: uprostřed subjektivní noci v CT18 a uprostřed subjektivního dne v CT6. V CT18 odhalil test statisticky významný rozdíl mezi pokusnou a kontrolní skupinou ( $p = 0,008$ ), narozdíl od časového bodu CT6, ve kterém nebyl prokázán žádný signifikantní rozdíl mezi pokusnými a kontrolními zvířaty ( $p = 0,320$ ).

Výsledky ukázaly významný vliv opakovaného podávání melatoninu březím pinealektomovaným samicím na hladinu *Avp* hnRNA v SCN jejich novorozených mlád'at.



**Obr. 10:** Diagram výsledků stanovení hladin melatoninu operovaných a kontrolních samic. Na svislé ose je vynesena koncentrace melatoninu v séru. Čísla u jednotlivých sloupců reprezentují označení úspěšně operovaných samic, jejichž hladina melatoninu byla nižší než 50 pg/ml. Kontrolní hodnoty melatoninu 3 intaktních zvířat jsou označeny K1, K2 a K3.





**Obr. 11:** Genová exprese v časech CT18 a CT6. **a)** c-Fos mRNA, **b)** Avp hnRNA. Černé sloupečky znázorňují hodnoty exprese kontrolních mláďat, jejichž matky dostávaly vehikulum. Bílé sloupečky znázorňují expresi mláďat pokusných, jejichž matky dostávaly melatonin. Na svislé ose je exprese genu v SCN vyjádřena relativní optickou denzitou. Každý sloupeček představuje průměr naměřených dat  $\pm$  S.E.M.

### 5.3. Akutní podání melatoninu březím samicím

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit okamžitý vliv podání jedné dávky melatoninu březím samicím na expresi genů *c-Fos*, *Avp* a *Per1* v SCN jejich vyvíjejících se plodů. Samice byly ode dne zabřeznutí chovány na stálém světle. Injekce melatoninu pokusným samicím a vehikula kontrolním samicím byly aplikovány v E20 ve čtyřech různých časových bodech: CT0, CT6, CT12 a CT18. Dvacetidenní plody byly odebírány v různém intervalu od podání injekce, tj. za 30, 60, 90 minut. V CT12 byly plody odebrány navíc ještě i po 120 minutách. V každém časovém bodě byl odebrán jeden vrh, pouze v intervalu 60 minut po injekci byly u pokusných samic odebrány dva vrhy. Každý vrh zahrnoval 6-9 plodů (v jednom případě pouze 5 plodů). Expres *c-Fos* mRNA, *Avp* hnRNA a *Per1* mRNA v SCN dvacetidenních plodů byla stanovena metodou hybridizace *in situ*. Data pro geny *c-Fos*, *Avp* a *Per1* byla získána po řadě z 231, 222 a 220 reprezentativních řezů plodových SCN.

#### 5.3.1. Okamžitý vliv podání melatoninu březím samicím na hladinu *c-Fos* mRNA v SCN dvacetidenních plodů

Naměřené hodnoty exprese *c-Fos* mRNA u kontrolní a pokusné skupiny, znázorněné na obr. 12, byly statisticky vyhodnoceny pomocí dvojné analýzy variance.

V CT0 dvojná analýza variance odhalila signifikantní vliv času ( $F = 10,113$ ,  $p < 0,001$ ). Dále byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi skupinami ( $F = 13,472$ ,  $p < 0,001$ ) a také významný vliv interakcí mezi vlivem času a skupin ( $F = 3,206$ ,  $p = 0,049$ ). V případě kontrolní skupiny nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi hodnotami v jednotlivých časových intervalech, zatímco u pokusných zvířat byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi hodnotami naměřenými po 30 minutách a 90 minutách od podání injekce ( $p < 0,001$ ). Student-Newman-Keulsův test prokázal statisticky významný rozdíl mezi hladinou *c-Fos* mRNA u pokusných a kontrolních fétů v intervalu 90 minut od podání injekce ( $p = 0,05$ ). Ze statistického porovnání je tedy patrné, že v CT0 je hladina *c-Fos* mRNA významně snížena 90 min po podání melatoninu.

V CT6 byl pro naměřené hodnoty prokázán statisticky významný vliv času ( $F = 10,881$ ,  $p < 0,001$ ) i rozdíl mezi pokusnou a kontrolní skupinou ( $F = 35,511$ ,  $p < 0,001$ ). Nebyl však prokázán signifikantní vliv interakcí mezi vlivem času a skupiny ( $F = 1,270$ ,  $p = 0,290$ ). Z výsledku dvojné analýzy variance je zřejmé, že se naměřené hodnoty v CT6 pro skupinu pokusných a kontrolních zvířat liší, nelze je však vzájemně v jednotlivých časových intervalech porovnat.

V CT12 byl prokázán statisticky vysoce významný vliv času ( $F = 22,489$ ,  $p < 0,001$ ), stejně jako vysoce významný rozdíl mezi naměřenými hodnotami pokusné a kontrolní skupiny ( $F = 59,419$ ,  $p < 0,001$ ). Interakce mezi vlivem času a skupin byly také prokázány jako vysoce signifikantní ( $F = 11,559$ ,  $p < 0,001$ ). U kontrolních zvířat hladiny mRNA významně klesaly od nejvyšších hodnot v intervalu 30 minut od podání injekce k nízkým hodnotám v intervalu 90 minut ( $p < 0,001$ ) a opět stoupaly k hodnotám v intervalu 120 minut ( $p < 0,001$ ). U pokusných zvířat hladiny mRNA signifikantně poklesly mezi intervaly 30 a 60 minut od podání injekce ( $p < 0,001$ ). Následný Student-Newman-Keulsův test odhalil na 5% hladině pravděpodobnosti statisticky významné rozdíly mezi naměřenými hodnotami v intervalu 30, 60 a 120 minut od podání injekce. Výsledky tedy prokázaly, že v těchto intervalech po podání melatoninu signifikantně snižoval hladinu *c-Fos* mRNA

V CT18 analýza odhalila významný vliv času na naměřené hodnoty ( $F = 9,753$ ,  $p < 0,001$ ), avšak rozdíl mezi oběma skupinami ( $F = 1,123$ ,  $p = 0,294$ ), stejně jako interakce mezi vlivem času a skupin ( $F = 1,503$ ,  $p = 0,232$ ), nebyly statisticky významné. Výsledky tedy prokázaly, že hodnoty naměřené v CT18 se u kontrolních a pokusných zvířat významně neliší.

Z výsledků je dobře patrné, že podání jedné dávky melatoninu březím samicím mělo okamžitý vliv na hladinu *c-Fos* mRNA v SCN jejich dvacetidenních plodů, který se lišil v závislosti na době podání.

### **5.3.2. Okamžitý vliv podání melatoninu březím samicím na hladinu *Avp* hnRNA v SCN dvacetidenních plodů**

Naměřené hodnoty exprese *Avp* hnRNA u kontrolní a pokusné skupiny, znázorněné na obr. 13, byly statisticky vyhodnoceny pomocí dvojné analýzy variance.

V CT0 nebyl prokázán statisticky významný vliv času ( $F = 2,222$ ,  $p = 0,119$ ), avšak byl prokázán signifikantní rozdíl mezi skupinou kontrolních a pokusných zvířat ( $F = 17,385$ ,  $p < 0,001$ ). Také interakce mezi vlivem času a skupin dosáhly statistické významnosti ( $F = 9,233$ ,  $p < 0,001$ ). Student-Newman-Keulsův test následně na 5% hladině pravděpodobnosti prokázal statisticky významné rozdíly mezi oběma skupinami v intervalech 60 a 90 minut od podání injekce. Výsledky tedy ukázaly, že podání melatoninu v CT0 významně snižovalo hladinu exprese *Avp*.

V CT6 test odhalil významný vliv času ( $F = 4,036$ ,  $p = 0,024$ ) a signifikantní rozdíl mezi naměřenými hodnotami u pokusných a kontrolních zvířat ( $F = 7,497$ ,  $p = 0,009$ ), interakce mezi vlivem času a skupin však nebyly statisticky významné ( $F = 0,847$ ,  $p = 0,436$ ). Statistické zhodnocení výsledků tedy prokázalo, že naměřené hodnoty v čase CT6 se liší mezi skupinou

pokusných a kontrolních zvířat, avšak nelze je vzájemně v jednotlivých časových intervalech porovnat.

V CT12 byl pro naměřené hodnoty prokázán statisticky významný vliv času ( $F = 8,006$ ,  $p < 0,001$ ) i statisticky významný rozdíl mezi pokusnou a kontrolní skupinou ( $F = 4,905$ ,  $p = 0,031$ ). Interakce mezi vlivem času a skupin byly také prokázány jako signifikantní ( $F = 4,403$ ,  $p = 0,007$ ). Hodnoty exprese u kontrolních fétů významně klesaly od vysokých hodnot v intervalu 30 minut od podání injekce k nízkým hodnotám v intervalu 120 minut ( $p < 0,001$ ), zatímco u pokusných fétů se hodnoty v čase neměnily. Následný Student-Newman-Keulsův test vyhodnotil na 5% hladině pravděpodobnosti jako statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami v intervalu 30 minut od podání injekce. Výsledky lze tedy shrnout tak, že v CT12 byla hladina *Avp* hnRNA za 30 minut po podání melatoninu významně snížena oproti kontrolní skupině.

V CT18 analýza naměřených hodnot odhalila, že vliv času ( $F = 0,137$ ,  $p = 0,872$ ) a ani rozdíl mezi kontrolní a pokusnou skupinou ( $F = 3,244$ ,  $p = 0,078$ ) nebyl statisticky významný. Z výsledků je tedy zřejmé, že v CT18 se naměřené hodnoty obou skupin významně neliší.

Výsledky tedy ukázaly, že podání jedné dávky melatoninu březím samicím mělo okamžitý vliv na hladinu *Avp* hnRNA v SCN jejich plodů v závislosti na době podání.

### **5.3.3. Okamžitý vliv podání melatoninu březím samicím na hladinu *Per1* mRNA v SCN dvacetidenních plodů**

Hodnoty exprese *Per1* mRNA u kontrolní a pokusné skupiny, zobrazené v grafu na obr. 14, byly porovnány pomocí dvojné analýzy variance.

V CT0 nebyl prokázán signifikantní vliv času ( $F = 2,224$ ,  $p = 0,119$ ). Podobně nebyl prokázán ani významný rozdíl mezi skupinou kontrolních a pokusných zvířat ( $F = 0,146$ ,  $p = 0,704$ ). Z výsledků je tedy patrné, že se naměřené hodnoty v čase CT0 neliší mezi skupinou pokusných a kontrolních zvířat.

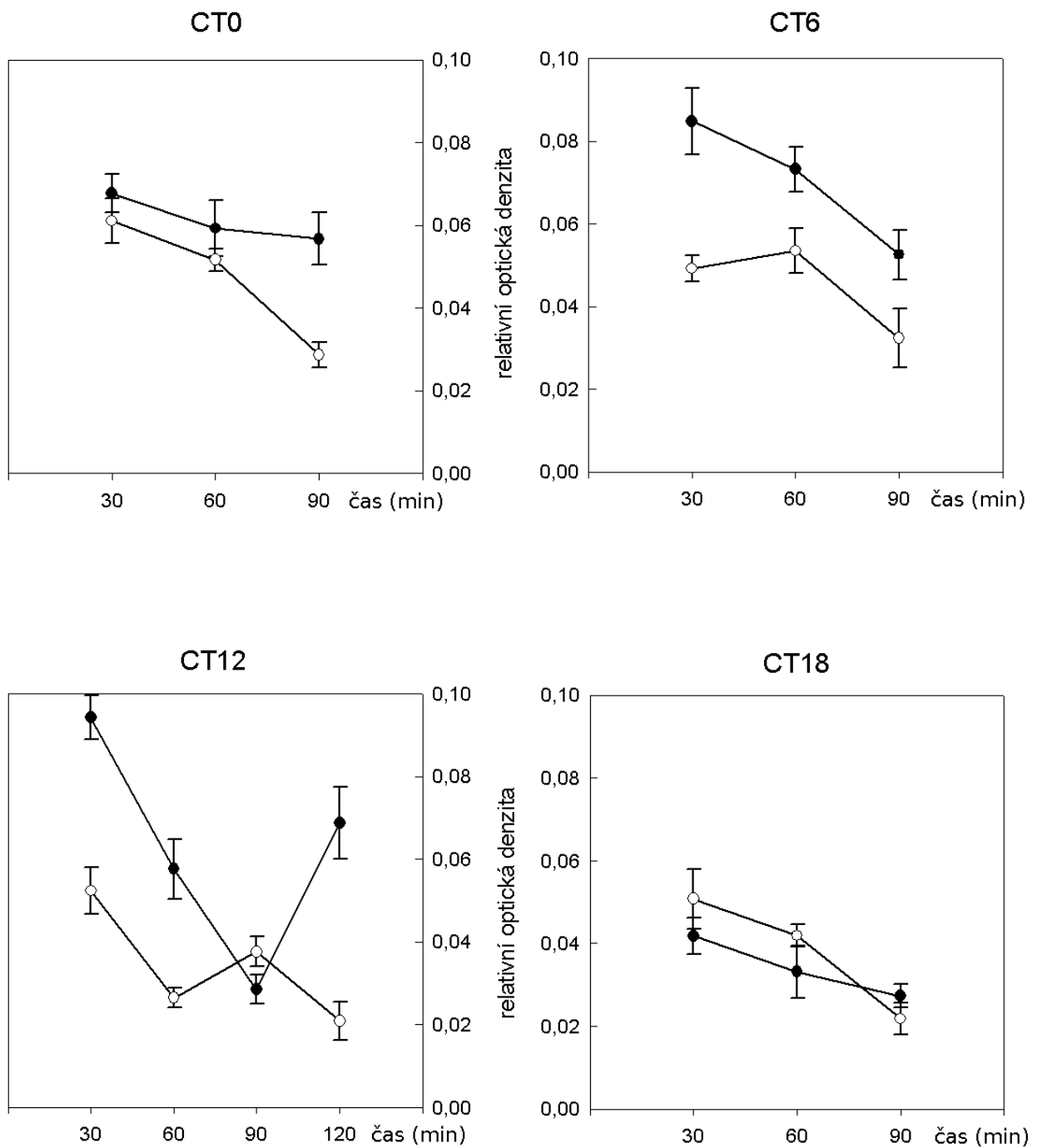
V CT6 statistická analýza prokázala významný vliv času ( $F = 8,030$ ,  $p = 0,001$ ). Nebyl však prokázán signifikantní rozdíl mezi skupinami ( $F = 3,061$ ,  $p = 0,087$ ) ani interakce času a skupin ( $F = 2,355$ ,  $p = 0,106$ ). Výsledky tedy ukázaly, že se hodnoty u obou skupin naměřené v čase CT6 mezi sebou významně neliší.

V čase CT12 byl prokázán statisticky velmi významný vliv času na naměřené hodnoty ( $F = 11,842$ ,  $p < 0,001$ ). Také rozdíl mezi oběma skupinami vyhodnotila analýza jako vysoce významný ( $F = 31,564$ ,  $p < 0,001$ ) a podobně vyšly také interakce vlivu času a skupin jako signifikantní ( $F = 7,380$ ,  $p < 0,001$ ). Ve skupině kontrolních zvířat naměřené hodnoty

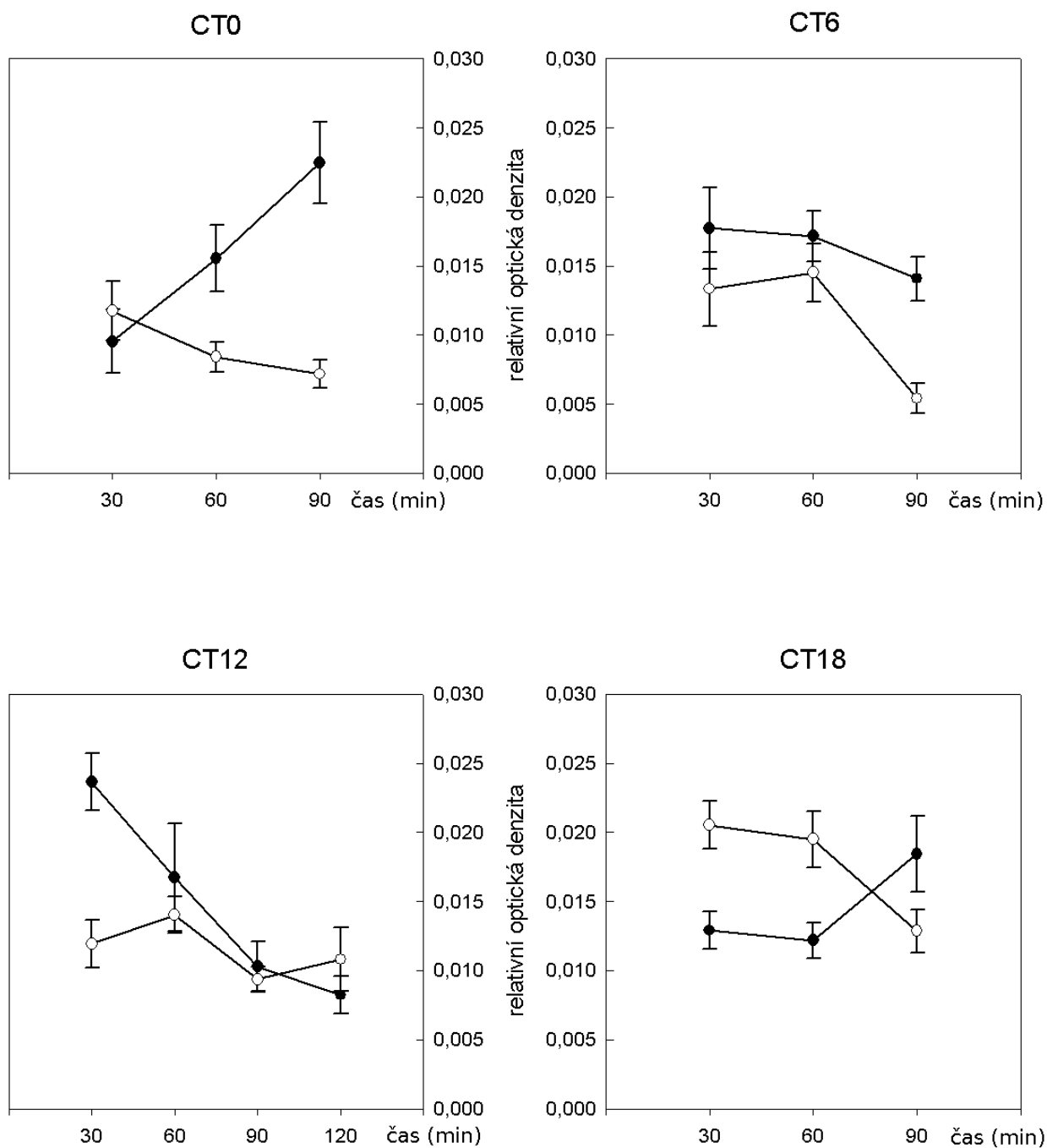
významně klesaly od vysokých hodnot v intervalu 30 minut k nízkým hodnotám v intervalu 90 minut od podání injekce ( $p < 0,001$ ), zatímco u pokusných zvířat se hodnoty v čase neměnily. Data byla dále podrobena Student-Newman-Keulsově testu, který prokázal, že se hodnoty skupin kontrolních a pokusných zvířat na 5% hladině pravděpodobnosti významně liší v intervalech 30, 60 a 120 minut od podání injekce. Statistická analýza výsledků tedy ukázala, že po podání melatoninu v CT12 byly hodnoty *Per1* mRNA významně sníženy oproti kontrolní skupině.

V CT18 byl zjištěn statisticky významný vliv času ( $F = 7,126$ ,  $p = 0,002$ ), avšak nebyl prokázán rozdíl mezi oběma skupinami ( $F = 0,000218$ ,  $p = 0,988$ ). Také interakce mezi vlivem času a skupinami nebyl vyhodnocen jako signifikantní ( $F = 0,779$ ,  $p = 0,465$ ). Z výsledků je tedy zřejmé, že v čase CT18 se naměřené hodnoty u skupiny pokusných a kontrolních zvířat významně neliší.

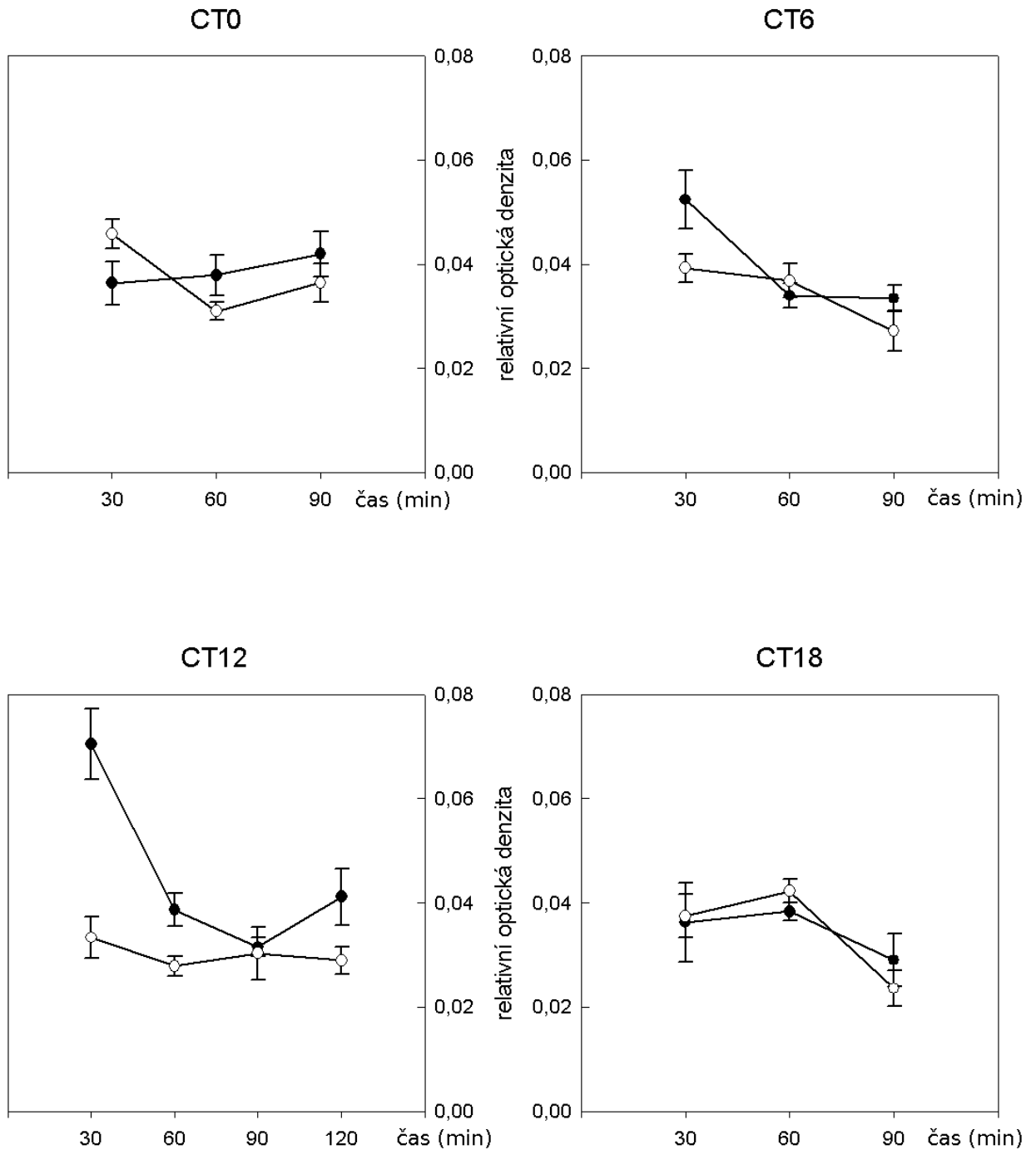
Výsledky ukázaly, že podání jedné dávky melatoninu březím samicím mělo okamžitý vliv na expresi *Per1* mRNA ve fetálních SCN v závislosti na denní době.



**Obr. 12:** Hladiny c-Fos mRNA v SCN dvacetidenních plodů po akutní aplikaci melatoninu v CT0, CT6, CT12 a CT18. Na vodorovné ose je vždy vyznačen časový interval v minutách od podání injekce do odebrání plodů. Na svislé ose je vždy vynesena genová exprese v SCN vyjádřená relativní optickou denzitou. Bílými kolečky jsou vyznačeny hodnoty c-Fos mRNA u pokusných plodů, jejichž matce byl aplikován melatonin. Černými kolečky jsou vyznačeny hodnoty u kontrolních plodů, jejichž matce bylo v injekci podáno vehikulum.



**Obr. 13:** Hladiny Avp hnRNA v SCN dvacetidenních plodů po akutní aplikaci melatoninu v CT0, CT6, CT12 a CT18. Na vodorovné ose je vždy vyznačen časový interval v minutách od podání injekce do odebrání plodů. Na svislé ose je vždy vynesena genová exprese v SCN vyjádřená relativní optickou denzitou. Bílými kolečky jsou vyznačeny hodnoty Avp hnRNA u pokusných plodů, jejichž matce byl aplikován melatonin. Černými kolečky jsou vyznačeny hodnoty u kontrolních plodů, jejichž matce bylo v injekci podáno vehikulum.



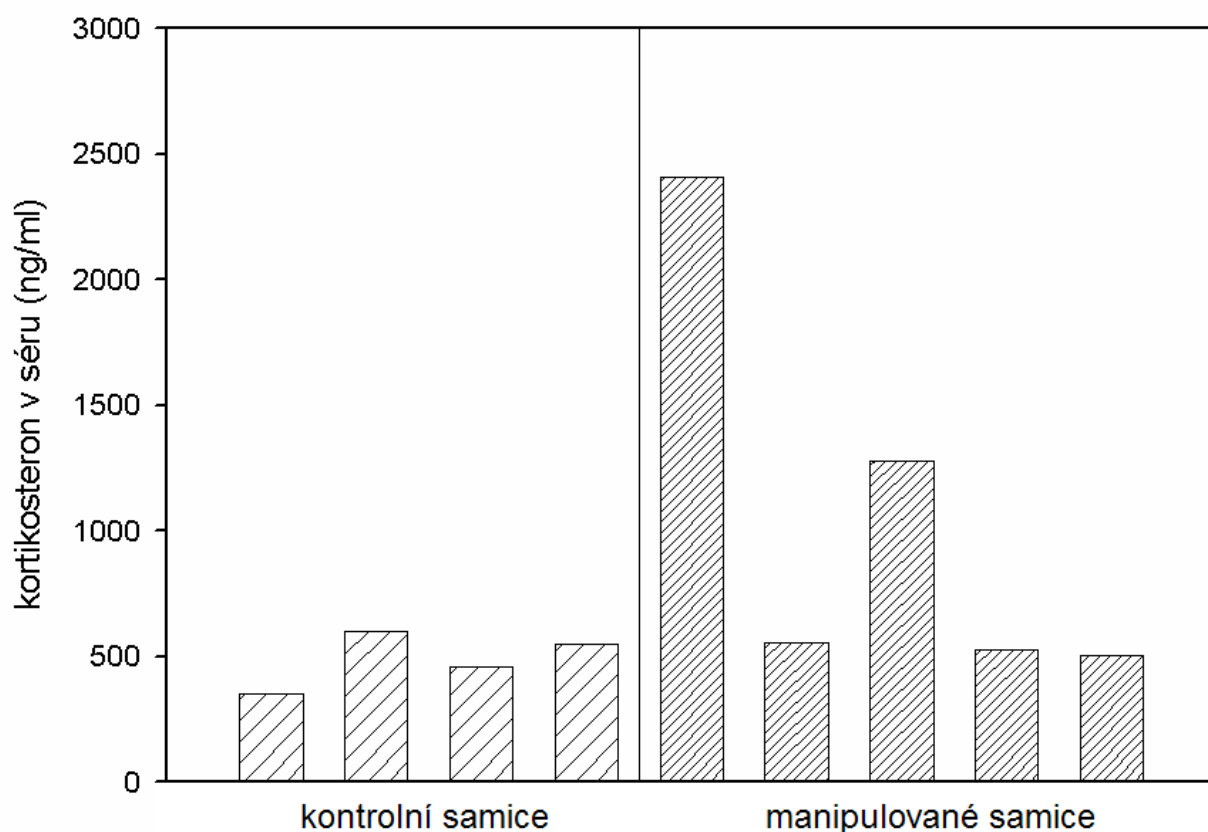
**Obr. 14:** Hladiny Per1 mRNA v SCN dvacetidenních plodů po akutní aplikaci melatoninu v CT0, CT6, CT12 a CT18. Na vodorovné ose je vždy vyznačen časový interval v minutách od podání injekce do odebrání plodů. Na svislé ose je vždy vynesena genová exprese v SCN vyjádřená relativní optickou denzitou. Bílými kolečky jsou vyznačeny hodnoty Per1 mRNA u pokusných plodů, jejichž matce byl aplikován melatonin. Černými kolečky jsou vyznačeny hodnoty u kontrolních plodů, jejichž matce bylo v injekci podáno vehikulum.



## 5.4. Vliv injekční aplikace na hladinu kortikosteronu v krvi březích samic

Cílem tohoto pokusu bylo objasnit reakci březích samic potkana na manipulaci spojenou s injekční aplikací. Hladina stresového hormonu kortikosteronu v krvi (resp. v séru) březích samic byla stanovena pomocí metody RIA. Pokusným samicím bylo 30 minut před usmrcením a odběrem krve injekčně aplikováno vehikulum. Kontrolní samice nebyly vystaveny žádné manipulaci. Výsledky stanovení jsou shrnuty na obr. 15.

Z výsledků je patrné, že reakce březích samic potkana na manipulaci spojenou s injekční aplikací byla do značné míry individuální. Zatímco u některých samic nebyla pozorována žádná změna hladiny kortikosteronu v porovnání s kontrolními samicemi, u jiných samic byla hladina kortikosteronu v důsledku manipulace několikanásobně zvýšena. Výsledky dokládají, že u některých samic může být injekční aplikace spojena se značným stresem.



**Obr. 15:** Diagram výsledků stanovení hladin kortikosteronu v séru kontrolních a pokusných samic. V grafu jsou vyneseny sloupce odpovídající hodnotám kortikosteronu v séru čtyř kontrolních samic a pěti pokusných samic, kterým bylo injekčně podáno vehikulum. Na vší ose jsou vyneseny hodnoty koncentrace kortikosteronu v ng/ml.

## 6. DISKUZE

### 6.1. Opakované podávání melatoninu intaktním březím samicím

Výsledky prokázaly, že na stálém světle může opakovaná aplikace melatoninu březím samicím po dobu 5 dnů před porodem významně ovlivnit fázi rytmu v expresi genů *c-Fos* i *Avp* v SCN novorozených mlád'at. Vlivem aplikace melatoninu byla fáze rytmu v expresi *c-Fos* opožděna přibližně o 6 hodin a fáze rytmu v expresi *Avp* přibližně o 3 hodiny oproti fázím daných rytmů u kontrol.

Geny *c-Fos* a *Avp* byly vybrány jako ukazatele fáze biologických hodin novorozených mlád'at, neboť exprese hodinových genů během prvního dne po porodu nevykazuje dostatečně zřetelných rytmů v transkripci (Kováčiková *et al.*, 2006). Exprese genu *c-Fos*, jakožto časného raného genu, je široce používána jako ukazatel neuronální aktivity buněk, který je v SCN navíc citlivý k vlivům vnějšího prostředí (Sumová a Illnerová, 1998). V případě genu *Avp* byla před mRNA upřednostněna próba pro heteronukleární (hn) RNA, která poskytuje přesnější ukazatel transkripce *Avp* genu a rytmus v hladině mRNA je oproti rytmu v hladině hnRNA o 4 hodiny opožděn (Yambe *et al.*, 2002). Na rozdíl od *c-Fos* je *Avp* v SCN hodinami kontrolovaný gen, jehož exprese je u dospělých zvířat regulována přímo heterodimerem CLOCK a BMAL1 přes E-box sekvence na jeho promotoru (Jin *et al.*, 1999). Kromě toho je jeho exprese regulována také přes CRE element a tedy dráhou využívající P-CREB (Iwasaki *et al.*, 1997). Použití obou ukazatelů, tj. exprese genů *c-Fos* a *Avp*, tak umožnilo komplexnější zkoumání vlivu melatoninu na fázi hodin v SCN plodů a novorozených mlád'at. V dřívějších pracích, které se zabývaly studiem prenatální synchronizace melatoninem, byly používány ukazatele fáze cirkadiálních hodin, které jsou měřitelné až mnohem později během postnatálního vývoje a u kterých proto nelze vyloučit další vlivy vnějšího prostředí na mlád'ata (viz dále). V tomto ohledu je tedy naše studie unikátní.

Vyvíjející se plod je v děloze matky vystaven celé řadě rytmických podnětů a signálů, které jsou řízeny z mateřských SCN. Na stálém světle dochází u dospělých jedinců k postupné desynchronizaci jednotlivých buněk SCN, které pak není schopno vytvářet rytmický výstupní signál (Ohta *et al.*, 2005). Ve shodě s těmito poznatky se na stálém světle perioda rytmů v pohybové aktivitě samic nejprve prodlužovala, až nakonec zcela vymizela (Nováková *et al.*, 2010). V naší studii jsme březí samice chované na stálém světle vystavili během posledních 5 dnů březosti pravidelným injekčním aplikacím melatoninu či vehikula. U 53 % samic tyto

pravidelné aplikace ovlivňovaly pohybovou aktivitu, která byla okamžitě po aplikaci zvýšena. Je pravděpodobné, že pravidelná injekční aplikace každý den ve stejnou dobu synchronizovala rytmus v pohybové aktivitě u části březích samic, které mohly být k této manipulaci citlivější. Tuto hypotézu jsme podpořili nálezem, že u části březích samic samotná manipulace spojená s injekční aplikací vyvolala akutní zvýšení hladin kortikosteronu. Ačkoliv na rozdíl od křečka zlatého (Hastings *et al.*, 1992) nebyla u laboratorního potkana synchronizace cirkadiánních rytmů injekční aplikací prokázána a všeobecně se předpokládá, že cirkadiánní systém potkana je k této manipulaci necitlivý, naše výsledky ukázaly, že v případě březích samic je nutno s tímto účinkem počítat i u laboratorního potkana.

Kromě toho, že je významně narušena behaviorální rytmiticita březí samice, je vlivem expozice stálému světlu také významně potlačena hladina mateřského hormonu melatoninu (Illnerová *et al.*, 1978). Vystavením březích samic stálému světlu jsme tak mohli sledovat vývoj rytmů u plodů, které nedostávaly od mateřského SCN rytmický signál v podobě behaviorální aktivity a navíc byl rytmus mateřského melatoninu významně potlačen. V předchozích experimentech prováděných v naší laboratoři bylo prokázáno, že u intaktních březích samic chovaných stejnou dobu na stálém světle vedou tyto podmínky ke vzájemné desynchronizaci mezi plody v daném vrhu a v důsledku toho pak výsledný profil v expresi genů *c-Fos* a *Avp* nevykazoval signifikantní cirkadiánní rytmus (Nováková *et al.*, 2010). Na rozdíl od těchto výsledků jsme však v naší studii u kontrolních samic, kterým bylo aplikováno vehikulum, prokázali významný rytmus v expresi obou genů v SCN jejich novorozených mlád'at. Je tedy možné, že opakovaná aplikace vehikula matce po dobu 5 dnů před porodem mohla působit jako významný faktor, který její plody na stálém světle synchronizoval. Tato synchronizace mohla být zprostředkována výše zmíněným ovlivněním mateřské pohybové aktivity. Dalším možným mechanismem je synchronizace kortikosteronem, který byl dříve prokázán jako účinný synchronizátor cirkadiánních oscilátorů v periférii (Le Minh *et al.*, 2001).

Doklady o vzájemné souvislosti mezi stresem matky v prenatálním období a pozměněnými cirkadiánními rytmy mlád'at nacházíme i v literatuře (Koehl *et al.*, 1999). Účinek injekcí vehikula a melatoninu na chování potkanů držných na stálém světle však byl studován v pracích, ve kterých byly injekce podávány mnohem delší dobu (tj. 33 a 39 dní oproti 5-6 dnům v našem pokuse). V souladu s našimi výsledky se autoři setkávali s individuálními reakcemi zvířat (Chesworth *et al.*, 1987; Thomas a Armstrong, 1988). Tyto účinky však nebyly studovány u samic potkana, které by byly březí a navíc krátce před porodem., kdy se dá očekávat vyšší senzitivita k manipulaci se zvířetem. Vzhledem k tomu,

že zastoupení březích samic, jejichž pohybová aktivita byla injekční aplikací ovlivněna, byly v pokusné i kontrolní skupině v vyrovnané, mohli jsme obě skupiny považovat za ekvivalentní.

Účinek melatoninu v prenatálním období na rytmus mlád'at byl potvrzen i v dřívější práci Davise a Manniona (Davis a Mannion, 1988). Autoři použili březí samice křečka zlatého a provedli jim lézi SCN, aby zcela vyřadili vliv centrálního mateřského oscilátoru. Čtyři dny před porodem podávali těmto samicím denně dvě injekce s 12hodinovým odstupem, ze kterých vždy jen jedna obsahovala melatonin. Po odstupu byly behaviorální rytmy mlád'at synchronizovány s podáním té injekce, která obsahovala melatonin. Velký časový odstup mezi podáním melatoninu a měřením rytmů mlád'at však mohl zahrnovat celou řadu faktorů, které mohly cirkadiální rytmy mlád'at během postnatálního vývoje ovlivnit. Rozvoj metod molekulární biologie a objev molekulárního mechanismu biologických hodin nám dnes poskytuje možnosti, jak určit fázi hodin novorozeného mláděte hned po porodu a získat tak přesnější údaje o účinku melatoninu.

## **6.2. Opakované podání melatoninu pinealektomovaným březím samicím**

Podávání melatoninu březím pinealektomovaným samicím po dobu pěti dnů před porodem mělo významný vliv na expresi genů *c-Fos* a *Avp* v SCN jejich novorozených mlád'at. Ze srovnání exprese genů *c-Fos* a *Avp* v SCN mlád'at pinealektomovaných a kontrolních samic v CT18, tj. v polovině tmavé fáze původního světelného režimu samic, a v CT6, tj. v polovině světlé fáze původního světelného režimu, vyplývá, že exprese obou genů byla signifikantně zvýšena v CT18 a neovlivněna v CT6. Z výsledků lze tedy usuzovat, že profily rytmů v expresi obou genů budou patrně aplikací melatoninu pozměněny. V současné studii jsme nemohli porovnat celé 24hodinové profily exprese obou genů tak, jak jsme to provedli v případě intaktních samic (viz výše). Důvodem byl fakt, že jednodenní mlád'ata byla odebírána v různých časových bodech během 24 hodin pouze na základě odhadu úspěšnosti operace jejich matek, při níž jsme jim odstranili šišinku. Odběr šišinky je poměrně náročný operační zákrok, při kterém dochází k narušení velkého žilního splavu a následnému krvácení, které znesnadňuje odběr epifýzy umístěné přímo pod ním. Při následné kontrole úspěšnosti této operace *post mortem* jsme zjistili, že v některých případech nebyla operace úspěšná a proto jsme museli mlád'ata těchto samic nakonec ze studie vyloučit. I když budou nutné další studie pro zjištění vlivu aplikace melatoninu pinealektomovaným matkám na fázi rytmů

v genové expresi jejich mlád'at, můžeme již na základě tohoto předběžného experimentu usuzovat, že melatonin může fázi těchto rytmů významně ovlivňovat.

Výsledky našeho experimentu jsou ve shodě s dříve publikovanými pracemi. Syntéza melatoninu je v šišince řízena z SCN multisynaptickým spojením, zprostředkovaným sympatickou inervací z *ganglion cervicale superior* (Møller a Baeres, 2002). Po přerušení těchto sympatických nervových vláken do šišinky rytmus v syntéze melatoninu vymizí (Klein *et al.*, 1971). Při studiu role melatoninu v mateřské signalizaci fetálních SCN byla proto pro zamezení vlivu mateřského melatoninu využívána vedle pinealektomie také ganglionektomie (Weaver a Reppert, 1986; Bellavía *et al.*, 2006). U křečička džungarského zamezila pinealektomie matek přenosu fotoperiodického signálu na jejich féty (Weaver a Reppert, 1986). Podobně mateřská pinealektomie ovlivnila cirkadiánní rytmus dýchání plodů u ovcí (McMillen a Nowak, 1990). U laboratorního potkana ganglionektomie matek ovlivnila vývoj rytmu malátdehydrogenázy ve varlatech 25denních samčích mlád'at (Vermouth *et al.*, 1995). Kromě toho jak pinealektomie, tak i ganglionektomie matek desynchronizovala rytmus v pití mlád'at po odstavu v rámci vrhu a prenatalní podávání exogenního melatoninu tento rytmus synchronizovalo (Bellavía *et al.*, 2006). V jiné práci však mateřská pinealektomie nedokázala vyrušit rytmus v aktivitě enzymu arylalkylamin N-acetyltransferázy u desetidenních mlád'at (Reppert a Schwartz, 1986a). To je ve shodě s představou, že rytmických signálů, které matka vysílá ke svým fétům je více. Jedná se o signály jak neuronální, tak humorální povahy, a zdá se že v případě výpadku jednoho z nich jsou schopné se částečně navzájem nahradit. Jedním z dalších signálů je například dopamin, který má také synchronizující účinek na fetální hodiny (Viswanathan a Davis, 1997).

### 6.3. Akutní podání melatoninu březím samicím

Při sledování vlivu melatoninu jednorázově podaného březím samicím na SCN jejich dvacetidenních fétů jsme zjistili, že melatonin akutně potlačuje expresi genů *c-Fos*, *Avp* a *Per1* v závislosti na době jeho podání. Expresie všech tří sledovaných genů byla potlačena po aplikaci v CT12, tj. v době odpovídající době zhasnutí na původním světelném režimu a exprese genů *c-Fos* a *Avp* byla potlačena také po aplikaci melatoninu v CT0, tj. v době odpovídající začátku subjektivního dne. Prokázali jsme tak, že citlivost fetálního SCN na melatonin se během cirkadiánního cyklu mění.

Melatonin působí v SCN dospělých jedinců i vyvíjejících se plodů skrze receptory typu MT1 (Reppert *et al.*, 1994; Poirel *et al.*, 2002; Weaver *et al.*, 1988). Je to vysokoafinní

receptor spřažený s G-proteiny, jehož aktivace vyúsťuje na buněčné úrovni v potlačení hladiny cAMP, fosforylace transkripčního faktoru CREB (Kopp *et al.*, 1997) a aktivaci proteinkinázy C (McArthur *et al.*, 1997). Prostřednictvím transkripčního faktoru CREB je řízena celá řada genů obsahujících CRE element ve svém promotoru. Mezi tyto geny patří i *c-Fos* (Sheng *et al.*, 1990), *Avp* (Iwasaki *et al.*, 1997) a *Per1* (Trávníčková-Bendová *et al.*, 2002). Je tedy možné, že potlačení transkripce těchto genů v SCN fetů vlivem aplikace melatoninu matkám mohlo být zprostředkováno právě tímto mechanismem.

Otázkou zůstává zda je akutní potlačení transkripce těchto genů zapojeno do mechanismu, kterým mateřský melatonin synchronizuje fetální SCN. U dospělých potkanů je exprese genů *c-Fos*, *Avp* a *Per1* v SCN vysoká během dne a postupně klesá k nízkým hladinám v noci (Sumová *et al.*, 1998; Schwartz *et al.*, 1995; Jáč *et al.*, 2000). Můžeme proto spekulovat, že snížení exprese těchto genů vlivem aplikace melatoninu v CT12 (tedy přibližně v době přirozeného vzestupu hladiny mateřského melatoninu) může být vnímáno ve fetálním oscilátoru jako signál nástupu subjektivní noci, který by následně mohl fetální SCN synchronizovat. Seřízení molekulárního mechanismu fetálních hodin by mohlo teoreticky nastat přes potlačení exprese genu *Per1*, který je hodinovým genem a jehož proteinový produkt PER1 působí jako součást negativní zpětnovazebné smyčky ovlivňující chod cirkadiálních hodin. U dospělých potkanů jsou přes akutní indukci exprese genu *Per1* a následně hladiny proteinu PER1 synchronizovány cirkadiální hodiny v SCN světlem (shrnutí v Sumová *et al.*, 2006). Je tedy možné, že ovlivnění transkripce genu *Per1* je využíváno v prenatálním období pro synchronizaci melatoninem, který na rozdíl od světla jeho expresi a tím i hladinu PER1 proteinu potlačuje. Je zajímavé, že u dospělých zvířat melatonin nemá akutní vliv na expresi hodinových genů v SCN (Poirel *et al.*, 2003). Nabízí se tedy možnost spekulovat, že citlivost hodinových genů k melatoninu během ontogeneze klesá. Tuto naši hypotézu však bude nutno teprve experimentálně ověřit či vyvrátit v dalších studiích.

Vliv melatoninu na centrální oscilátor u dospělých jedinců je závislý na denní době (shrnutí v Arendt, 2005). Melatonin podaný na konci subjektivního dne způsobuje fázové předběhnutí behaviorálních rytmů (Cassone *et al.*, 1986), předběhnutí rytmu ve světle indukované expresi genu *c-Fos* v SCN (Sumová a Illnerová, 1996) i předběhnutí rytmů v neuronální aktivitě na řezech SCN *in vitro* (McArthur *et al.*, 1991). Melatonin podaný na konci subjektivní noci a na začátku subjektivního dne vyvolává opoždění rytmů v hladině melatoninu u člověka (Armstrong, 1989), *in vitro* však nebyl tento efekt potvrzen (McArthur *et al.*, 1991). Akutní vliv melatoninu na synchronizaci rytmů ve fetálních SCN sledovat nelze z důvodu absence měřitelného cirkadiálního rytmu během tohoto vývojového stádia.

Výsledky naší studie, sledující akutní odpověď na expresi zmíněných genů ve fetálních SCN ukázaly, že tato odpověď se lišila v závislosti na denní době. Největší efekt na expresi sledovaných genů jsme zaznamenali na začátku subjektivní noci, tj. právě v době, kdy je u dospělých SCN citlivost k melatoninu nejvyšší. Citlivost fetálních SCN vůči melatoninu se tedy jeví závislá na vnitřním cirkadiánním čase. Tento výsledek naznačuje, že již v E20 vykazuje funkční stav SCN cirkadiánní změny. Tento výsledek je spíše překvapivý s ohledem na to, že v E20 nebyly naměřeny signifikantní cirkadiánní rytmy v expresi hodinových genů (Kováčiková *et al.*, 2006) a také zvláště proto, že féty mohly být pravděpodobně jen málo synchronizovány vzájemně díky tomu, že jejich matky byly chovány na stálém světle (viz diskuze bod 6.1.). Rytmus v expresi genů *c-Fos* a *Avp* v SCN jednodenních mláďat matek chovaných na stálém světle byl zcela vyrušen díky desynchronizaci jednotlivých mláďat mezi sebou (Nováková *et al.*, 2010). Kdy však během prenatalního období k této desynchronizaci dochází není známo. V čase CT12, avšak ne v ostatních časech, byla exprese všech sledovaných genů za 30 minut po aplikaci vehikula zvýšena oproti hodnotám v pozdějších odběrech. Výsledek opět evokuje již dříve zmiňovaný stresující vliv injekční aplikace na březí samice, který by se mohl projevit v akutní změně genové exprese v SCN. Nelze ale také vyloučit, že vzhledem k detailnímu časovému rozlišení je toto zvýšení náhodné v rámci ultradiánní fluktuační hladiny mRNA (příp. hnRNA).

Jak již bylo zmíněno dříve, je u dospělých jedinců SCN citlivé na melatonin během krátké doby před a okolo začátku subjektivní noci (CT10-CT12) (Stehle *et al.*, 1989), kdy je hustota receptorů v SCN nejvyšší (Gauer *et al.*, 1993). Endogenní hladina melatoninu je však regulována tak, že stoupá až po začátku subjektivní noci, tedy v době kdy SCN již svou citlivost k melatoninu ztrácí (Quay, 1964). Nabízí se tedy otázka, jaký má citlivost SCN k melatoninu fyziologický význam? Výsledky studií zabývající se účinkem melatoninu v prenatalním období společně s výsledky této studie vedou k formulaci hypotézy, že funkce melatoninových receptorů v SCN spočívá v umožnění mateřské synchronizace a během postnatálního vývoje se tato fyziologická role postupně vytrácí. Možnost synchronizovat SCN dospělých jedinců podáváním exogenního melatoninu v době před začátkem subjektivní noci, které je často využíváno k terapeutickým účelům, by tak byl vlastně rudimentální pozůstatek tohoto mechanismu. U některých živočišných druhů, jako je např. křeček zlatý, se dokonce citlivost k melatoninu v dospělosti vytrácí úplně. U tohoto živočišného druhu je SCN citlivé k melatoninu během prenatalního (Davis a Mannion, 1988) i raného postnatálního období (Grosse *et al.*, 1996), avšak v dospělosti tato citlivost zcela vymizí (Hastings *et al.*, 1992).

## 7. ZÁVĚR

Z výsledků diplomové práce vyplývá, že během prenatalního období může být synchronizace fétů zprostředkována pomocí mateřského melatoninového signálu. Melatonin měl okamžitý vliv na expresi genů *c-Fos*, *Avp* a *Per1* ve fetálních SCN. Toto působení melatoninu by mohlo být součástí mechanismu, kterým mateřská SCN nastavují fázi fetálních hodin během prenatalního vývoje. Oproti předchozím pracím, které se otázkou mateřské synchronizace zabývaly, jsou naše závěry podloženy sledováním cirkadiánních rytmů v SCN mláďat ihned po porodu a tedy v době, kdy ještě přesně odrážejí svůj stav během fetálního období. Dále výsledky ukázaly, že funkční stav SCN v E20 vykazuje změny v závislosti na denní době. Mimoto z našich výsledků vyplynulo, že injekční aplikace může mít vliv na cirkadiánní systém březích samic laboratorního potkana.

Získané poznatky poskytují nejen základ hlubšího pochopení vlastností cirkadiánního systému obecně, ale mohou také najít své uplatnění v medicíně v oblasti péče o novorozené děti. Zejména odborná péče o předčasně narozené děti vyžaduje důkladnou znalost prostředí prenatalního vývoje. Zajištění podmínek napodobujících přirozené prostředí může napomoci zmírnění dopadu předčasného porodu na zdravý vývoj těchto dětí. K rozšíření těchto znalostí svým dílem přispěla i tato práce.



## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abrahamson E. E., Moore R. Y. (2001): Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res.* 916(1-2): 172-91.

Antle M. C., Foley N. C., Foley D. K., Silver R. (2007): Gates and oscillators II: zeitgebers and the network model of the brain clock. *J Biol Rhythms.* 22: 14-25.

Arendt J. (2005): Melatonin: characteristics, concerns, and prospects. *J Biol Rhythms.* 20(4): 291-303.

Armstrong S. M. (1989): Melatonin and circadian control in mammals. *Experientia.* 45: 932–938.

Aschoff J., Hoffmann K., Pohl H., Wever R. (1975): Re-entrainment of circadian rhythms after phase-shifts of the Zeitgeber. *Chronobiologia.* 2, 23–78.

Bellavía S. L., Carpentieri A. R., Vaqué A. M., Macchione A. F., Vermouth N. T. (2006): Pup circadian rhythm entrainment--effect of maternal ganglionectomy or pinealectomy. *Physiol Behav.* 89(3):342-9.

Bendová Z., Sumová A., Illnerová H. (2004): Development of circadian rhythmicity and photoperiodic response in subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Dev Brain Res.* 148: 105-112.

Cassone V. M., Chesworth M. J., Armstrong S. M. (1986): Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol Behav.* 36: 1111–1121.

Chesworth M. J., Cassone V. M., Armstrong S. M. (1987): Effects of daily melatonin injections on activity rhythms of rats in constant light. *Am J Physiol.* 253(1 Pt 2): R101-7.

Cheung P. W., McCormack C. E. (1982): Failure of pinealectomy or melatonin to alter

circadian activity rhythm of the rat. *Am J Physiol.* 242(3): R261-4.

Daan S., Pittendrigh C. S. (1976): A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents II. The variability of phase response curves. *J Comp Physiol.* 106: 255-266.

Davis F. C., Gorski R. A. (1988): Development of hamster circadian rhythms: role of the maternal suprachiasmatic nucleus. *J Comp Physiol.* 162, 601–610.

Davis F. C., Mannion J. (1988): Entrainment of hamster pup circadian rhythms by prenatal melatonin injections to the mother. *Am J Physiol.* 255(3 Pt 2): R439-48.

Ding J. M., Faiman L. E., Hurst W. J., Kuriashkina L. R., Gillette M. U. (1997): Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *J Neurosci.* 17(2): 667-75.

Drijfhout W. A., van der Linde S., Kooi C., Grol B., Westerink B. H. C. (1996): Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. *J Neurochem.* 66: 748–755.

Duncan M. J., Banister M. J., Reppert S. M. (1986): Developmental appearance of light-dark entrainment in the rat. *Brain Res.* 369(1-2): 326-30.

Duncan M. J., Davis F. C. (1993): Developmental appearance and age related changes in specific 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the suprachiasmatic nuclei of female Syrian hamsters. *Brain Res Dev Brain Res.* 73(2): 205-12.

Gauer F., Masson-Pévet M., Skene D. J., Vivien-Roels B., Pévet P. (1993): Daily rhythms of melatonin binding sites in the rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei; evidence for a regulation of melatonin receptors by melatonin itself. *Neuroendocrinology.* 57(1): 120-6.

Gekakis N., Staknis D., Nguyen H. B., Davis F. C., Wilsbacher L. D., King D. P., Takahashi J. S., Weitz C. J. (1998): Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science.* 280(5369): 1564-9.

Grosse J., Velickovic A., Davis F. C. (1996): Entrainment of Syrian hamster circadian activity rhythms by neonatal melatonin injections. *Am J Physiol.* 270(3 Pt 2): R533-40.

Guilding C., Piggins H. D. (2007): Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *Eur J Neurosci.* 25(11): 3195-216

Hastings M. H. (1997): Circadian clocks. *Curr Biol.* 7 (11): R607-2.

Hastings M. H., Mead S. M., Vindlacheruvu R. R., Ebling F. J., Maywood E. S., Grosse J. (1992): Non-photoc phase shifting of the circadian activity rhythm of Syrian hamsters: the relative potency of arousal and melatonin. *Brain Res.* 591(1): 20-6.

Illnerová H. (1996): Melatonin a jeho působení. *Vesmír* 75, 226.

Illnerová H., Backström M., Sääf J., Wetterberg L., Vangbo B. (1978): Melatonin in rat pineal gland and serum; rapid parallel decline after light exposure at night. *Neurosci Lett.* 9(2-3): 189-93.

Iwasaki Y., Oiso Y., Saito H., Majzoub J. A. (1997): Positive and negative regulation of the rat vasopressin gene promoter. *Endocrinology.* 138(12): 5266-74.

Jáč M., Sumová A., Illnerová H. (2000): c-Fos rhythm in subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus under artificial and natural photoperiods. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279(6): R2270-6.

Jin X., Shearman L. P., Weaver D. R., Zylka M. J., de Vries G. J., Reppert S. M. (1999): A molecular mechanism regulating rhythmic output from suprachiasmatic circadian clock. *Cell.* 96(1): 57-68.

Jud C., Albrecht U. (2006): Circadian rhythms in murine pups develop in absence of a functional maternal circadian clock. *J Biol Rhythms.* 21(2): 149-54.

Kalsbeek A., Buijs R. M. (2002): Output pathways of the mammalian suprachiasmatic

nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res.* 309: 109–119.

Klein D. C., Weller J. L., Moore R. Y. (1971): Melatonin metabolism: neural regulation of pineal serotonin: acetyl coenzyme A N-acetyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 68(12): 3107-10.

Koehl M., Darnaudéry M., Dulluc J., Van Reeth O., Le Moal M., Maccari S. (1999): Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender. *J Neurobiol.* 40(3): 302-15.

Kopp M., Meissl H., Korf H. W. (1997): The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-induced phosphorylation of the transcription factor CREB (cAMP response element binding protein) in the rat suprachiasmatic nucleus is inhibited by melatonin. *Neurosci Lett.* 227: 145-148.

Kornhauser J. M., Nelson D. E., Mayo K. E., Takahashi J. S. (1992): Regulation of jun-B messenger RNA and AP-1 activity by light and a circadian clock. *Science.* 255, 1581–1584.

Kováčiková Z., Sládek M., Bendová Z., Illnerová H., Sumová A. (2006): Expression of clock and clock-driven genes in the rat suprachiasmatic nucleus during late fetal and early postnatal development. *J Biol Rhythms.* 21(2): 140-8.

Le Minh N., Damiola F., Tronche F., Schütz G., Schibler U. (2001): Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J.* 20(24): 7128-36.

Leard L. E., Macdonald E. S., Heller H. C., Kilduff T. S. (1994): Ontogeny of photic-induced c-fos mRNA expression in rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport.* 5: 2683-2687.

Matějů K., Bendová Z., El-Hennamy R., Sládek M., Sosniyenko S., Sumová A. (2009): Development of the light sensitivity of the clock genes *Period1* and *Period2*, and immediate-early gene *c-fos* within the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci.* 29(3): 490-501.

Maywood E. S., Reddy A. B., Wong G. K. Y., O'Neill J. S., O'Brien J. A., McMahon D. G., Harmar A. J., Okamura H., Hastings M. H. (2006): Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. *Curr Biol.* 16: 599-605.

McArthur A. J., Gillette M. U., Prosser R. A. (1991): Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res.* 565: 158–161.

McArthur A. J., Hunt A. E., Gillette M. U. (1997): Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology.* 138(2): 627-34.

McMillen I. C., Nowak R., Walker D. W., Young I. R. (1990): Maternal pinealectomy alters the daily pattern of fetal breathing in sheep. *Am J Physiol.* 258(1 Pt 2): R284-7.

Møller M., Baeres M. M. (2002): The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res.* 309: 139–150.

Moore R. Y. (1991): Development of the suprachiasmatic nucleus. In: *Suprachiasmatic Nucleus: the Mind's Clock*, editoři Klein D. C., Moore R. Y., Reppert S. M., Oxford Univ. Press, New York, p. 197-216.

Moore R. Y., Bernstein M. E. (1989): Synaptogenesis in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrated by electron microscopy and synapsin I immunoreactivity. *J Neurosci.* 9(6): 2151-2162.

Moore R. Y., Eichler V. B. (1972): Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42(1): 201-6.

Morin L. P., Allen C. N. (2005): The circadian visual system. *Brain Res Rev.* 51(1): 1-60.

Muñoz M., Peirson S. N., Hankins M. W., Foster R. G. (2005): Long-term constant light induces constitutive elevated expression of mPER2 protein in the murine SCN: a molecular basis for Aschoff's rule? *J Biol Rhythms.* 20: 3–14.

Nováková M., Sládek M., Sumová A. (2010): Exposure of pregnant rats to restricted feeding schedule synchronizes the SCN clocks of their fetuses under constant light but not under a light–dark regime. *J Biol Rhythms*. (v tisku).

Ohta H., Honma S., Abe H., Honma K. (2002): Effects of nursing mothers on rPer1 and rPer2 circadian expressions in the neonatal rat suprachiasmatic nuclei vary with developmental stage. *Eur J Neurosci*. 15, 1953–1960.

Ohta H., Honma S., Abe H., Honma K. (2003): Periodic absence of nursing mothers phase-shifts circadian rhythms of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of rat pups. *Eur J Neurosci*. 17, 1628–1634.

Ohta H., Yamazaki S., McMahon D. G. (2005): Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat Neurosci*. 8: 267-269.

Panda S., Provencio I., Tu D. C., Pires S. S., Rollag M. D., Castrucci A. M., Pletcher M. T., Sato T. K., Wiltshire T., Andahazy M., Kay S. A., Van Gelder R. N., Hogenesch J. B. (2003): Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science*. 301(5632): 525-7.

Paxinos G., Watson C. (2005): The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier Academic Press, 2005, Burnlington, USA

Poirel V. J., Boggio V., Dardente H., Pevet P., Masson-Pevet M., Gauer F. (2003): Contrary to other non-photoc cues, acute melatonin injection does not induce immediate changes of clock gene mRNA expression in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience*. 120(3): 745-55.

Poirel V. J., Masson-Pévet M., Pevét P., Gauer F. (2002): MT1 melatonin receptor mRNA expression exhibits a circadian variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res*. 946(1): 64-71.

Quay W. B. (1964): Circadian and estrous rhythms in pineal melatonin and 5-hydroxy indole-3-acetic acid. *Proc Soc Exp Biol Med*. 115: 710-3.

- Quay W. B. (1968): Individuation and lack of pineal effect in the rat's circadian locomotor rhythm. *Physiol Behav.* 3: 109-118.
- Reppert S. M., Chez R. A., Anderson A., Klein D. C. (1979): Maternal-fetal transfer of melatonin in the non-human primate. *Pediatr Res.* 13: 788–791.
- Reppert S. M., Coleman R. J., Heath H. W., Swedlow J. R. (1984): Pineal N-acetyltransferase activity in 10-day-old rats: a paradigm for studying the developing circadian system. *Endocrinology.* 115: 918–925.
- Reppert S. M., Schwartz W. J. (1984): The suprachiasmatic nuclei of the fetal rat: characterization of a functional circadian clock using <sup>14</sup>C-labeled deoxyglucose. *J Neurosci.* 4(7): 1677-82.
- Reppert S. M., Schwartz W. J. (1986a): Maternal endocrine extirpations do not abolish maternal coordination of the fetal circadian clock. *Endocrinology.* 119(4): 1763-7.
- Reppert S. M., Schwartz W. J. (1986b): Maternal suprachiasmatic nuclei are necessary for maternal coordination of the developing circadian system. *J Neurosci.* 6: 2724–2729.
- Reppert S. M., Uhl G.R. (1987): Vasopressin messenger ribonucleic acid in supraoptic and suprachiasmatic nuclei: appearance and circadian regulation during development. *Endocrinology.* 120, 2483–2487.
- Reppert S. M., Weaver D. R. (2001): Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol.* 63: 647-76.
- Reppert S. M., Weaver D. R., Ebisawa T. (1994): Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron.* 13(5): 1177-85.
- Schibler U., Ripperger J., Brown S. A. (2003): Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms.* 18(3): 250-60.

Schibler U. (2005): The daily rhythms of genes, cells and organs. *EMBO Rep.* 6: S9-13.

Schwartz W. J., Aronin N., Takeuchi J., Bennet M. R., Peters R. J. (1995): Towards a molecular biology of the suprachiasmatic nucleus: photic and temporal regulation of c-fos gene expression. *Semin Neurosci.* 7, pp. 53–60.

Shearman L. P., Zylka M. J., Weaver D. R., Kolakowski Jr. L. F., Reppert S. M. (1997): Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron.* 19, 1261–1269.

Sheng M., McFadden G., Greenberg M. E. (1990): Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron.* 4(4): 571-82.

Shibata S., Moore R. Y. (1987): Development of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 431, 311–315.

Shibata S., Moore R. Y. (1988): Development of a fetal circadian rhythm after disruption of the maternal circadian system. *Brain Res.* 469(1-2): 313-7.

Shimoda K., Hanada K., Yamada N., Takahashi K., Takahashi S. (1986): Periodic exposure to mother is potent zeitgeber of rat pups' rhythm. *Physiol Behav.* 36: 723–730.

Sládek M., Sumová A., Kováčiková Z., Bendová Z., Laurinová K., Illnerová H. (2004): Insight into molecular core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101, 6231–6236.

Speh J. C., Moore R. Y. (1993): Retinohypothalamic tract development in the hamster and rat. *Brain Res Dev Brain Res.* 76: 171–181.

Stehle J., Vaněček J., Vollrath L. (1989): Effects of melatonin on spontaneous electrical activity of neurons in rat suprachiasmatic nuclei: an in vitro iontophoretic study. *J Neural Transm.* 78(2): 173-7.



Stephan F. K., Zucker I. (1972): Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 69(6): 1583-6.

Sudo M., Sasahara K., Moriya T., Akiyama M., Hamada T., Shibata S. (2003): Constant light housing attenuates circadian rhythms of mPer2 mRNA and mPER2 protein expression in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Neuroscience*. 121: 493–9.

Sugishita M., Takashima M., Takeuchi Y., Kato Y., Yamauchi T., Takahashi K. (1993): Periodic mother deprivation during the light period reversed the phase of serotonin N-acetyltransferase activity rhythm of the pineal gland in rat pups. *Pharmacol Biochem Behav*. 46: 609– 615.

Sumová A., Bendová Z., Sládek M., El-Hennamy R., Laurinová K., Jindráková Z., Illnerová H. (2006): Setting the biological time in central and peripheral clocks during ontogenesis. *FEBS Lett*. 580(12): 2836-42.

Sumová A., Illnerová H. (1996): Melatonin instantaneously resets intrinsic circadian rhythmicity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*. 218(3): 181-4.

Sumová A., Illnerová H. (1998): Photic resetting of intrinsic rhythmicity of the rat suprachiasmatic nucleus under various photoperiods. *Am J Physiol*. 274(3 Pt 2): R857-63.

Sumová A., Illnerová H. (2005): Effect of photic stimuli disturbing overt circadian rhythms on the dorsomedial and ventrolateral SCN rhythmicity. *Brain Res*. 1048: 161–9.

Sumová A., Jáč M., Sládek M., Šauman I., Illnerová H. (2003): Clock gene daily profiles and their phase relationship in the rat suprachiasmatic nucleus are affected by photoperiod. *J Biol Rhythms*. 18(2): 134-44.

Sumová A., Trávníčková Z., Mikkelsen J. D., Illnerová H. (1998): Spontaneous rhythm in c-Fos immunoreactivity in the dorsomedial part of the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*. 801(1-2): 254-8.

Takahashi S., Yokota S., Hara R., Kobayashi T., Akiyama M., Moriya T., Shibata, S. (2001): Physical and inflammatory stressors elevate circadian clock gene mPer1 mRNA levels in the paraventricular nucleus of the mouse. *Endocrinology*. 142, 4910–4917.

Thomas E. M. V., Armstrong S. M. (1988): Melatonin administration entrains female rat activity rhythms in constant darkness but not in constant light. *Am J Physiol*. 255(2 Pt 2): R237-42.

Trávníčková-Bendová Z., Cermakian N., Reppert S. M., Sassone-Corsi P. (2002): Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99, 7728–7733.

Vaněček J., Pavlík A., Illnerová H. (1987): Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res*. 435(1-2): 359-62.

Vaněček J., Vollrath L. (1989): Melatonin inhibits cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in the rat pituitary. *Brain Res*. 505: 157-159.

Vermouth N. T., Carriazo C. S., Gallará R. V., Carpentieri A. R., Bellavía S. L. (1995): Maternal coordination of the daily rhythm of malate dehydrogenase activity in testes from young rats: effect of maternal sympathetic denervation of the pineal gland and administration of melatonin. *Chronobiol Int*. 12(1): 8-18.

Vielhaber E., Eide E., Rivers A., Gao Z. H., Virshup D. M. (2000): Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. *Mol Cell Biol*. 20(13): 4888-99.

Viswanathan N., Davis F. C. (1997): Single prenatal injections of melatonin or the D1-dopamine receptor agonist SKF 38393 to pregnant hamsters sets the offsprings' circadian rhythms to phases 180 degrees apart. *J Comp Physiol A*. 180(4): 339-46.

Viswanathan N., Weaver D. R., Reppert S. M., Davis F. C. (1994): Entrainment of the fetal hamster circadian pacemaker by prenatal injections of the dopamine agonist SKF 38393. *J Neurosci*. 14: 5393– 5398.

Weaver D. R., Namboodiri M. A., Reppert S. M. (1988): Iodinated melatonin mimics melatonin action and reveals discrete binding sites in fetal brain. *FEBS Lett.* 228(1): 123-7.

Weaver D. R., Reppert S. M. (1986): Maternal melatonin communicates daylength to the fetus in Djungarian hamsters. *Endocrinology.* 119(6): 2861-3.

Weaver D. R., Reppert S. M. (1989): Periodic feeding of SCN-lesioned pregnant rats entrains the fetal biological clock. *Brain Res Dev Brain Res.* 46(2): 291-6.

Weaver D. R., Reppert S. M. (1995): Definition of the developmental transition from dopaminergic to photic regulation of c-fos gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res.* 33(1): 136-48.

Weaver D. R., Rivkees S. A., Reppert S. M. (1992): D1-dopamine receptors activate c-fos expression in the fetal suprachiasmatic nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(19): 9201-4.

Welsh D. K., Logothetis D. E., Meister M., Reppert S. M. (1995): Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron.* 14(4): 697-706.

Yambe Y., Arima H., Kakiya S., Murase T., Oiso Y. (2002): Diurnal changes in arginine vasopressin gene transcription in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res.* 104(2): 132-6.

Yoo S. H., Yamazaki S., Lowrey P. L., Shimomura K., Ko C. H., Buhr E. D., Siepkka S. M., Hong H. K., Oh W. J., Yoo O. J., Menaker M., Takahashi J. S. (2004): PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(15): 5339-46.